

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**MARCELLA LEITE PORTO**

**O EFEITO DO ENVELHECIMENTO SOBRE A FUNCIONALIDADE DE  
CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS DE MEDULA ÓSSEA DE  
CAMUNDONGOS C57BL/6**

Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas

Vitória  
2015

**O EFEITO DO ENVELHECIMENTO SOBRE A FUNCIONALIDADE DE  
CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS DE MEDULA ÓSSEA DE  
CAMUNDONGOS C57BL/6**

MARCELLA LEITE PORTO

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

Aprovada em 07/08/2015 por:

---

Prof. Dra. Silvana dos Santos Meyrelles – Orientadora, UFES

---

Prof. Dra. Bianca Prandi Campagnaro – Co-orientadora, UVV

---

Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez, UFES

---

Prof. Dra. Sonia Alves Gouveia, UFES

---

Prof. Dra. Flávia de Paula, UFES

---

Prof. Dr. Henrique Futuro Neto, EMESCAM

Universidade Federal do Espírito Santo  
Vitória

2015

### **Agradecimentos**

À Deus por estar sempre presente na minha vida e tornar essa conquista possível. Aos meus pais Sergio e Cristina que foram os maiores incentivadores dessa jornada. Ao meu marido Guilherme que me deu todo o suporte para que eu realizasse os meus objetivos profissionais. À toda a minha família por entender a minha ausência e torcer por meu sucesso profissional. Vocês, por muitas vezes, abriram mão de seus sonhos, para que eu pudesse realizar os meus.

Aos meus queridos orientadores Silvana e Vasquez: mestres eternos! Vocês são exemplos de grandes profissionais. Aprendo todos os dias com vocês. Sinto muito orgulho de dizer que sou aluna do Laboratório de Fisiologia Translacional. O doutorado representa apenas uma etapa de tudo que ainda está por vir, espero contar com o apoio científico e amistoso por toda a minha vida.

Aos professores Ágata, Bianca e Thiago: vocês participaram ativamente da minha transformação científica. Agradeço a parceria. Obrigada aos demais amigos do laboratório pelas discussões, troca de experiências, publicações e experimentos!

Muito obrigada a todos!

## SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	4
LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABELAS.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS .....	8
RESUMO.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. DOENÇAS CRÔNICAS E ENVELHECIMENTO .....	12
1.2. MECANISMOS MOLECULARES .....	13
1.2.1. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....	13
1.2.2. CITOCINAS INFLAMATÓRIAS.....	16
1.3. ENVELHECIMENTO E CÉLULAS-TRONCO.....	18
1.3.1. CÉLULAS-TRONCO.....	18
1.3.2. CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS .....	20
1.3.3. CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS.....	20
1.4. DESFECHOS CELULARES .....	21
1.4.1. APOPTOSE.....	22
1.4.2. SENESCÊNCIA.....	26
1.4.3. PLASTICIDADE CELULAR E AUTO-RENOVAÇÃO.....	27
2. JUSTIFICATIVA.....	30
3. OBJETIVOS .....	32
3.1. OBJETIVO GERAL.....	32
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
4. METODOLOGIA.....	34
4.1. ANIMAIS.....	34
4.2. COLETA DE SANGUE PERIFÉRICO E ISOLAMENTO DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS DE MEDULA ÓSSEA .....	34
4.3. QUANTIFICAÇÃO EM CÂMARA DE NEUBAUER .....	37
4.4. ENRIQUECIMENTO DA FRAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS 37	
4.5. IMUNOFENOTIPAGEM.....	38

4.6.	ANÁLISE DO CICLO CELULAR.....	39
4.7.	DOSAGEM DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS.....	40
4.8.	DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS CITOPLASMÁTICOS DE EROS.....	41
4.9.	AVALIAÇÃO DAS VIAS PRÓ E ANTI-OXIDANTES.....	42
4.10.	ANÁLISE DO COMETA ALCALINO.....	43
4.12.	AVALIAÇÃO DO COMPRIMENTO DE TELÔMERO.....	45
4.13.	ANÁLISE DO CONTEÚDO LISOSSOMAL.....	46
4.14.	MÉTODO HISTOQUÍMICO PARA ATIVIDADE DA $\beta$ -GALACTOSIDASE.....	47
4.15.	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MARCADORES RELACIONADOS A PLASTICIDADE E AUTO-RENOVAÇÃO CELULAR.....	48
4.16.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
5.	RESULTADOS.....	50
5.1.	CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS POR IMUNOFENOTIPAGEM.....	50
5.2.	AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS, CICLO CELULAR E CITOCINAS INFLAMATÓRIAS.....	51
5.3.	EFEITOS DO ENVELHECIMENTO SOBRE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E CITOCINAS INFLAMATÓRIAS.....	52
5.4.	AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....	52
5.5.	AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DAS PRINCIPAIS VIAS DE PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....	55
5.6.	AVALIAÇÃO DO SISTEMA ANTIOXIDANTE EM CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS.....	57
5.7.	AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE FRAGMENTAÇÃO DO DNA DE CÉLULAS DO RIM CLIPADO.....	58
5.8.	EFEITOS DO ENVELHECIMENTO SOBRE A APOPTOSE EM CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS.....	60
5.9.	SENESCÊNCIA CELULAR.....	61
5.9.1.	COMPRIMENTO RELATIVO DE TELÔMERO.....	61
5.9.2.	CONTEÚDO LISOSSOMAL.....	62
5.9.3.	ATIVIDADE DA $\beta$ -GALACTOSIDASE.....	63

5.10. EXPRESSÃO DOS MARCADORES DE PLASTICIDADE CELULAR E AUTO-RENOVAÇÃO .....	64
6. DISCUSSÃO .....	69
6.1. NÚMERO DE CTHs, CICLO CELULAR, HEMOGRAMA E CITOCINAS.....	72
6.2. PRODUÇÃO DE EROs EM CTHs .....	74
6.4. DANO AO DNA E APOPTOSE.....	77
7. CONCLUSÃO.....	84
8. REFERÊNCIAS .....	86
9. ANEXO.....	106

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Expectativa de Vida ao Nascer ( $e_0$ ).....	12
Figura 2 – Efeitos generalizados positivos e negativos das espécies reativas de oxigênio (EROs) .....	14
Figura 3 - Diversas doenças estão relacionadas ao aumento da produção de EROs capazes de danificar macromoléculas biológicas.....	16
Figura 4 - Esquema de células-tronco hematopoiéticas e mesenquimais.....	21
Figura 5 - Principais alterações observadas em células necróticas e apoptóticas.....	24
Figura 6 – Auto-renovação e diferenciação das CTHs.....	28
Figura 7 – Camundongos C57BL/6.....	34
Figura 8 – Obtenção de células-tronco hematopoiéticas.....	36
Figura 9 – Suspensão de células da medula óssea em placa de cultura. ....	37
Figura 10 – Câmara de Neubauer (A). Visualização do retículo de contagem com os quadrantes (B).....	37
Figura 11 – A) Citômetro de fluxo FACSCanto II (BD) e <i>layout</i> dos <i>softwares</i> utilizados na análise dos dados FACSDiva (B) e FCS Express 4 Plus (C). ....	39
Figura 12 – Análise do conteúdo de DNA pela marcação com iodeto de propídeo.....	40
Figura 13 – Análise da apoptose através do ensaio com anexina V (anexina) e iodeto de propídeo (PI).....	45
Figura 14 – Análise da senescência celular por laranja de acridina em citômetro de fluxo. .	47
Figura 15 – Imunofenotipagem de células-tronco hematopoiéticas derivadas de medula óssea de camundongos C57.. ....	51
Figura 16 – Efeitos do envelhecimento sobre a produção de espécies reativas de oxigênio em células-tronco hematopoiéticas.....	55
Figura 17 – Identificação das principais fontes de produção de espécies reativas de oxigênio em células-tronco hematopoiéticas de animais com 2, 12 e 24 meses de idade.....	56
Figura 18 – Avaliação da capacidade enzimática antioxidante de células-tronco hematopoiéticas.....	57
Figura 19 – Ensaio do cometa alcalino.. ....	59
Figura 20- Efeitos do envelhecimento sobre a apoptose de células-tronco hematopoiéticas.. ..	61
Figura 21 – Efeitos do envelhecimento sobre o comprimento de telômero.. ....	62
Figura 22 – Efeito do envelhecimento sobre o conteúdo lisossomal. ....	63
Figura 23 – Efeito do envelhecimento na senescência celular. As imagens mostram típicas células senescentes.....	64

Figura 24 - Expressão do marcador Oct 3/4 envolvido na potencial plástica de CTHs.....	65
Figura 25 - Expressão do marcador Nanog envolvido na manutenção da indiferenciação de CTHs.. .....	66
Figura 26 - Expressão do marcador Sox-2 envolvido na manutenção da pluripotência e auto-renovação de CTHs.....	67
Figura 27 – Descrição das células-tronco hematopoiéticas (CTH) derivadas de medula óssea de animais de 2 meses.....	70
Figura 28 - Descrição das células-tronco hematopoiéticas (CTH) derivadas de medula óssea de animais de 12 meses.. .....	71
Figura 29 - Descrição das células-tronco hematopoiéticas (CTH) derivadas de medula óssea de animais de 24 meses. ....	72

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeitos do envelhecimento no peso corporal, número de células-tronco hematopoiéticas, ciclo celular e citocinas inflamatórias.....	51
Tabela 2 - Efeitos do envelhecimento em parâmetros do hemograma e citocinas inflamatórias do sangue periférico. ....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
$\beta$ -gal	$\beta$ -Galactosidase
C57	Animal Selvagem
DCNT	Doença Crônica Não Transmissível
DMEM	Dulbecco's <i>Modified Eagle Medium</i>
EPM	Erro Padrão da Média
NO	Óxido Nítrico
$\cdot\text{O}_2^-$	Ânion Superóxido
PBS	<i>Phosphate Buffer Solution</i>
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
U.A.	Unidades Arbitrárias
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indol- $\beta$ -D-galactopiranosideo

## RESUMO

As células-tronco de tecidos com intensa renovação celular são mais suscetíveis a danos celulares. Embora a resposta a este processo em células-tronco hematopoiéticas (CTHs) é crucial, os mecanismos pelos quais a homeostase hematopoiética é sustentada ainda não são completamente compreendidos. Sabe-se que o envelhecimento aumenta os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROS) e inflamação, que contribuem para o aumento da proliferação, senescência ou apoptose, levando ao prejuízo das propriedades de auto-renovação e plasticidade dessas células. Neste estudo, avaliou-se a produção de EROS, danos ao DNA, apoptose, senescência e plasticidade em camundongos C57BL/6 de 2, 12 e 24 meses de idade. O envelhecimento promoveu um aumento nos níveis intracelulares de ânions superóxido, peróxido de hidrogênio, óxido nítrico, peroxinitrito / hidroxila em comparação às células dos animais jovens. Observou-se que as mitocôndrias e NADPHox foram as principais fontes de produção de EROS nos três grupos estudados, enquanto CYP450 contribuiu para aumento dos níveis nos grupos de 12 e 24 meses, e xantina oxidase apenas no grupo de animais com 24 meses de idade. Além disso, observou-se danos no DNA e apoptose no grupo 12 meses (4.2- e 2 vezes, respectivamente) e 24 meses (6- e 4 vezes, respectivamente). As CTHs de animais de 24 meses exibiram redução no comprimento do telômero e menor expressão dos marcadores de auto-renovação e plasticidade celular quando comparadas às CTHs de animais de 2 meses de idade. Estes dados sugerem que o envelhecimento prejudica a funcionalidade de CTHs e que estas alterações associadas à idade podem afetar a eficácia do transplante em terapias celulares.

## ABSTRACT

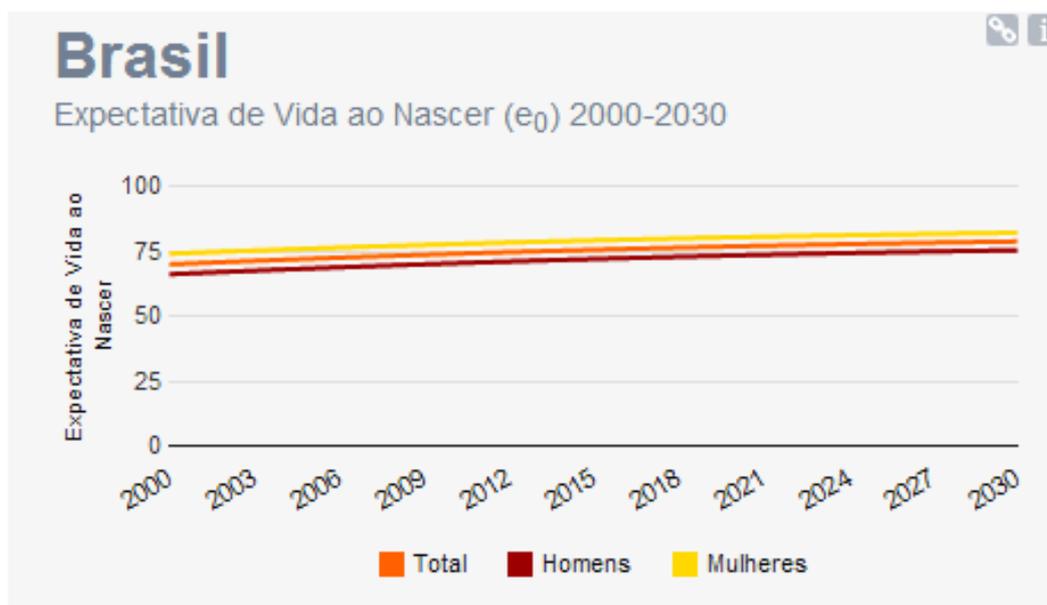
Stem cells of intensely regenerative tissues are susceptible to cellular damage. Although the response to this process in hematopoietic stem cells (HSCs) is crucial, the mechanisms by which hematopoietic homeostasis is sustained are not completely understood. Aging increases reactive oxygen species (ROS) levels and inflammation, which contribute to increased proliferation, senescence or apoptosis, leading to self-renewal premature exhaustion. In this study, we assessed ROS production, DNA damage, apoptosis, senescence and plasticity in young, middle and aged (2-, 12- and 24-month-old, respectively) C57BL/6 mice. Aged HSCs showed an increase in intracellular superoxide anion (1.4-fold), hydrogen peroxide (2-fold), nitric oxide (1.6-fold), peroxynitrite/hydroxyl (2.6-fold) compared with young cells. We found that mitochondria and NADPHox were the major sources of ROS production in the three groups studied, whereas CYP450 contributed to middle and aged, and xanthine oxidase only to aged, HSCs. In addition, we observed DNA damage and apoptosis in the middle (4.2- and 2-fold, respectively) and aged (6- and 4-fold, respectively) mice; aged mice also exhibited a significantly shorter telomere length (-1.8-fold) and a lower expression of plasticity markers. These data suggest that aging impairs the functionality of HSCs and that these age-associated alterations may affect the efficacy of aged HSC recovery and transplantation.

# INTRODUÇÃO

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. DOENÇAS CRÔNICAS E ENVELHECIMENTO

O envelhecimento da população mundial é um novo cenário que países desenvolvidos e em desenvolvimento estão tentando se adaptar. O que era no passado privilégio de alguns poucos passou a ser uma experiência de um número crescente de pessoas em todo o mundo (WONG *et al.*, 2004). Considerando-se o exemplo do Brasil, em 1950, a expectativa de vida ao nascimento era de 43,2, após uma década a expectativa de vida havia aumentado em quase 8 anos (55,9 em 1960). No ano 2000, a expectativa de vida ao nascimento passou a 69,83 e estima-se que no 2030 chegue a 78,64, como pode ser visualizado na Figura 1 (IBGE 2015).



**Figura 1 - Expectativa de Vida ao Nascer (e<sub>0</sub>).** Projeção da População Brasileira e das Unidades da Federação. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE – 2015).

O envelhecimento da população, a urbanização e a adoção de estilos de vida pouco saudáveis, como sedentarismo, tabagismo, dieta inadequada e obesidade, contribuem muito para o surgimento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) como hipertensão, diabetes mellitus, aterosclerose, câncer, doenças respiratórias crônicas, entre outras (WILD *et al.*, 2004).

No Brasil, as DCNT constituem o problema de saúde de maior magnitude e correspondem a cerca de 70% das causas de morte (DATASUS, 2012). Além de importante causa de mortalidade, as DCNT também representam uma grande relevância em termos de morbidade. Mesmo diante de tantos avanços terapêuticos ao longo das últimas décadas, de acordo com as projeções da Organização Mundial de Saúde (OMS), essa forte repercussão sobre o padrão de morbimortalidade tende a persistir: o crescimento da população idosa associado ao contemporâneo estilo de vida da sociedade como sedentarismo, dietas hiperglicídicas e/ou hiperlipídicas, baixo consumo de frutas, fibras e verduras são fatores de risco que só contribuem para a consolidação desses dados epidemiológicos (BEAGHOLE *et al.*, 2001; BARRETO *et al.*, 2003; IGNARRO *et al.*, 2007; IV DIRETRIZ BRASILEIRA SOBRE DISLIPIDEMIAS E PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE, 2007; SANZ & FAYAD, 2008). Dentre os fatores de risco supracitados, o envelhecimento (por não ser modificável) pode ser um dos mais relevantes.

Portanto, a proporção de pessoas com mais de 60 anos de idade vem apresentando tendência ascendente, em correspondência com a redução dos níveis de fecundidade e o aumento da esperança de vida ao nascer (RIPSA, 2002). Diante disso os estudos que envolvem envelhecimento são importantes na medida em que auxiliam a busca por melhores tratamentos e prevenção de doenças que prevalecem neste patamar de vida, como as doenças crônicas.

Na tentativa de entender completamente o envelhecimento, muitas teorias foram criadas para descrever esse processo. No entanto, o aumento do estresse oxidativo é a causa mais aceita para o processo de envelhecimento (BALABAN *et al.*, 2005).

## **1.2. MECANISMOS MOLECULARES**

### **1.2.1. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO**

Na última década, inúmeras evidências indicaram um denominador comum no desenvolvimento da maioria das DCNT, as espécies reativas de oxigênio (EROs) (PAPAHARALAMBUS & GRIENGLING, 2007; MONTEIRO *et al.*, 2011).

É consenso na literatura que um nível adequado de EROs é fundamental para a sobrevivência celular. Níveis elevados de EROs podem causar disfunções fisiológicas devido aos danos celulares e moleculares, como também pode sinalizar apoptose e senescência. Entretanto, níveis diminuídos podem induzir redução na proliferação de células e comprometimento do sistema imunológico (FINKEL & HOLBROOK, 2000). Alguns efeitos das EROs estão esquematizados na Figura 2.



**Figura 2 – Efeitos generalizados positivos e negativos das espécies reativas de oxigênio (EROs).** Imagem de domínio público.

O termo EROs é empregado coletivamente e engloba espécies radicalares não radicalares. As radicalares são as que chamamos de radicais livres por possuírem elétrons desemparelhados em seu último orbital, acarretando alta reatividade, são exemplos: ânion superóxido ( $O_2^-$ ), radicais hidroxil ( $OH^\cdot$ ), peroxil ( $RO_2^\cdot$ ). As espécies não radicalares são caracterizadas por possuírem elétrons pareados, como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e ozônio ( $O_3$ ) (GUTTERIDGE & HALLIWELL, 2010).

As fontes exógenas de EROs incluem as radiações ultravioleta, ionizantes, herbicidas, poluentes, agentes químicos (HALLIWELL & CROSS, 1994; GILLE & SIGLER, 1995) e metais pesados (LIANG & ZHOU, 2007; XU *et al.*, 2011).

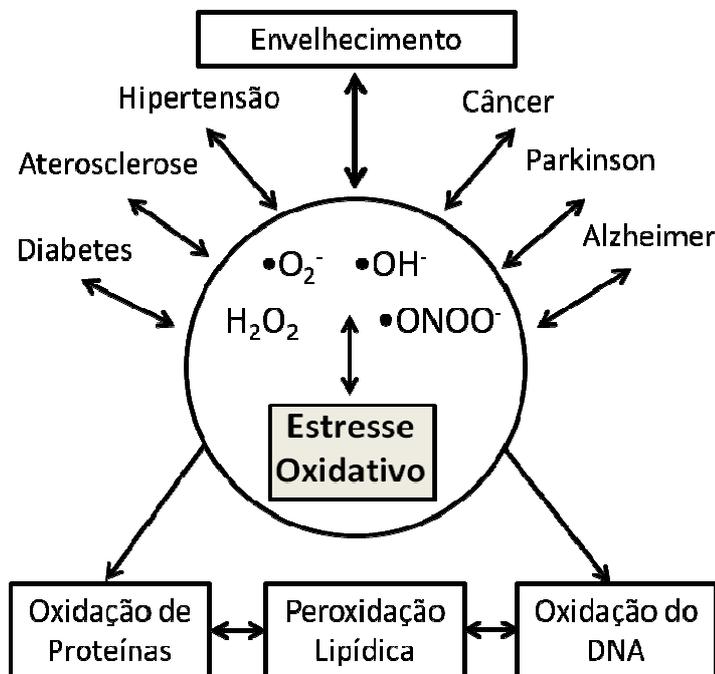
Endogenamente, as EROs são produzidas continuamente na cadeia respiratória das mitocôndrias com a redução de um elétron do oxigênio molecular. A oxNADPH, xantina oxidase (XO), mieloperoxidase, cicloxigenase, citocromo P450 e lipoxigenase são grandes fontes enzimáticas de ROS em células de mamíferos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Processos patológicos também aumentam a produção de EROs, como no caso das respostas inflamatórias. (BERRA *et al.*, 2006; FARRUGIA *et al.*, 2012).

Para que não ocorra acúmulo de EROs e logo aumento de danos oxidativos celulares, há no organismo sistemas antioxidantes, que protegem direta ou indiretamente todas as células e podem ser divididos em sistema antioxidante enzimático e não enzimático (RODRIGUEZ *et al.*, 2004). Os antioxidantes não enzimáticos são compostos por vitaminas C, E, betacaroteno, coenzima Q-10, cisteína, entre outros. Os antioxidantes enzimáticos correspondem principalmente as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx), entre outras (WEI & LEE, 2002).

Portanto, o estresse oxidativo relacionado ao envelhecimento varia de indivíduo a indivíduo, pois depende, além dos fatores genotípicos, do balanço na ingestão alimentar de antioxidantes (vitaminas, minerais, compostos fenólicos e outros) e pró-oxidantes (excesso de gorduras, etanol e carboidratos), da quantidade de ingestão calórica e do nível de atividade física (sedentarismo x fisicamente ativo) (SILVA & FERRARI, 2011).

As espécies reativas de oxigênio como ânions superóxido, radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio são constantemente produzidos como produtos da respiração celular. Em quantidades baixas são essenciais para algumas funções celulares, como por exemplo, na função imune e vasodilatação. Entretanto, em concentrações elevadas são capazes de causar danos às proteínas, lipídeos e DNA (SOHAL, 1995; MASSUDI *et al.*, 2012). O dano oxidativo ao DNA é o maior fator relacionado a doenças e ao envelhecimento (MASSUDI *et al.*, 2012).

Portanto, a formação de ROS nem sempre é deletéria, mas se houver estímulo exagerado para produção destas espécies e a isto estiver associada uma falha na defesa antioxidante, poderão ocorrer eventos nocivos às células, tecidos e, conseqüentemente, ao organismo, como pode ser observado na Figura 3.



**Figura 3 - Diversas doenças estão relacionadas ao aumento da produção de EROs capazes de danificar macromoléculas biológicas.** Adaptado de Campagnaro, 2012.

O aumento de danos moleculares causados por EROs podem ocasionar alterações na expressão gênica, instabilidade genômica, mutações, heterogeneidade celular, diminuição da proliferação celular e sinalização intracelular, morte celular, desorganização tecidual, entre outros (RATTAN, 2006).

### 1.2.2. CITOCINAS INFLAMATÓRIAS

Estudos têm demonstrado que os processos inflamatórios estão envolvidos com doenças comuns em idosos, como demências, doenças cardiovasculares, problemas de cognição, doenças neurodegenerativas como o Mal de Alzheimer e Parkinson, entre outras. (DIK *et al.*, 2005; SCHRAM *et al.*, 2007).

DCNT podem ativar mecanismos de inflamação, mas o próprio envelhecimento ativa determinados genes que aumentam a produção de células e

citocinas inflamatórias (ROSSIELO *et al.*, 2014). Estudos têm demonstrado haver aumento na circulação de citocinas pró-inflamatórias em função da idade, independente de qualquer doença (COHEN *et al.*, 1997).

Citocinas são glicoproteínas de baixo peso molecular secretadas por diferentes células que, mesmo em pequenas quantidades, alteram a função de células-alvo (MALE & ROIT, 1999; THÈZE, 1999; COLLINS, 2000; DUARTE, 2003). Essa classe de mediadores da resposta inflamatória com grande importância inicialmente foi chamada de linfocinas ou monocinas para indicar as células produtoras, o termo “citocina” passou a ser empregado e é a melhor descrição, uma vez que quase todas as células nucleadas são capazes de sintetizar essas proteínas, e passaram a ter uma enorme importância em quase todas as áreas de estudos em biologia. Muitos pesquisadores têm feito analogia entre as citocinas e os hormônios, entretanto enquanto os hormônios são sintetizados por tecidos altamente especializados, as citocinas são produzidas praticamente por qualquer tipo de célula (HOPKINS, 2003, DINARELLO, 2000).

Algumas citocinas favorecem claramente o processo inflamatório, sendo classificadas como pró-inflamatórias enquanto que outras suprimem esse fenômeno e são chamadas de citocinas anti-inflamatórias. Esta classificação deve ser criteriosa, pois algumas citocinas podem tanto promover quanto suprimir o processo inflamatório. Por exemplo, a interleucina 4 (IL-4), a IL-10 e a IL-13 são potentes ativadores de linfócitos B favorecendo a inflamação, entretanto também são capazes de suprimir genes para a síntese de algumas citocinas pró-inflamatórias (Dinarello, 2000). Dentre as diversas citocinas secretadas, destacam-se algumas citocinas pró-inflamatórias como: IL-6, IL-12p70, fator de necrose tumoral (TNF), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e a citocina anti-inflamatória IL-10 (MENEZES *et al.*, 2012).

O aumento de citocinas inflamatórias e EROs e a diminuição dos mecanismos de defesa antioxidante podem ocasionar danos celulares e/ou em macromoléculas através de reações químicas em cadeia, tais como a oxidação de proteínas, lipídios e DNA (RODRIGUES *et al.*, 2013).

### 1.3. ENVELHECIMENTO E CÉLULAS-TRONCO

O envelhecimento é um processo biológico, universal, dinâmico e progressivo, no qual ocorrem modificações morfológicas, funcionais e bioquímicas que reduzem a capacidade de adaptação do indivíduo ao meio ambiente, afetando sua integridade e permitindo o surgimento das doenças crônicas, com impacto sobre a saúde e a qualidade de vida (SILVA & FERRARI, 2011).

Diversas doenças estão associadas ao envelhecimento como diabetes mellitus, hipertensão, doenças neurodegenerativas, câncer, nefropatias. De maneira geral, o aumento de EROs e o ambiente inflamatório levam a lesões celulares em diversos tecidos. No entanto, pouco se sabe sobre as alterações celulares e moleculares em células de medula óssea.

#### 1.3.1. CÉLULAS-TRONCO

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

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

1. Deve se automultiplicar por meio de divisões celulares subseqüentes, um pré-requisito para sustentar uma determinada população celular.
2. As células-filhas derivadas de uma única célula-tronco devem se diferenciar em mais de um tipo celular.
3. Devem contribuir para a diferenciação da progênie *in vivo* mesmo na ausência de lesão tecidual (ZAGO & COVAS, 2006).

Apesar da grande diversidade celular encontrada em tecidos adultos, todas derivam de uma única célula-ovo, após a fecundação do óvulo pelo espermatozóide. Essa célula possui a capacidade de formar todos os tecidos do indivíduo adulto. A célula-ovo sofre mitose e forma várias outras células que progressivamente se tornam mais especializadas, restringindo sua capacidade de diferenciação.

Entretanto, no adulto existem reservas de células indiferenciadas, as células-tronco (ZAGO & COVAS, 2006).

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

As células-tronco são classificadas quanto a potencialidade, que significa a sua capacidade de gerar tipos celulares, em totipotentes (células que podem se diferenciar em qualquer tecido do organismo humano, correspondem às células das primeiras divisões celulares, após fecundação), pluripotentes (células que conseguem se diferenciar em quase todos os tecidos humanos, exceto anexos placentários) e multipotentes (células capazes de se diferenciar em muitos tipos celulares).

As células-tronco também podem ser classificadas quanto a origem em embrionárias e adultas. A célula-tronco embrionária é a célula pluripotente, capaz de originar todos os tecidos de um indivíduo adulto. É aquela da massa interna do blastocisto de um embrião nos primeiros estágios de divisão. A célula-tronco adulta é a célula obtida de tecidos após a fase embrionária. É uma célula indiferenciada que está presente em tecidos especializados. Possuem a característica de auto-renovação, originando cópias idênticas. Essas células conseguem se dividir em células progenitoras e posteriormente se diferenciar em células maduras especializadas.

Podem ser encontradas na medula óssea, sangue, córnea, retina, cérebro, pâncreas, entre outros. Não está claramente elucidado as vantagens do uso terapêutico de um tipo celular em detrimento do outro (NIH, 2001).

### 1.3.2. CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

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

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

As células-tronco mesenquimais parecem ser importantes na terapia de doenças cardiovasculares. O interesse nesse tipo celular está relacionado com uma propriedade importante dessas células: quando infundidas por via intravenosa, são capazes de migrar especificamente para locais de injúria. Esta característica de procurar o local da lesão foi demonstrada em estudos de fratura óssea, infarto do miocárdio, injúria cerebral isquêmica (BARRY & MURPHY, 2004).

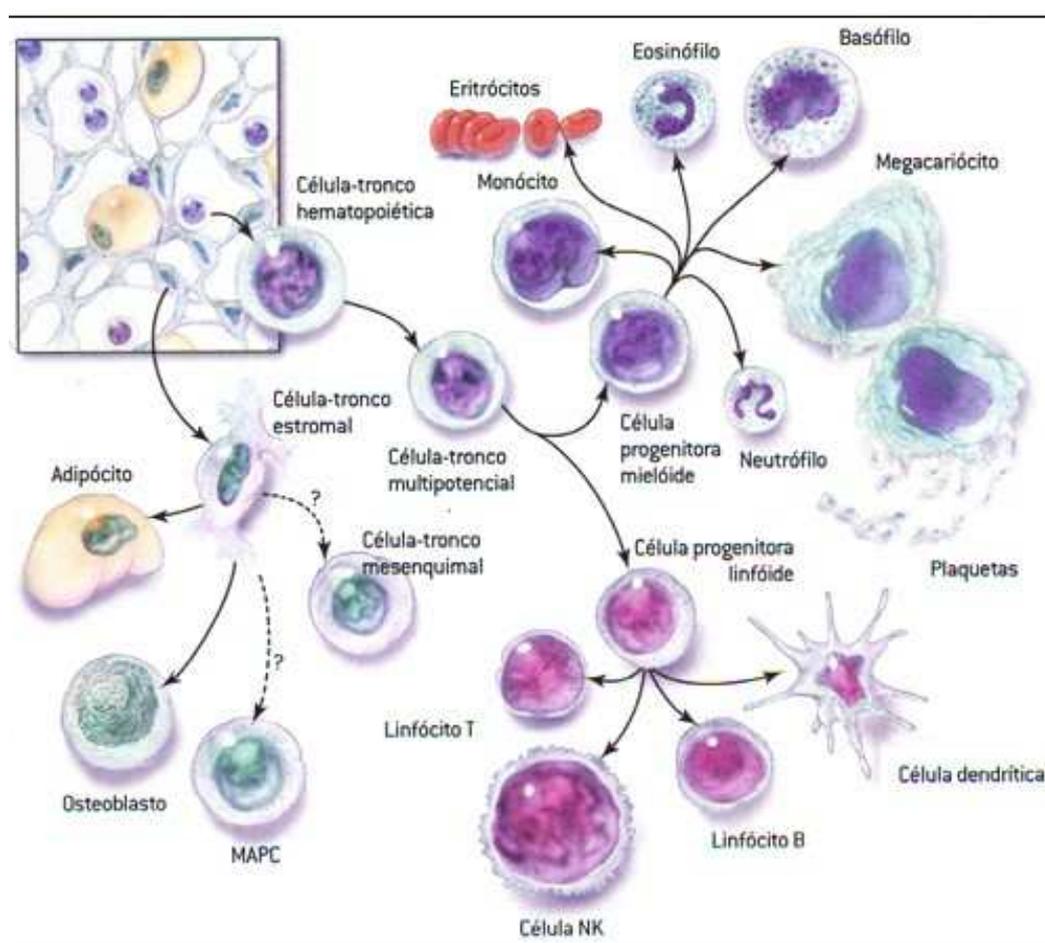
Com o envelhecimento é comum observar redução no conteúdo estromal da medula óssea, sendo substituído por tecido gorduroso, levando a redução de células-tronco mesenquimais. Essas alterações celulares modificam também o conteúdo hematopoiético (ROSSI *et al.*, 2007)

### 1.3.3. CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS

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

É uma população de células multipotentes muito rara, correspondendo a aproximadamente 0,05% a 0,5% do total de células da medula óssea e essa fração é ainda menor no sangue periférico. Em um indivíduo normal, a quantidade de

células maduras no sangue é mantida dentro de limites estreitos e, em resposta a emergências como hemorragias ou infecções, a hematopoese é acelerada a fim de compensar a perda. São produzidos bilhões de novas células sanguíneas por dia em adultos devido ao curto período de vida dessas células (ZAGO & COVAS, 2006). É possível observar as frações hematopoiéticas e mesenquimais, e suas respectivas linhagens celulares, na figura 4.



**Figura 4 - Esquema de células-tronco hematopoiéticas e mesenquimais.** No canto superior esquerdo, o quadrado ilustra as populações celulares da medula óssea. Células-tronco hematopoiéticas e mesenquimais acompanhadas de suas linhagens celulares. Modificado de Revista *Scientific American Brasil*, 2006.

#### 1.4. DESFECHOS CELULARES

As células-tronco são importantes para a manutenção de tecidos e órgãos e são capazes de substituir as células danificadas e promover auto-renovação (CHIN *et al.*, 2012). No entanto, o sistema hematopoiético pode se alterar com o

envelhecimento (TIE *et al.*, 2014). Estudos recentes têm sugerido que a capacidade de regeneração das células-tronco de células e tecidos é gradualmente perdida com o envelhecimento. No entanto, ainda não se sabe exatamente como o envelhecimento pode levar a alterações bioquímicas e celulares que podem lesar tecidos, órgãos e sistemas.

#### **1.4.1. APOPTOSE**

A morte celular é essencial para o desenvolvimento embrionário e para manutenção da homeostase tecidual em organismos multicelulares. Injúrias reversíveis ou irreversíveis podem desencadear a morte celular de formas diferentes. Autofagia, necrose e apoptose distinguem-se molecular, bioquímica e morfológicamente, dependendo da duração ou da intensidade do estresse ao qual a célula é submetida (SCHWEICHEL & MERKER, 1973; KUWANA & NEWMAYER, 2003)

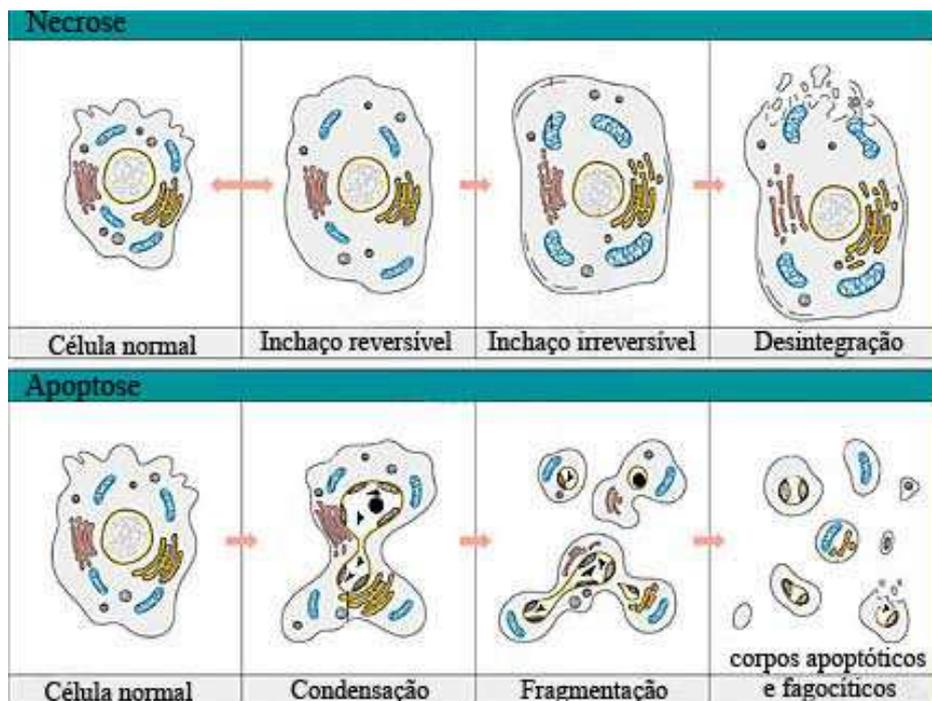
Durante muito tempo, a morte celular foi considerada um processo passivo de caráter degenerativo, que ocorre em situações de lesão celular, infecção e ausência de fatores de crescimento. Como consequência, a célula altera a integridade da membrana plasmática, aumenta o seu volume e perde as suas funções metabólicas. Entretanto, nem todos os eventos de morte celular são processos passivos. Organismos multicelulares são capazes de induzir a morte celular programada como resposta a estímulos intracelulares ou extracelulares (YU *et al.*, 2000; HENGARTNER *et al.*, 2000; GRIVICICH *et al.*, 2007).

De um modo geral, a apoptose é um fenômeno bastante rápido, no qual ocorre uma retração da célula que causa perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas. As organelas celulares mantêm a sua morfologia, com exceção, em alguns casos, das mitocôndrias, que podem apresentar ruptura da membrana externa. A cromatina sofre condensação e se concentra junto à membrana nuclear, que se mantém intacta. A seguir, a membrana celular forma prolongamentos e o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos pela membrana nuclear. Os prolongamentos da membrana celular aumentam de número e tamanho e rompem, originando estruturas que contém o conteúdo celular. Estas porções

celulares envoltas pela membrana celular são denominadas corpos apoptóticos. Os corpos apoptóticos são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos sem causar um processo inflamatório. Outra característica muito marcante da morte por apoptose é a fragmentação internucleossômica do DNA, a qual possui um padrão característico (SARASTE *et al.*, 2000; GRIVICICH *et al.*, 2007).

Outro processo de morte celular, que é importante ser diferenciado é a autofagia. A autofagia é um processo comum em células de mamíferos, que ocorre em situações de estresse metabólico, como falta de nutrientes, e resulta na degradação de componentes celulares (DANIAL & KORSMEYER, 2004; KELEKAR, 2005; KROEMER & JAATTELA, 2005; LUM *et al.*, 2005).

Necrose é uma palavra de origem grega que quer dizer estado de morte e é o resultado de injúria celular irreversível. A necrose é caracterizada morfológicamente pelo aumento do volume celular, vacuolização da cromatina, desorganização do citoplasma, degradação da membrana plasmática, com consequente ruptura celular, e indução de reação inflamatória local (SCHWEICHEL & MERKER, 1973; VANNUCCI & HAGBERG, 2004; VANDENABEELE *et al.*, 2008; PUYAL *et al.*, 2009). Portanto, a necrose é definida como um processo agressivo de morte celular iniciada por estímulos patológicos que resultam em rápido desequilíbrio da homeostase e que tem como característica afetar várias células ao mesmo tempo, uma vez que os agentes causadores atingem grandes áreas do tecido.



**Figura 5 - Principais alterações observadas em células necróticas e apoptóticas.** Fonte: <http://www.virtual.unifesp.br/unifesp/bio40/apoptose/>

A apoptose desempenha um importante papel no desenvolvimento e na homeostasia tecidual, pois durante o desenvolvimento, muitas células são produzidas em excesso e eventualmente ocorre morte celular programada contribuindo para manutenção do organismo. No contexto fisiológico, a apoptose é regulada e balanceada. Quando ocorrem falhas neste equilíbrio, condições patológicas tais como defeitos de desenvolvimento, doenças autoimunes, neurodegeneração ou câncer são observadas. Além de seu papel na homeostasia, a morte celular programada também pode ser desencadeada por vários determinantes, tais como radiação gama ou ultravioleta, privação de fatores de crescimento, quimioterápicos ou sinalização por receptores de morte (ASHKENAZI & DIXIT, 1998; JIN & EL-DEIRY, 2005).

As alterações morfológicas observadas em células apoptóticas são conseqüência de uma combinação de eventos moleculares e bioquímicos, executados por uma família de proteases zimogênicas, conhecidas como caspases (cysteine-dependent aspartate-specific proteases) (HENGARTNER, 2000), que degradam a célula de forma ordenada pela clivagem de substratos celulares (MARTIN & GREEN, 1995; BLANK & SHILOH, 2007), levando à externalização de

fosfolípídeos de membrana que sinalizam para que fagócitos eliminem a célula (TAYLOR *et al.*, 2008). Além das caspases, as proteínas da família Bcl-2 participam ativamente da regulação da morte celular por apoptose, uma vez que são proteínas pró (Bax e Bak) e anti-apoptóticas (Bcl-2 e Bcl-XL) (HENGARTNER, 2000; BORNER, 2003), e se houver desequilíbrio na expressão destas proteínas, o mecanismo de apoptose é iniciado (PETROS *et al.*, 2004).

O processo de apoptose pode ser deflagrado em células eucarióticas por duas vias distintas: intrínseca ou mitocondrial e extrínseca ou citoplasmática. A via extrínseca é ativada por estímulos extracelulares de estresse e caracteriza-se pela ligação de ligantes a receptores específicos na superfície celular, conhecidos como “receptores de morte”, ativando a cascata de caspases (BUDIARDJO *et al.*, 1999). Os receptores de morte (rTNF: tumor necrosis factor e Fas: CD95/Apo-1) possuem domínios citoplasmáticos, responsáveis pela formação do complexo sinalizador e indutor de morte (NEUMANN *et al.*, 2010). Os ligantes destes receptores atuam como ativadores extracelulares de apoptose. Quando os receptores de morte reconhecem um ligante específico (TNF e Fas-L), seus domínios de morte interagem com proteínas recrutam caspases, levando à morte celular (DANIEL *et al.*, 2001; HASSAN *et al.*, 2009).

A via intrínseca de apoptose inicia-se na mitocôndria e é ativada por estresses intra ou extracelulares (HENGARTNER, 2000), que geram sinais responsáveis por deflagrar o processo apoptótico. Quando estes sinais alcançam a mitocôndria, induzem o aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial, assim como o colapso do potencial da membrana mitocondrial interna e, simultaneamente, a passagem de água para a matriz mitocondrial, levando à ruptura da organela (LOEFFLER & KREMER, 2000; WANG, 2001; GUPTA, 2003). Estes eventos levam ao vazamento de proteínas, como o citocromo c, para o citoplasma e, conseqüentemente, à diminuição da produção de ATP e ao aumento de ROS (KROEMER & REED, 2000; KROEMER *et al.*, 2007).

O envelhecimento promove aumento de estresse oxidativo e inflamação, o que pode acarretar em ataque às biomoléculas. Muitas vezes, mecanismos de reparo são ativados e induzem apoptose e senescência celular.

### 1.4.2. SENESCÊNCIA

A senescência celular é um fenômeno de resposta ao estresse que culmina com uma perda da capacidade replicativa de células somáticas humanas seja *in vitro* (HAYFLICK, 1965; MINAMINO *et al.*, 2002) ou *in vivo* (FENTON *et al.*, 2001). A partir desse estágio, passam a apresentar um prejuízo homeostático, exibindo morfologia, função e expressão gênica diferentes, incluindo transcrição de reguladores negativos do ciclo celular como as proteínas repressoras (p53 e p16) e encurtamento dos telômeros (FENTON *et al.*, 2001; ERUSALIMSKY & KURZ, 2005; MINAMINO & KOMURO, 2007).

Quando células de tecidos normais de mamíferos são cultivadas em condições padronizadas, elas comumente podem ser expandidas por somente um número limitado de ciclos de divisão – cerca de 50 vezes para células típicas derivadas de humanos. Logo após, as células param de se dividir até que finalmente morrem – este processo é denominado de senescência celular (ALBERTS, 2002). Por exemplo, fibroblastos retirados de um feto humano sofrem cerca de 50 duplicações quando cultivadas em um meio de cultura padrão. No final deste período, a proliferação diminui e finalmente para, logo as células entram na fase G0 do ciclo celular e daí nunca saem. Células semelhantes retiradas de um indivíduo de 40 anos de idade param de se dividir após 40 duplicações aproximadamente, enquanto células de uma pessoa de 80 anos cessam após 30 duplicações (ALBERTS, 2002). Este processo natural é denominado senescência celular.

O envelhecimento é um processo complexo e a identificação dos mecanismos que governam o envelhecimento de populações celulares requer que estas possam ser isoladas e caracterizadas com relativa homogeneidade.

A maioria das células adultas sofre no máximo 50 a 60 divisões antes de se tornar senescente. Essa limitada capacidade replicativa é conhecida como o “limite de Hayflick”, termo utilizado por Leonardo Hayflick (1965) para descrever o processo resultante do progressivo encurtamento dos telômeros (HAYFLICK, 1965).

Como esperado, os telômeros de CTM derivadas de doadores jovens são maiores que os de doadores velhos (BAXTER *et al.* 2004, GUILLOT *et al.* 2007, MARESCHI *et al.* 2006).

Além do encurtamento dos telômeros, outros fatores como a inativação da expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular, estão implicados na indução da senescência (ROOBROUCK *et al.* 2008).

Estudos mostraram que células musculares lisas, endoteliais, macrófagos e células da circulação de pacientes idosos com DCNT apresentam, além de encurtamento dos telômeros, aumento da fragmentação de DNA, quando comparados com pacientes mais jovens. Eventualmente o aumento da fragmentação de DNA leva a senescência e apoptose celular (BOTTO *et al.*, 2001; MARTINET *et al.*, 2002; MAHMOUDI *et al.*, 2008).

#### **1.4.3. PLASTICIDADE CELULAR E AUTO-RENOVAÇÃO**

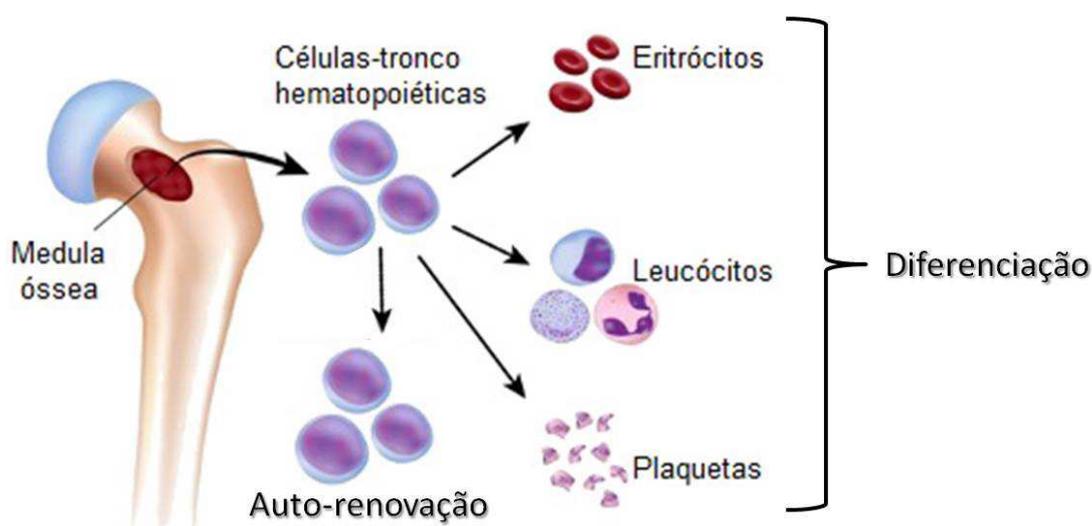
A medula óssea (MO) é a principal fonte de células-tronco utilizadas até o momento. Porém, o procedimento de obtenção dessas células é invasivo, e o número e o potencial de diferenciação e proliferação diminuem com a idade (STENDERUP *et al.*, 2003).

O potencial proliferativo de uma célula é inversamente proporcional ao nível de especialização da mesma (DAN *et al.*, 2008). Espera-se, portanto, que células com fenótipo indiferenciado possuam alta capacidade de expansão. Até o momento não foi identificado nenhum marcador específico que identifique as células-tronco (PITTINGER *et al.*, 1999; ALSALAMEH *et al.*, 2004). Já foi demonstrado que a expressão de antígenos pode mudar com o cultivo *in vitro* (FIBBE, 2003) e que pode haver variação na expressão de acordo com o tipo de tecido em que foi extraída a célula (GRONTHOS *et al.*, 2001).

A expressão de fatores de transcrição, como Oct-4, Nanog e Sox-2 responsáveis pela manutenção do estado pluripotente e de auto-renovação de células-tronco embrionárias (NIWA *et al.*, 2000) também pode ser investigada nas culturas de células-tronco adultas. Já foi demonstrado na literatura a expressão dos marcadores de células-tronco embrionárias em célula-tronco adulta proveniente da polpa dentária (KERKIS *et al.*, 2006) e da membrana placentária (MIKI *et al.*, 2005).

A célula-tronco adulta é uma célula indiferenciada encontrada em um tecido diferenciado do organismo. Elas são responsáveis pela auto-renovação e homeostase do seu tecido de origem ao longo da vida (MINGUELL *et al.*, 2001).

As células-tronco adultas mais estudadas são as células-tronco da medula óssea. A medula óssea humana, derivada do mesoderma embrionário, é um tecido complexo formado por uma população de células-tronco hematopoiéticas, tendo como suporte o estroma mesenquimal. O estroma da medula óssea possui uma composição heterogênea, sendo reservatório de várias populações de células-tronco, entre elas as células-tronco mesenquimais e as células-tronco progenitoras multipotentes adultas (JIANG *et al.*, 2002).



**Figura 6 – Auto-renovação e diferenciação das células-tronco hematopoiéticas.** Na auto-renovação, as células fazem divisão simétrica e originam células filhas idênticas às células-mães. Na diferenciação, a célula origina um outro tipo celular mais especializado.

Oct-4, Nanog e Sox-2 são reguladores centrais responsáveis pela manutenção do estado de pluripotencialidade e de auto-renovação de células-tronco embrionárias humanas e de camundongos (RODDA *et al.*, 2005). A proteína Oct-4 (Octamer-binding transcription factor 4) é um fator de transcrição presente na massa interna do blastocisto e epiplasto. De acordo com o nível de Oct-4, a célula permanece em estado indiferenciado ou se diferencia em outro tecido. A perda da expressão dessa proteína indica que a célula entrou no processo de diferenciação (NIWA *et al.* 2000; LEE *et al.*, 2006). A superexpressão de Nanog permite que as células-tronco de camundongo se mantenham pluripotentes (MITSUI *et al.*, 2003). O Sox-2 é um fator de transcrição regulatório expresso durante o desenvolvimento primário em vários tecidos, sendo expresso também nas células-tronco embrionárias (AVILION *et al.*, 2003). Há evidências de que estes fatores trabalham de forma coordenada na regulação da expressão de vários genes (BOYER *et al.*, 2005).

Vários estudos da literatura relatam a expressão de fatores de transcrição relacionados à pluripotência em células-tronco adultas, dentre eles o Rex-1, o FGF-4, o Nanog, o Oct-4 e o SOX-2 (ZHU *et al.*, 2008; KERMANI *et al.*, 2008; SHOCKLEY *et al.*, 2007). Observou-se, em células-tronco mesenquimais proveniente da polpa dentária, a expressão dos marcadores de células-tronco embrionárias Oct-4, Nanog, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 e TRA-1-81 por mais de 25 passagens (KERKIS *et al.*, 2006). Porém, até o momento não foi definido um conjunto de fatores de transcrição característicos das células-tronco adultas e não se sabe se essa expressão está relacionada à fonte de obtenção, a idade do doador e as condições de cultivo das células.

## 2. JUSTIFICATIVA

As células-tronco são importantes para a manutenção de tecidos e órgãos e têm a capacidade de auto-renovação e de substituir células danificadas (INSINGA *et al.*, 2014). No entanto, este sistema hematopoiético pode se alterar com o envelhecimento (VAN ZANT *et al.*, 2012). Alguns estudos mostraram que o potencial plástico e a manutenção do *turnover* é gradualmente perdida com o envelhecimento (DUMBLE *et al.*, 2007).

Sabe-se que CTHs provenientes de camundongos idosos possuem menor eficácia terapêutica (LIANG *et al.*, 2005; XING *et al.*, 2006; RAUSCHER *et al.*, 2003). Embora alguns pesquisadores têm destacado o impacto do envelhecimento nas CTHs, os mecanismos moleculares que medeiam a biologia do envelhecimento ainda não estão totalmente elucidados. Em estudos clínicos e experimentais, observa-se alteração de muitos genes envolvidos com a integridade genômica e transcricional em função dos altos níveis de EROs (CHAMBERS *et al.*, 2007; ROSSI *et al.*, 2007).

Acredita-se que níveis baixos de EROs estejam relacionados a quiescência das CTHs, e níveis elevados com o aumento de proliferação, senescência e apoptose, contribuindo para exaustão do sistema hematopoiético (JANG *et al.*, 2007; TONINI *et al.*, 2013). Embora as contribuições relativas de diferentes vias de produção de ROS ainda são pouco conhecidas, o estresse oxidativo deve ser considerado uma importante causa de disfunção da medula óssea durante o processo de envelhecimento.

Portanto, nosso estudo visa avaliar os efeitos do envelhecimento sobre a funcionalidade de células-tronco hematopoiéticas de camundongos.

# OBJETIVOS

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

- Avaliar os efeitos do envelhecimento sobre a funcionalidade de células-tronco hematopoiéticas derivadas de medula óssea de camundongos C57/BL6.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

No sangue periférico/plasma de animais experimentais:

- Avaliar a contagem global de hemácias e leucócitos;
- Avaliar a contagem diferencial de leucócitos;
- Medir citocinas inflamatórias;

Em células-tronco hematopoiéticas:

- Avaliar os níveis citoplasmáticos de espécies reativas de oxigênio;
- Medir citocinas inflamatórias no ambiente medular;
- Investigar a participação das vias anti e pró-oxidantes no estresse oxidativo;
- Avaliar o ciclo celular e determinar o conteúdo de DNA;
- Avaliar o dano ao DNA;
- Verificar a viabilidade, senescência e apoptose celular;
- Analisar o potencial plástico e de auto-renovação;

# METODOLOGIA

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) machos C57BL/6 (C57) de 2, 12 e 24 meses de idade, provenientes do biotério do Laboratório de Fisiologia Translacional, pertencente ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), isogênicos, logo filhos de casais irmãos, com baixa variabilidade genética.



Figura 7 – Camundongos C57BL/6.

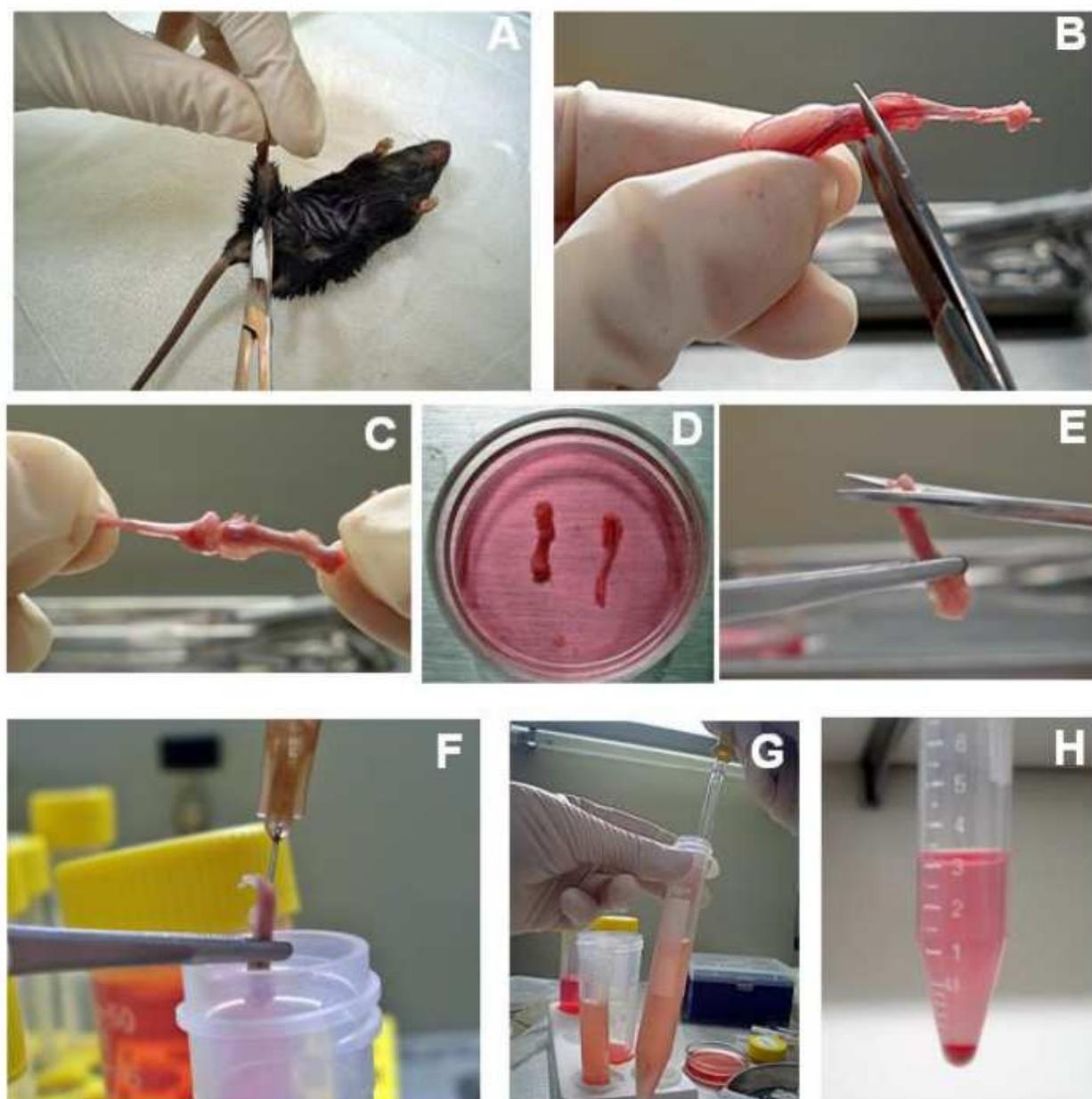
Os animais foram mantidos no biotério em gaiolas individuais colocadas em estantes ventiladas onde receberam água e ração ad libitum e tiveram controlado o ciclo de 12 horas claro/escuro, bem como a temperatura ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e a umidade (70%) do ambiente. Os aspectos éticos, a utilização e o manuseio experimental dos animais estavam de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) e a American Physiological Society (APS). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória (CEUA-EMESCAM #014/2011).

### 4.2. COLETA DE SANGUE PERIFÉRICO E ISOLAMENTO DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS DE MEDULA ÓSSEA

Os animais foram eutanasiados com injeção intraperitoneal de tiopental sódico (100mg/kg). Todo o material foi previamente autoclavado para evitar a contaminação das células. A coleta de sangue foi realizada através da punção cardíaca do ventrículo direito para a realização do hemograma e dosagem de citocinas. O animal foi totalmente higienizado com álcool 70% e levado para capela de fluxo laminar onde foi realizado o isolamento de células da medula óssea.

Foi realizada a assepsia, os fêmures e as tíbias (Figura 8A-B) dos animais foram removidos, assim como o excesso de músculo e tecido conjuntivo ao redor dos ossos (Figura 8C). As epífises foram cortadas (Figura 8E) para exposição do canal medular. Para remoção da medula óssea, uma agulha de 26-gauge acoplada a uma seringa plástica de 1 mL foi inserida na cavidade medular para retirada da medula óssea através de flush (Figura 8F) utilizando meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Sigma). A suspensão de medula óssea foi homogeneizada (Figura 8G) e centrifugada a 1200 rpm por 10 minutos (Eppendorf: Centrifuge 5702). O sobrenadante foi desprezado, as células ressuspendidas em DMEM (Figura 8H).

As células foram colocadas em incubadora (Sanyo) à temperatura e CO<sub>2</sub> controlados, 37°C e 5%, respectivamente. As células foram colocadas em cultura em um poço de uma placa de 6 poços (Figura 9) por três dias com meio de cultura DMEM suplementados com 20% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina – Gibco). Após esse período, a fração que contém células-tronco hematopoiéticas fica em suspensão e pode ser coletada por aspiração, enquanto células-tronco mesenquimais possuem a característica de se aderirem ao plástico. Uma alíquota foi separada para contagem em câmara de Neubauer.



**Figura 8 – Obtenção de células-tronco hematopoiéticas.** Isolamento de células da medula óssea de camundongos: retirada do fêmur e da tíbia (A-C), ossos isolados em meio de cultura (D), corte das epífises (E), flush para remover a medula óssea (F), homogeneização e centrifugação do lavado da medula (G-H).

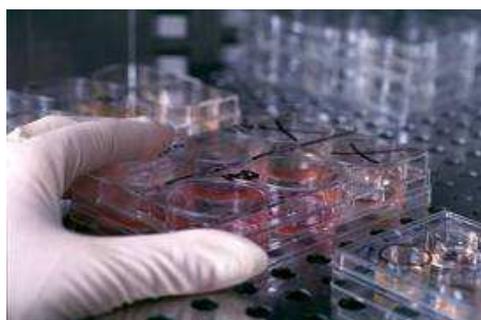


Figura 9 – Suspensão de células da medula óssea em placa de cultura.

### 4.3. QUANTIFICAÇÃO EM CÂMARA DE NEUBAUER

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

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

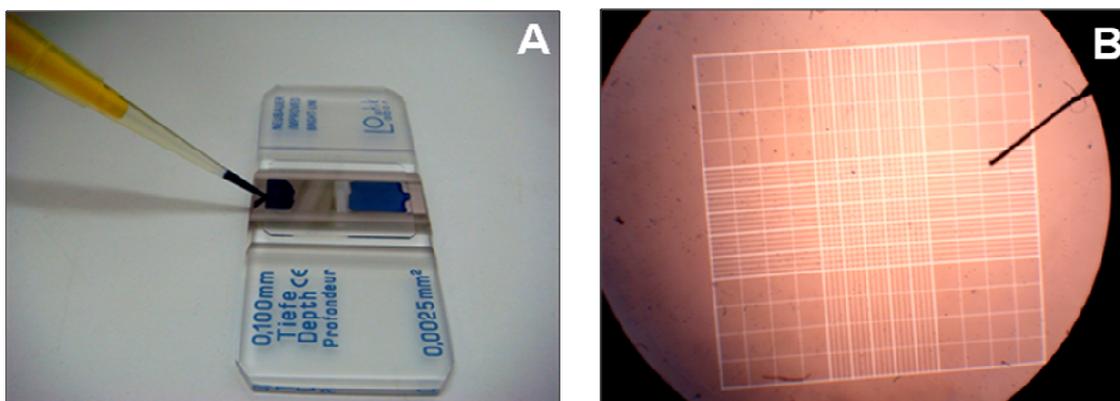


Figura 10 – Câmara de Neubauer (A). Visualização do retículo de contagem com os quadrantes (B).

Cálculo para a contagem das células:

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

4

### 4.4. ENRIQUECIMENTO DA FRAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS

A suspensão de células ( $1-2 \times 10^7$  céls/mL) passou por um processo de imunodepleção magnética a fim de enriquecer as CTHs da amostra. Esse processo consiste em marcar células diferenciadas com diferentes anticorpos: CD3 $\epsilon$  (CD3  $\epsilon$  chain), CD11b (Integrin  $\alpha$ M chain), CD45R/B220, Ly-6G and Ly-6C (Gr-1), and TER-119/Erythroid Cells (Ly-76) para excluí-las da amostra de interesse. O kit utilizado foi o Mouse Hematopoietic Stem Cell Enrichment Set (BD). Basicamente, a suspensão de células foi marcada com 25 $\mu$ L do coquetel de anticorpos (Lin) descrito acima por 15 minutos, lavada e posteriormente marcada com “beads” (esferas) magnéticas por 30 minutos à temperatura de 6°C. Essa suspensão era colocada em coluna magnética e a fração Lin<sup>+</sup> era atraída, portanto as células de interesse (CTHs não marcadas), fração Lin<sup>-</sup>, eram coletadas facilmente para posterior análise (FRASCOLI *et al.*, 2012).

#### 4.5. IMUNOFENOTIPAGEM

Após a imunodepleção magnética, foi retirada uma alíquota para identificação e confirmação de CTHs por análise imunofenotípica para identificação de antígenos específicos expressos na superfície celular. Para isso foram utilizados os anticorpos contra Sca-1(BD), CD133 (eBioscience, San Diego, CA, USA), c-kit (BD), Thy-1<sup>lo</sup> (BD) associados a diferentes fluorocromos e seus respectivos controles de isotipo. As células foram incubadas com 5 $\mu$ L de anticorpo marcador ou anticorpo controle no escuro por 30 minutos à temperatura de 4°C. Decorrido este tempo, as células foram lavadas em PBS para remover o excesso de anticorpo e, por fim, foi feita a aquisição de 10.000 – 50.000 eventos no citômetro de fluxo (FACSCanto II Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Diego, CA, USA – Figura 11A) acoplado a um computador.

Os dados adquiridos foram analisados pelos softwares BDFACSDiva (BD – Figura 11B) e FCSEXPRESS (De Novo Software, Los Angeles, CA, USA – Figura 11C). No citômetro de fluxo, as células são analisadas de acordo com suas propriedades físicas e químicas como tamanho e complexidade interna ou granulosidade, e intensidade de fluorescência que é proporcional à quantidade de marcação pela sonda fluorescente utilizada (DADHECC *et al.*, 2013).

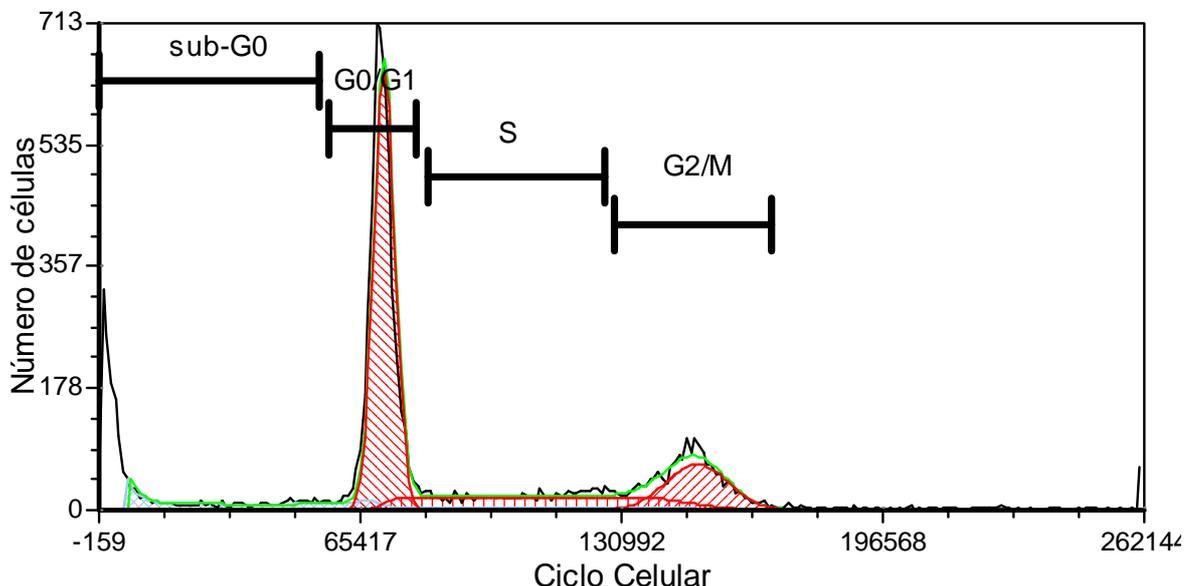


Figura 11 – A) Citômetro de fluxo FACSCanto II (BD) e *layout* dos softwares utilizados na análise dos dados FACSDiva (B) e FCS Express 4 Plus (C).

#### 4.6. ANÁLISE DO CICLO CELULAR

Através deste protocolo foi determinado o conteúdo de DNA das células pela coloração com iodeto de propídeo (PI) por citometria de fluxo. O PI é um agente intercalante fluorescente de DNA que quando a membrana celular é permeabilizada é capaz de penetrar na célula e corando o DNA. Desta forma, a fluorescência emitida pelo PI é proporcional à quantidade de DNA das células. Inicialmente,  $1 \times 10^6$  CTHs foram ressuspensas e fixadas em 1mL de etanol 70% por 2 horas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . As células foram lavadas, ressuspensas em 1mL de PBS gelado e incubadas com 200 $\mu\text{L}$  de solução de coloração (200 $\mu\text{L}$  de RNase A (20mg/mL), 800 $\mu\text{L}$  de PI (500 $\mu\text{g/mL}$ ), 20 $\mu\text{L}$  de Triton X-100, Q.s.p. 20mL de PBS1x) por 30 minutos, no escuro, a  $4^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, as células foram centrifugadas a 1200rpm por 10 minutos e ressuspensas em 200 $\mu\text{L}$  de PBS e a fluorescência emitida pelo PI medida no citômetro de fluxo. A taxa de aquisição foi de 200 células / segundos para que fosse possível diferenciar singlets e doublets. Além disso, foi feito um citograma da fluorescência de PI versus FSC (FSC vs. PI) para excluir debris. A análise dos dados foi realizada utilizando o software FACSDiva. Os histogramas da fluorescência emitida foram analisados para detectar a presença de DNA fragmentado (região sub-G0/G1), DNA normal (diploide – região G0/G1, antes da

síntese de DNA), DNA em processo de duplicação (região S) e DNA duplicado (poliplóide – região G2/M) (Figura 12) (CAMPAGNARO *et al.*, 2013).



**Figura 12 – Análise do conteúdo de DNA pela marcação com iodeto de propídeo.** Histograma típico representativo do ciclo celular avaliado por citometria de fluxo com o uso de PI.

#### 4.7. DOSAGEM DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS

As citocinas IL-6, IL-12p70, IL-10, TNF e IFN- $\gamma$  foram medidas pelo kit CBA (Cytometryc Bead Array - Mouse Inflammation Kit) da BD Biosciences. O princípio do método de dosagem com o kit CBA consiste na ligação de anticorpos com as citocinas de interesse. O kit oferece cinco grupos de microesferas, apresentando intensidades de fluorescência diferentes, revestidas com anticorpos específicos para cada tipo de citocina, denominadas “esferas de captura”. Para as dosagens, as esferas de captura específicas para cada citocina, foram agrupadas e posteriormente misturadas com 25  $\mu$ L de cada amostra a fim de permitir a ligação das esferas de captura com as possíveis citocinas presentes na amostra. Em seguida, foram adicionados a essa mistura anticorpos monoclonais anti-citocinas de camundongos, conjugados com o fluorocromo ficoeritrina (PE). Após esta etapa (de marcação), a fluorescência de um total de 5000 microesferas por amostra foi lida em citômetro de fluxo FACSCanto II (BD), com base em gráficos de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC). As populações das microesferas foram detectadas de

acordo com suas respectivas intensidades de fluorescência, se distribuindo ao longo de eixo Y (detector de fluorescência 4, PE, o qual capta luz no comprimento de onda ~650 nm, correspondente a cor vermelha). O mesmo procedimento foi realizado previamente para a construção de uma curva padrão com concentrações de 20 a 5000 pg/ml, e empregada para determinar as concentrações de cada citocina na amostra em análise (Menezes TN 2012).

#### 4.8. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS CITOPLASMÁTICOS DE EROS

Os níveis citoplasmáticos de anions superóxido, peróxido de hidrogênio, óxido nítrico e peroxinitrito/hidroxila foram analisados nas amostras de CTHs através da mediana de intensidade de fluorescência emitida pelos marcadores dihidroetídeo (DHE), 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA), 4,5-diaminofluoresceína-2/diacetato (DAF) e hidroxifenilfluoresceína (HPF), respectivamente.

Dihidroetídeo (DHE) e 2',7'- diacetato de dicloro fluoresceína (DCF-DA) foram usados para determinar os níveis intracelulares de ânions superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), respectivamente. Os níveis de  $\bullet\text{O}_2^-$  foram medidos através da fluorescência emitida pelo etídeo, que é produto da oxidação do dihidroetídeo ou hidroetidina. O DHE, forma reduzida do brometo de etídeo, entra livremente na célula e reage rapidamente com o  $\bullet\text{O}_2^-$  formando etídeo. Quando o DHE é oxidado à etídeo e se liga ao DNA, causa a amplificação da fluorescência vermelha. A produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi estimado através da fluorescência emitida pela diclorofluoresceína (DCF) que é um produto da oxidação do 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) um estér, não fluorescente, internalizado pelas células e que se incorpora às regiões hidrofóbicas. Após entrar na célula sofre ação de esterases intracelulares, resultando na formação de um composto intermediário (DCFH), que pode ser oxidado pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$  formando um composto fluorescente diclorofluoresceína (DCF), que por ser apolar fica aprisionado no interior da célula. (CAMPAGNARO *et al.*, 2013; TONINI *et al.*, 2013).

As CTHs foram ressuspendidas em 1 mL de PBS na concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL e incubadas, no escuro, com DHE (160  $\mu\text{M}$ ) and DCF-DA (20 mM), por

30 minutos à 37°C. Para controle positivo, as amostras foram incubadas por 5 minutos com 10 µM doxorrubicina ou 50 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As células então foram lavadas e ressuspensas com PBS e mantidas no gelo e protegidas da luz até a aquisição dos dados no citômetro de fluxo.

Para detecção e estimativa da biodisponibilidade do NO foi usado a substância diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2D, 2mM), que na presença de NO, emite fluorescência de cor verde, cuja intensidade é proporcional à biodisponibilidade intracelular de NO. Então, este corante foi adicionado à suspensão de CTHs e incubado a 37°C por 180 minutos no escuro. Para controle positivo, as amostras foram incubadas com 10 µM de nitroprussiato de sódio (DIAS *et al.*, 2014).

As espécies altamente reativas ( $\bullet\text{ONOO}^-/\bullet\text{OH}^-$ ) foram medidas pelo corante HPF (5µM) por 30 minutos a 37°C no escuro. Para controle positivo, as amostras foram incubadas com 10 µM de nitroprussiato de sódio e 10 µM doxorrubicina (STESUKINAI *et al.*, 2003). Após marcação, as células foram lavadas, centrifugadas e ressuspensas em PBS para posterior aquisição no citômetro de fluxo. Imagens típicas também foram realizadas pelo microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse Ti, Melville, NY, USA).

Para quantificação das fluorescências emitidas pelo DHE, DCF, DAF e HPF, as amostras de células foram excitadas a 488nm e os sinais foram obtidos utilizando filtros 585/42 para DHE e 530/30 para DCF, DAF e HPF.

#### **4.9. AVALIAÇÃO DAS VIAS PRÓ E ANTI-OXIDANTES**

Para avaliar a contribuição das principais vias oxidantes para o desenvolvimento e manutenção dos altos níveis de EROs, foram realizados bloqueios específicos de vias envolvidas na produção de EROs. Da mesma forma, três principais enzimas antioxidantes foram avaliadas, com o objetivo de verificar o balanço entre a síntese e a remoção de EROs. Para determinar a contribuição de cada via nas CTHs, foram utilizados os seguintes bloqueios: apocinina na concentração de 600µM por 10

minutos para avaliar a influência da NAD(P)H oxidase; CCCP 1 $\mu$ M por 45 minutos para avaliação mitocondrial, clotrimazol 100 $\mu$ M por 10 minutos para avaliação da CYP450 e alopurinol 100 $\mu$ M por 10 minutos para avaliação da participação da xantina oxidase na produção de ROS (MCNALLY *et al.*, 2003; DE SOUZA PINTO *et al.*, 2012) Para avaliação da capacidade antioxidante, a SOD foi inibida com a droga DDC a 500 $\mu$ M por 16 horas, a catalase foi bloqueada 2 horas com 20mM de 3-AT e a GPx foi inibida com ácido mercaptossuccinico na concentração de 0,05mM por 2horas (DUMAY *et al.*, 2006; UEDA *et al.*, 2003; FRANCO *et al.*, 2009). Decorrido este tempo, as células foram novamente marcadas, no escuro, com DHE e DCF, por 30 minutos à 37°C para posterior aquisição dos dados no citômetro de fluxo.

#### **4.10. ANÁLISE DO COMETA ALCALINO**

Ensaio do cometa é uma técnica bem validada para medir o dano no DNA em células individuais (RODRIGUES *et al.*, 2013). Lâminas histológicas foram pré-tratadas com uma camada de agarose 1,5% de ponto de fusão normal dissolvida em PBS e mantida a 65°C. Posteriormente, 20  $\mu$ L de suspensão de células ( $10^4$ ) foram misturadas com 100 $\mu$ L de agarose de baixo ponto de fusão 0,5%, dissolvida em PBS e mantidas a 37 °C. A mistura contendo agarose de baixo ponto de fusão e a suspensão celular foi espalhada sobre as lâminas com a primeira camada que foram cobertas com uma lamínula e resfriadas a 4°C por 20 minutos para a polimerização da agarose. Posteriormente, as lamínulas foram delicadamente retiradas e as lâminas foram imersas em solução de lise gelada (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM , Tris 10 mM, N-Lauroilsarcosina de sódio 34 mM , e o pH ajustado entre 10,0-10,5, e por último foi adicionado 1% Triton X-100 e 10% DMSO) . A lise ocorreu por uma hora a 4°C e protegidas da luz.

Em seguida, as lâminas foram dispostas em uma cuba de eletroforese e cobertas com solução tampão alcalina (pH>13) por 40 minutos a 4°C, 52 preparada com NaOH 300mM e EDTA 1mM, as lâminas estavam dispostas na posição para corrida, as condições de eletroforese foram ajustadas a 20V, amperagem a 300mA por 30 minutos. Ao final da eletroforese, as lâminas foram cuidadosamente retiradas da cuba e submetidas à etapa de neutralização, com três lavagens de 5 minutos, em

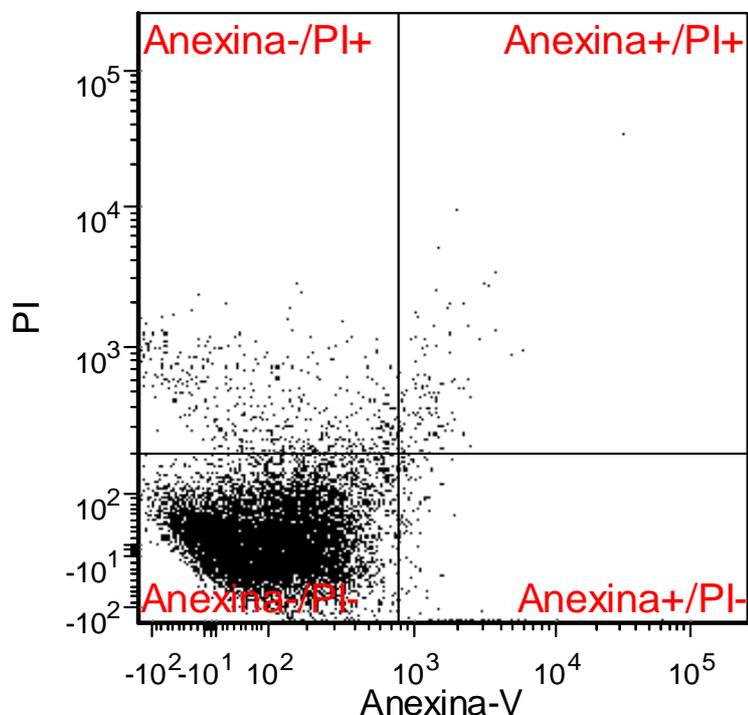
solução tampão neutro (Tris 0,4M, pH 7,5). Após a neutralização, as lâminas foram lavadas com água destilada e mantidas a temperatura ambiente por uma hora.

A migração dos fragmentos de DNA, que podemos chamar de cauda, foi visualizada após a coloração com brometo de etídio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) na concentração de 20 µg/mL. A análise foi realizada imediatamente após a coloração, em microscópio óptico de fluorescência (Nikon Eclipse Ti, Melville, NY, USA) equipado com filtro de 590nm com aumento de 20x. As imagens foram adquiridas através da câmara digital (Nikon) e foram analisadas com um programa de domínio público CASP. Foram utilizados os parâmetros porcentagem de DNA na cauda e o momento da cauda para analisar o dano no DNA. Cerca de 100 cometas em cada lâmina foram aleatoriamente fotografados para posterior análise, sendo que as análises foram realizadas em duplicatas.

#### **4.11. ANÁLISE DA VIABILIDADE E APOPTOSE CELULAR**

Para determinação de viabilidade e apoptose celular foi utilizada a marcação com o reagente Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit® (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA), composto da proteína anexina V conjugada à fluoresceína (FITC) e do corante vital iodeto de propídeo (PI: Propidium Iodide), seguida de análise em citômetro de fluxo. Este ensaio consiste na ligação eficiente da proteína anexina V aos resíduos do fosfolípido fosfatidilserina. Na célula viável, estes resíduos se encontram na face interna da membrana plasmática. Entretanto, quando o processo de morte celular programada (apoptose) é iniciado, estes resíduos são rapidamente translocados para a face externa da membrana, permitindo a ligação da proteína anexina V. O PI, marcador padrão de viabilidade, é usado para distinguir células viáveis de não-viáveis, uma vez que células viáveis com membrana intacta não são coradas. Além disso, o PI é usado em conjunto com a anexina V para permitir a identificação de células em estágio inicial e final de apoptose (CAMPAGNARO *et al.*, 2013). Portanto, neste ensaio é possível determinar a proporção de células vivas (anexina V- /PI-); células em estágio inicial de apoptose onde ocorre apenas a exposição da FS na face externa da membrana plasmática com consequente marcação com a anexina V (anexina V+ /PI- ); células em estágio tardio de apoptose onde além da exposição da FS, a membrana plasmática sofre colapso e se torna

permeável ao PI, fazendo com que a célula possua dupla marcação (anexina V+ /PI+ ) e necrose celular ou inviabilidade, quando a célula se cora apenas com o PI (anexina V- /PI+) (Figura 13).



**Figura 13 – Análise da apoptose através do ensaio com anexina V (anexina) e iodeto de propídio (PI).** Gráfico dot plot típico obtido durante a aquisição dos dados e análise dos resultados de apoptose.

#### 4.12. AVALIAÇÃO DO COMPRIMENTO DE TELÔMERO

O procedimento de hibridização in situ foi realizado através da técnica Flow-FISH. Para determinar o comprimento dos telômeros, adicionou-se em todos os experimentos células da linhagem 1301 de mesmo lote para controle interno da técnica. Por possuírem telômeros longos e serem tetraplóides, são utilizadas como controle em técnica de determinação de comprimento de telômero. As células foram adquiridas da European Collection of Cell Cultures (ECACC), representando células de leucemia de células T humanas.

O comprimento médio dos telômeros das CTHs foi medido utilizando o kit comercial Telomere PNA Kit/FITC (Dako, Glostrup, Denmark). As suspensões de

células CTHs e 1301 foram lavadas em PBS e contadas em câmara de Neubauer. As CTHs ( $2 \times 10^6$  células) foram adicionadas as células 1301 em igual concentração (1:1). A mistura das células foi dividida em quatro microtubos e centrifugada por 5 minutos a 500g. Após remoção do sobrenadante, adicionou-se em dois tubos, nomeados A e B, 300ul de solução de hibridização (reagente 1) e aos outros dois tubos, nomeados C e D, 300 ul da sonda PNA telomérica (reagente 2). Os tubos foram homogeneizados por agitação contínua e colocados em banho seco a 82°C por 10 minutos para desnaturação. Em seguida, os tubos foram homogeneizados e incubados no escuro à temperatura ambiente overnight para hibridização.

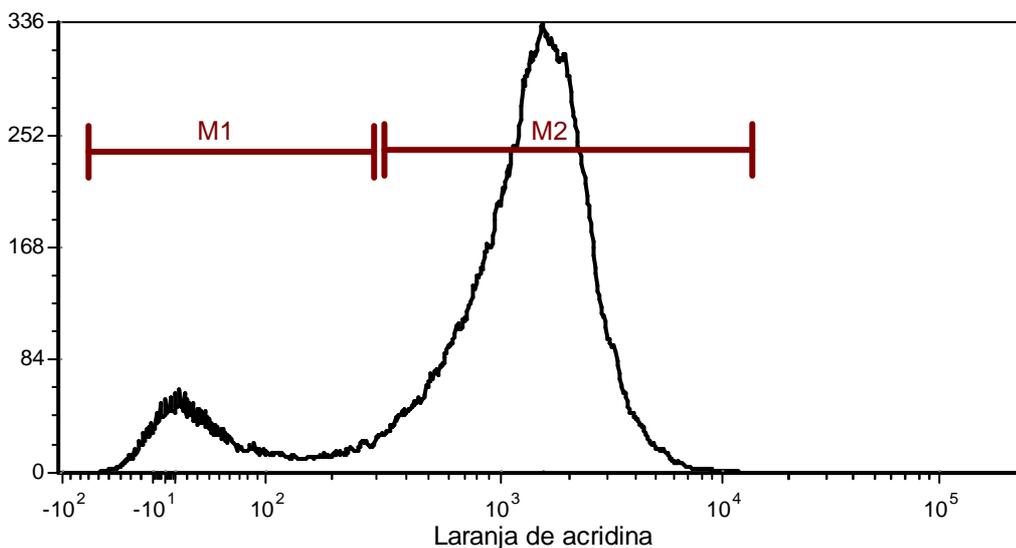
Após o período de incubação, adicionou-se aos tubos 1 mL de solução de lavagem (reagente 3). As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 10 minutos a 40°C em bloco de aquecimento pré-aquecido. Na sequência, os tubos foram homogeneizados e centrifugados a 500g por 5 minutos, seguido de descarte do sobrenadante. Finalmente, foi adicionado aos tubos 0,5 mL de solução de marcação de DNA (reagente 4) para posterior análise no citômetro (TIE *et al.*, 2014).

#### **4.13. ANÁLISE DO CONTEÚDO LISSOSSOMAL**

Para análise indireta do acúmulo de vesículas ácidas autofágicas, as células foram marcadas com o corante laranja de acridina. Esse corante atravessa membranas biológicas; em pH ácido é protonado e perde a capacidade de atravessar membranas celulares, acumulando, assim, dentro dos lisossomos. Mas pode também se intercalar em moléculas de ácidos nucleicos. Quando excitado pelo laser azul (488 nm), emite luz vermelha referente a marcação do conteúdo lisossomal e emite luz verde referente a marcação de ácidos nucleicos (KURZ *et al.*, 2000).

O protocolo consiste em centrifugar a suspensão de células ( $10^6$  células), descartar o sobrenadante e ressuspender em 0,2 mL da solução de marcação contendo 1 mg/ml de laranja de acridina (Invitrogen, Eugene, OR) em tampão PBS. A incubação com o corante laranja de acridina foi realizada por 10 minutos no escuro para posterior análise em citômetro de fluxo. A análise foi realizada através

da mediana de intensidade de fluorescência das células senescentes (M2) como pode ser observado no histograma (Figura 14).



**Figura 14 – Análise da senescência celular por laranja de acridina em citômetro de fluxo.** Histograma representativos da mediana de intensidade de fluorescência do corante.

#### 4.14. MÉTODO HISTOQUÍMICO PARA ATIVIDADE DA $\beta$ -GALACTOSIDASE

Para a detecção de senescência celular, utilizou-se a técnica de coloração por medida de atividade enzimática da  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal em pH6,0). O ensaio foi realizado de acordo com as instruções do fabricante do kit (Senescence Cells Histochemical Staining Kit – Sigma). A marcação da atividade enzimática da  $\beta$ -gal em pH 6 permite detectar células senescentes apenas.

As amostras de CTHs foram lavadas com PBS e posteriormente expostas em uma solução contendo 1 mM de  $MgCl_2$ ,  $K_3Fe(CN)_6$  (4,9 mM),  $K_4Fe(CN)_6$  (4,7 mM), e X-gal, 2,4 Mm (Sigma-Aldrich) em PBS overnight a 37° C em pH 6,0. Em células senescentes, o X-gal é hidrolisado pela  $\beta$ -gal e produz um indoliol, o qual é oxidado e emite a coloração azul. Após o procedimento, as CTHs foram submetidas a captura de imagem com câmera fotográfica acoplada a um microscópio Nikon (Nikon Eclipse Ti, Melville, NY, EUA). A análise da senescência foi realizada através da contagem de células azuis em um total de 1000 células contadas em campos

aleatórios. Os dados foram expressos como porcentagem células  $\beta$ -Gal positivas (Pereira et al., 2010).

#### **4.15. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MARCADORES RELACIONADOS A PLASTICIDADE E AUTO-RENOVAÇÃO CELULAR**

O potencial plástico e de auto-renovação foi avaliado pelos marcadores intracelulares de pluripotência através do kit Mouse Pluripotent Stem Cell Transcription Factor Analysis Kit (BD) de acordo com as instruções do fabricante.

As CTHs foram lavadas e ressuspendidas em PBS. A primeira etapa do protocolo consiste em fixar as células por 20 minutos a temperatura ambiente. Para isso, as células foram centrifugadas por 5 minutos a 300g, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 1 mL da solução fixadora do kit (Cytifix fixation buffer). Posteriormente, as células foram lavadas 2 vezes com a solução de permeabilização do kit (Perm/Wash buffer). As amostras foram então incubadas na mesma solução para permeabilização das células por 10 minutos a temperatura ambiente. Então, as CTHs foram incubadas com os anticorpos de marcação (anti-Nanog, anti-Oct3/4, anti-Sox2) e seus respectivos controles de isotipo por 30 minutos a temperatura ambiente no escuro. Após, as amostras foram lavadas 2 vezes com o tampão fornecido pelo kit (Perm/Wash buffer), centrifugadas por 5 minutos a 300g. Finalmente, as amostras foram ressuspendidas em 300  $\mu$ L do tampão de marcação para análise em citômetro de fluxo.

O equipamento foi previamente ajustado e calibrado, a fim de eliminar sobreposições dos espectros de fluorescência emitidos pelos anticorpos, com os controles (compebeads) fornecidos pelo kit.

#### **4.16. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

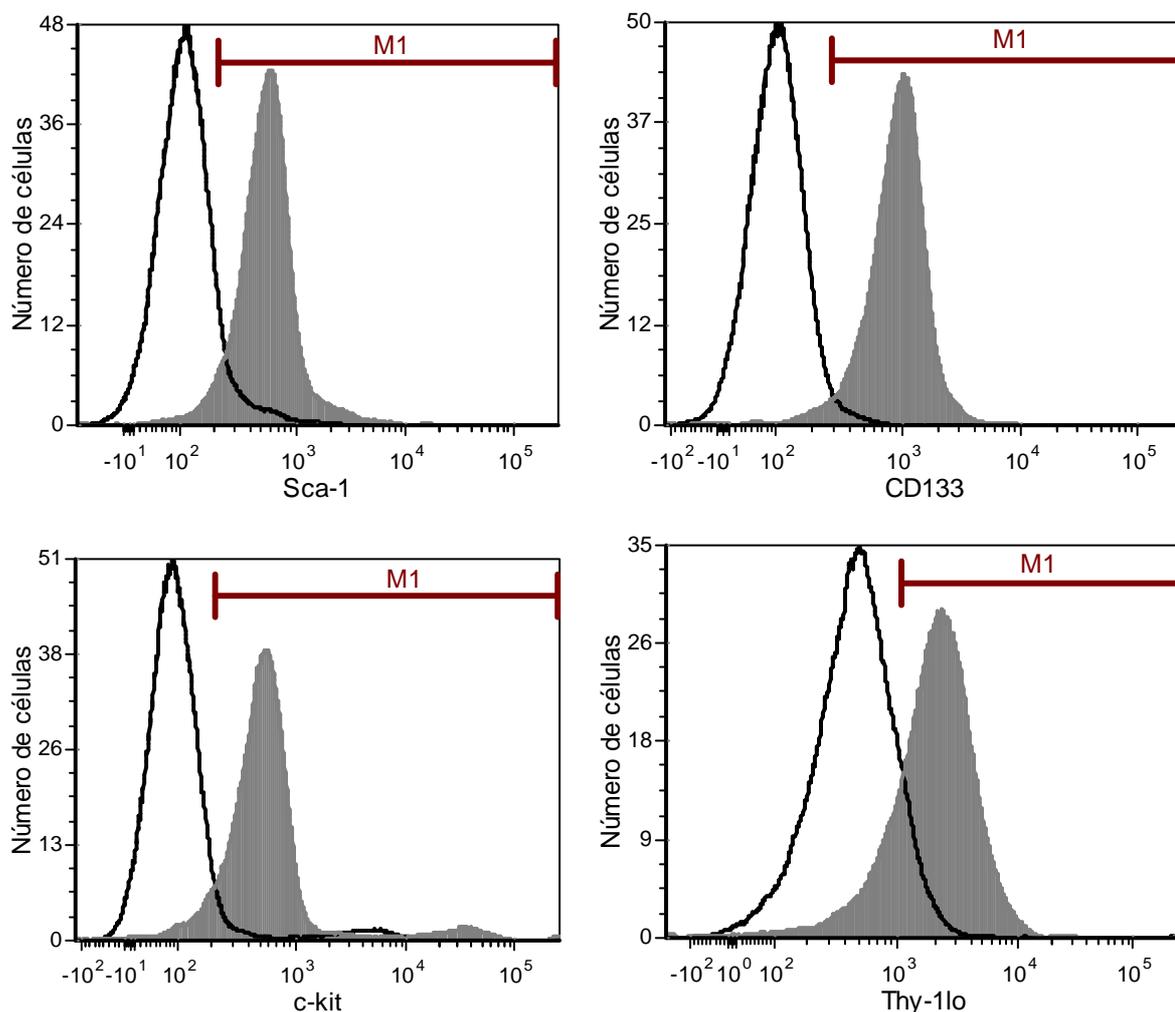
Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM. A normalidade das variáveis foram avaliadas pelo teste Kolmogorov–Smirnov. Foi utilizado o teste análise de variância (ANOVA) pelo software Graphpad prism 6 seguido do *pos hoc* de Tukey's múltiplas comparações. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando  $p < 0.05$  (\*).

# Resultados

## 5. RESULTADOS

### 5.1. CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS POR IMUNOFENOTIPAGEM

Para avaliar a homogeneidade de CTHs e confirmar sua presença na amostra após isolamento e depleção negativa (fração Lin-), as células foram submetidas a imunofenotipagem com anticorpos conjugados a diferentes fluorocromos. As CTHs foram incubadas com anti-Sca-1-FITC, anti-CD133-PE, anti-c-kit-APC e anti-Thy-1<sup>lo</sup>-PE-Cy7 ou seus respectivos controles de isotipo, como pode ser observado na figura 15. Os dados adquiridos por citometria de fluxo confirmaram a presença de CTHs. Não houve diferença na intensidade de fluorescência entre os grupos. Nos histogramas abaixo, o controle de isotipo está representado pela linha preta não preenchida, enquanto o anticorpo específico pode ser observado na linha cinza preenchida. Em M1 eventos positivos, ou seja, células expressando o anticorpo.



**Figura 15 – Imunofenotipagem de células-tronco hematopoiéticas derivadas de medula óssea de camundongos C57.** A linha preta não preenchida representa o controle de isotipo e a linha cinza preenchida representa o anticorpo de marcação.

## 5.2. AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS, CICLO CELULAR E CITOCINAS INFLAMATÓRIAS

Para avaliar o impacto do envelhecimento sobre as CTHs de medula óssea, analisou-se o número de CTHs e sua distribuição no ciclo celular. Observou-se um aumento de 3.3 vezes durante o envelhecimento quando comparamos o grupo 24 meses com o grupo 2 meses, como pode ser observado na tabela 1. A análise do ciclo celular revelou um aumento da taxa de proliferação celular quando comparamos o grupo de 24 meses com os grupos de 2 e 12 meses. Além disso, para investigar possíveis mecanismos que poderiam estar estimulando as CTHs a entrarem no ciclo celular, realizamos a medida das citocinas inflamatórias do sangue da medula óssea. Os dados obtidos mostraram um aumento nos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-12p70, IL-6 e TNF em animais de 24 meses quando comparados aos animais de 2 meses. Essas citocinas podem atuar como sinalizadores de proliferação celular. No entanto, não foi observado aumento nas concentrações de IL-10 e INF- $\gamma$  (Tabela 1).

**Tabela 1. Efeitos do envelhecimento no peso corporal, número de células-tronco hematopoiéticas, ciclo celular e citocinas inflamatórias.**

Parâmetros	Grupos		
	2 meses	12 meses	24 meses
Peso corporal (g)	28 $\pm$ 1	29 $\pm$ 1	34 $\pm$ 1*
Células-tronco hematopoiéticas ( $\times 10^6$ )	1.7 $\pm$ 0.2	4.3 $\pm$ 1	5.6 $\pm$ 1 <sup>#</sup>
Ciclo celular (%)			
Sub G0	1 $\pm$ 0.2	4 $\pm$ 0.2	5 $\pm$ 0.5*
G0/G1	81 $\pm$ 2.6	75 $\pm$ 2.3	66 $\pm$ 2.9*
S/G2/M	18 $\pm$ 2.5	21 $\pm$ 2.6	29 $\pm$ 2.8*
Citocinas mielóides (pg/mL)			
IL-6	23 $\pm$ 2	28 $\pm$ 2	63 $\pm$ 8*
TNF	111 $\pm$ 7	122 $\pm$ 7	227 $\pm$ 27*
IL-12p70	141 $\pm$ 11	142 $\pm$ 10	203 $\pm$ 14*
Citocinas linfóides (pg/mL)			
INF- $\gamma$	3.2 $\pm$ 0.5	3.3 $\pm$ 0.6	4.1 $\pm$ 0.3
IL-10	181 $\pm$ 17	164 $\pm$ 16	149 $\pm$ 8

Nota: Valores expressos como média  $\pm$  EPM. 6 -11 animais por grupo. \* $p < 0.05$  vs 2 meses e 12 meses; #  $p < 0.05$  vs 2 meses (ANOVA de 1 via).

### 5.3. EFEITOS DO ENVELHECIMENTO SOBRE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E CITOCINAS INFLAMATÓRIAS

Para avaliar as consequências do aumento do número de CTHs e da taxa de proliferação, investigamos parâmetros hematológicos sistêmicos. Os animais de 12 e 24 meses de idade apresentaram maiores valores de eritrócitos e leucócitos totais no sangue periférico. Foi observado uma alteração na contagem diferencial de leucócitos dos animais de 24 meses quando comparados aos animais de 2 meses. O envelhecimento promoveu um desvio da produção de células mielóides, suprimindo a diferenciação em células linfóides. Um aumento de 1.6 vezes foi encontrado em células mielóides de animais de 24 meses quando comparados aos animais de 2 meses. E uma redução de 1.3 vezes foi observada em células linfóides de animais de 24 meses quando comparados ao grupo de 2 meses. Os dados sugerem que o processo natural de envelhecimento promove aumento nas taxas de proliferação de CTHs e sua linhagem mielóide.

**Tabela 2 - Efeitos do envelhecimento em parâmetros do hemograma e citocinas inflamatórias do sangue periférico.**

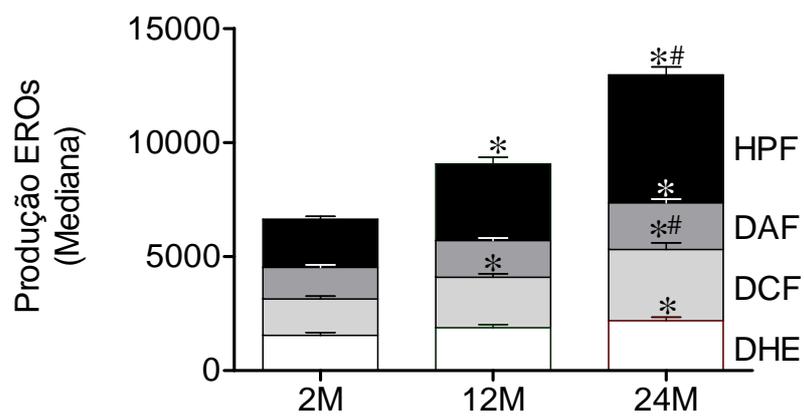
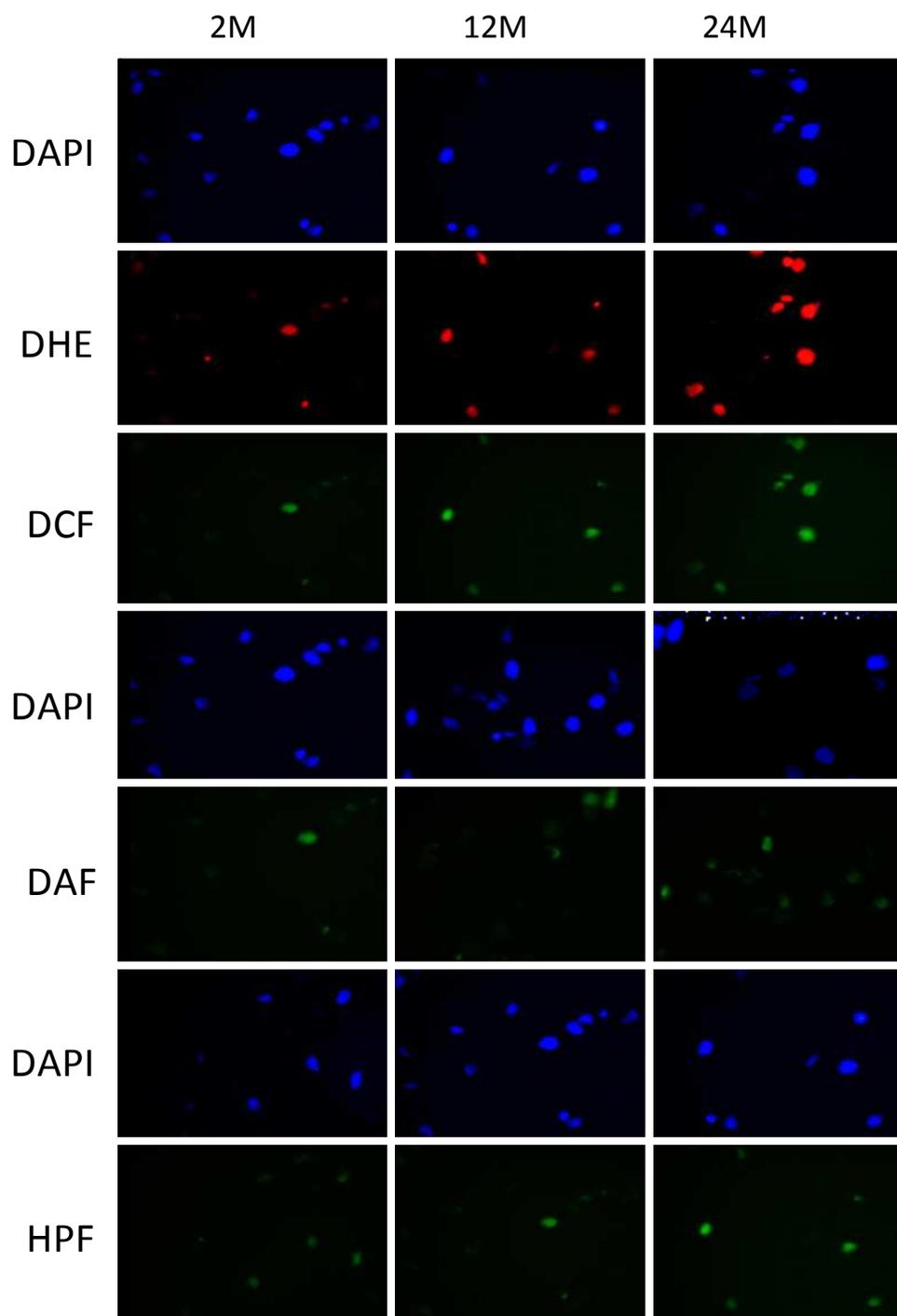
Parâmetros	Grupos		
	2 meses	12 meses	24 meses
<b>Hemograma</b>			
Eritrócitos ( $10^6/\text{mm}^3$ )	4.4 ± 1	7.3 ± 0.2 <sup>#</sup>	7.0 ± 0.3 <sup>#</sup>
Leucócitos ( $10^3/\text{mm}^3$ )	2.9 ± 0.4	2.8 ± 0.3	5.3 ± 1
Células mielóides (%)	24 ± 4.3	27 ± 4.1	40 ± 4.2*
Células linfóides (%)	76 ± 4.3	73 ± 4.1	60 ± 4.2*
<b>Citocinas mielóides (pg/mL)</b>			
IL-6	256 ± 30	348 ± 34	543 ± 37*
TNF	265 ± 19	398 ± 17	588 ± 80*
IL-12	153 ± 12	187 ± 8	172 ± 16
<b>Citocinas linfóides (pg/mL)</b>			
IFN- $\gamma$	69 ± 1.5	77 ± 2.3	75 ± 3.3
IL-10	516 ± 34	586 ± 22	573 ± 19

Nota: Valores expressos como média ± EPM. 6 -11 animais por grupo. \* $p < 0.05$  vs 2 meses e 12 meses; #  $p < 0.05$  vs 2 meses (ANOVA de 1 via).

### 5.4. AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Estudos recentes demonstraram que altos níveis de EROs podem representar um importante mecanismo para disfunção intrínseca de CTHs (JANG *et al.*, 2007; ITO *et al.*, 2004). Portanto, avaliamos a produção intracelular de EROs por diferentes sondas que são mais sensíveis a determinadas moléculas. Realizamos uma análise qualitativa, como ilustrado no painel gerado por microscópio de

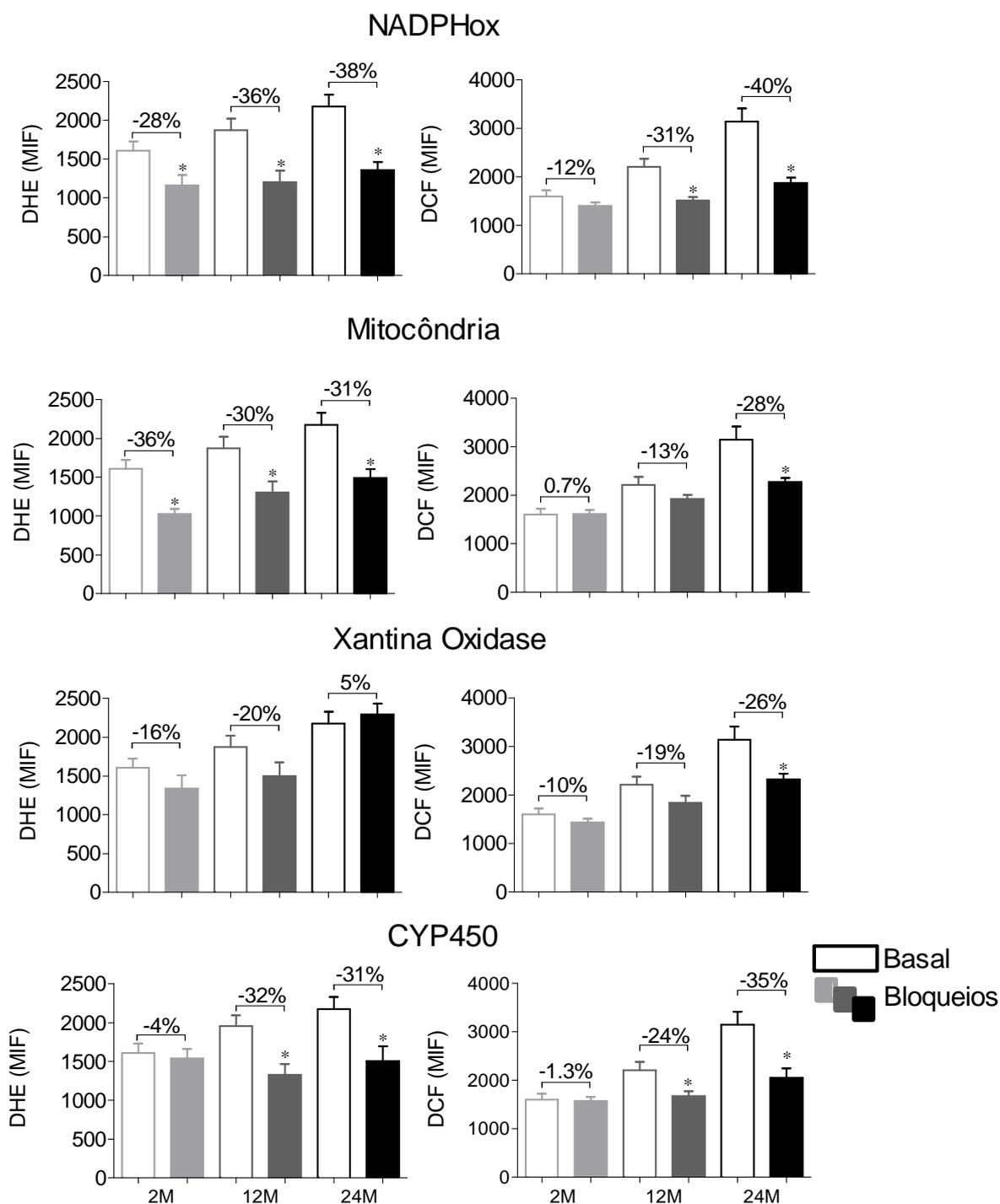
fluorescência abaixo; e uma análise quantitativa por citometria de fluxo, como mostrado pelo gráfico de barras. Observou-se um aumento significativo de EROs em consequência do envelhecimento. Especificamente, pode-se observar um aumento de 1.4 vezes na sonda DHE ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) e 1.6 vezes em DAF (NO) em CTHs de animais de 24 meses quando comparados às CTHs de animais de 2 meses. As medianas de intensidade de fluorescência (MIF) das sondas DCF ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e HPF ( $\bullet\text{ONOO}^-/\bullet\text{OH}$ ) aumentaram nos grupos de 12 meses (1.2 e 1.4 vezes, respectivamente) e 24 meses (2 e 2.6 vezes, respectivamente) em relação aos níveis citoplasmáticos de CTHs de animais de 2 meses ( $p < 0.05$ ).



**Figura 16 – Efeitos do envelhecimento sobre a produção de espécies reativas de oxigênio em células-tronco hematopoiéticas.** Painel – imagens típicas de microscópio de fluorescência mostram células marcadas com DHE, DCF, DAF e HPF. As células de animais de 12 e 24 meses apresentam variação na intensidade de fluorescência quando comparados aos animais jovens. O gráfico de barras mostra diferenças na mediana de intensidade de fluorescência (MIF) das diferentes EROs medidas por citometria de fluxo entre os grupos. Valores expressos como média±EPM, \*p<0.05 vs. 2M. #p<0.05 vs. 12M.

### **5.5. AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DAS PRINCIPAIS VIAS DE PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO**

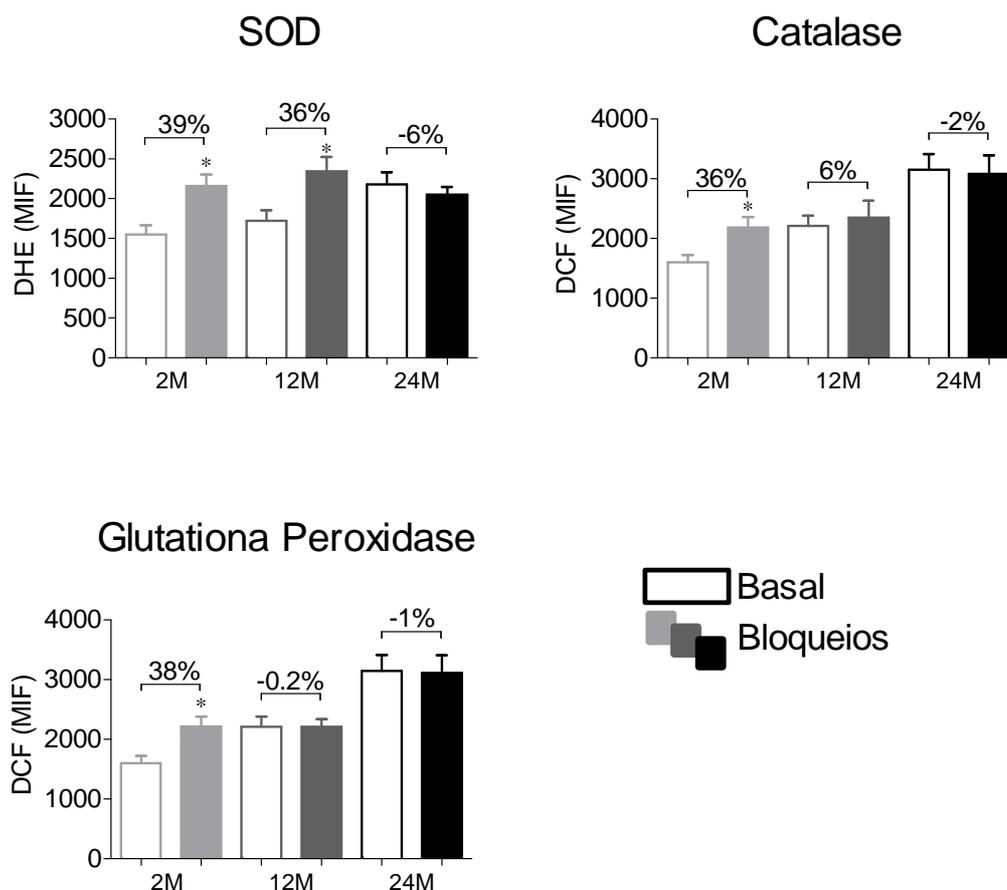
Considerando que pouco se sabe sobre quais vias estão envolvidas na produção de EROs em CTHs e quais alterações moleculares intrínsecas podem ocorrer no envelhecimento, avaliamos as contribuições relativas de diferentes fontes produtoras de EROs que poderiam estar contribuindo para aumento de estresse oxidativo em CTHs. Para isso, utilizamos algumas drogas para bloquear produção das principais fontes de EROs e medimos novamente a intensidade de fluorescência de DHE e DCF. Observou-se que CTHs de animais de 2 meses produzem EROs via mitocôndria e NADPHox principalmente. O grupo de 12 meses mostrou participação de CYP450, além da mitocôndria e NADPHox. Em CTHs de animais de 24 meses, houve contribuição das 4 vias testadas (NADPHox, mitocôndria, CYP450 and XO).



**Figura 17 – Identificação das principais fontes de produção de espécies reativas de oxigênio em células-tronco hematopoiéticas de animais com 2, 12 e 24 meses de idade.** Os gráficos mostram os efeitos de diferentes inibidores na produção de EROs. As barras não preenchidas mostram a produção basal de EROs de cada grupo e as barras preenchidas mostram após o bloqueio. Abreviações: NADPH oxidases (NADPHox), cytochrome P450 (CYP450), superóxido dismutase (SOD). Valores expressos como média±EPM, \*p<0.05 vs. basal respectivo.

## 5.6. AVALIAÇÃO DO SISTEMA ANTIOXIDANTE EM CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS

Em outro experimento, investigou-se a participação do sistema enzimático antioxidante na manutenção de EROs. O objetivo desse ensaio foi verificar se o envelhecimento causava um prejuízo em três importantes enzimas antioxidantes (superóxido dismutase – SOD; catalase e glutathiona peroxidase). Nossos dados mostram que as CTHs de animais de 2 meses possuem atividades enzimáticas normais para as três enzimas bloqueadas. No entanto, as CTHs de 12 meses exibiram prejuízo da atividade enzimática da SOD, enquanto as CTHs de animais de 24 meses mostram prejuízo da atividade de todo o sistema.



**Figura 18 – Avaliação da capacidade enzimática antioxidante de células-tronco hematopoiéticas.** Os gráficos mostram os efeitos de inibidores das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathiona peroxidase na redução de EROs. As barras não preenchidas mostram os níveis

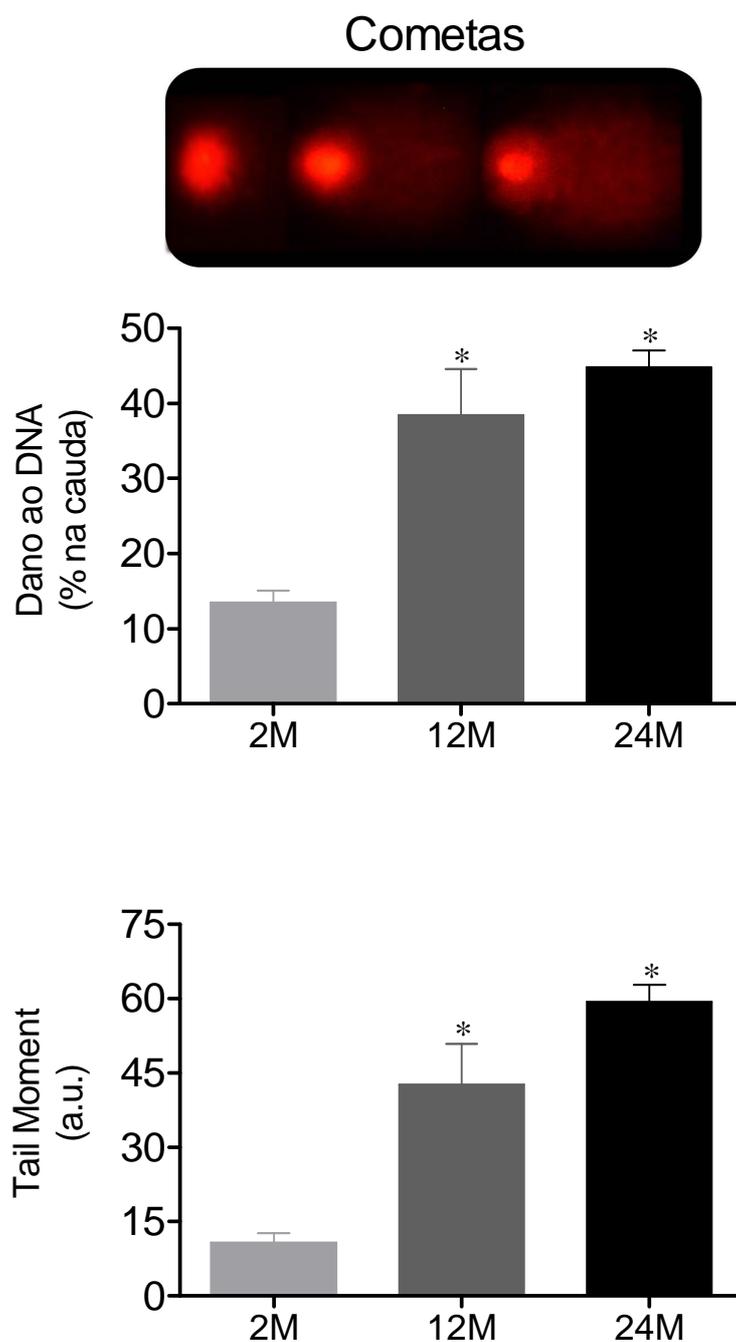
basais de EROs e as barras preenchidas após o determinado bloqueio. Valores expressos como média±EPM, \*p<0.05 vs. basal respectivo.

### **5.7. AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE FRAGMENTAÇÃO DO DNA DE CÉLULAS DO RIM CLIPADO**

Nesse estudo, utilizamos o ensaio do cometa alcalino para avaliar o dano ao DNA. Neste ensaio, podemos utilizar diversos parâmetros para análise. Como estabelecido em estudos anteriores do nosso laboratório, utilizamos os parâmetros momento da cauda e porcentagem de DNA na cauda. Na figura 19 podemos observar em imagens típicas, que a CTHs dos animais de 12 e 24 meses possuem cometas com níveis de dano ao DNA elevados em relação às CTHs dos animais de 2 meses.

Os fragmentos de DNA que migram durante a eletroforese é representado pela porcentagem de fragmentos de DNA na cauda. No gráfico B podemos observar que os grupos de 12 e 24 meses de idade apresentaram maior dano ao DNA (4.2 e 5.9 vezes, respectivamente), quando comparados com o grupo 2 meses ( $p < 0.05$ ).

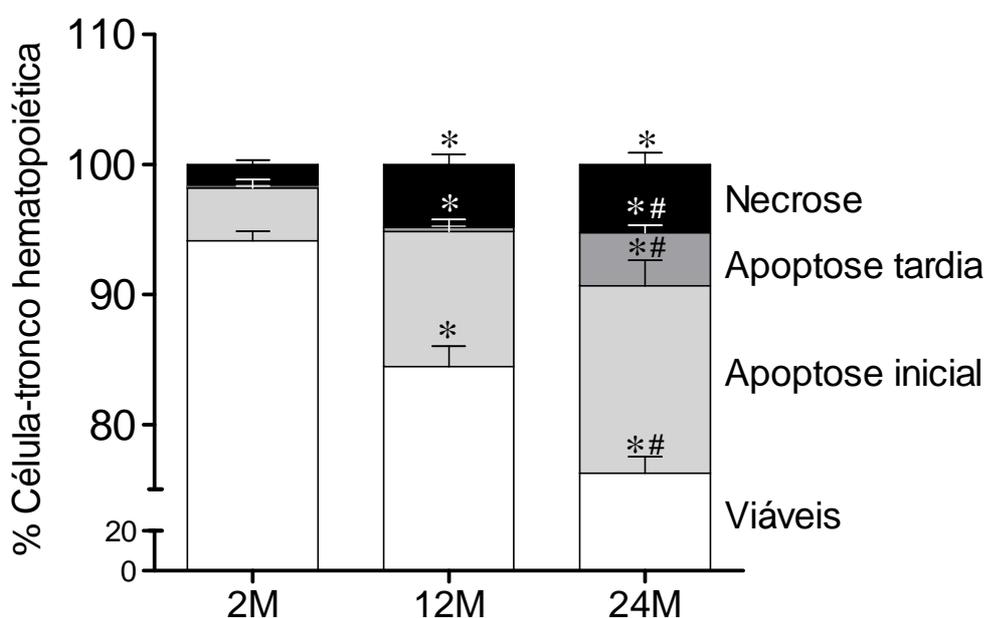
No gráfico C foi analisado o parâmetro do momento da cauda que é um índice que avalia tanto a migração do material genético quanto a quantidade relativa de DNA na cauda, relacionando a porcentagem de DNA na cauda com a intensidade da fluorescência. Podemos observar então, similar ao parâmetro anterior, que os animais de 12 meses e 24 meses apresentaram um aumento significativo (2.8 e 3.3 vezes, respectivamente) quando comparados às CTHs de animais de 2 meses ( $p < 0.05$ ).

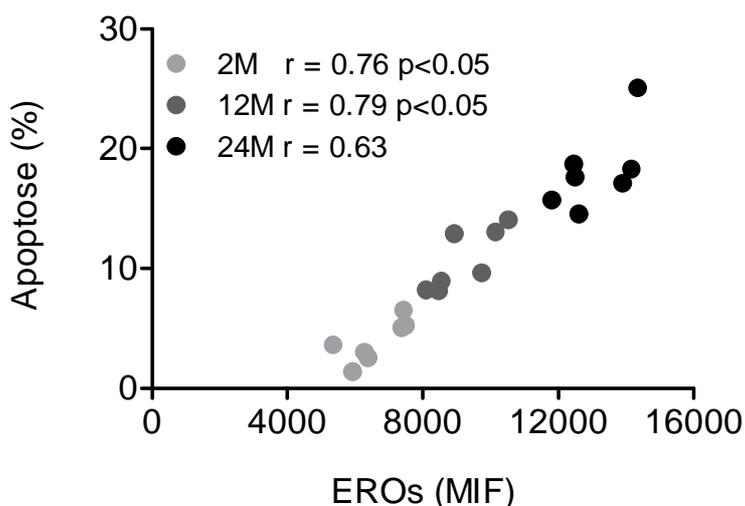


**Figura 19 – Ensaio do cometa alcalino.** A: Fotos representativas dos cometas típicos dos 3 diferentes grupos. B - Gráfico representativo da porcentagem de DNA na cauda das CTHs dos grupos 2, 12 e 24 meses de idade. C – Gráfico do momento da cauda das CTHs. Os valores estão expressos em média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  vs 2M.

### 5.8. EFEITOS DO ENVELHECIMENTO SOBRE A APOPTOSE EM CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS

A análise da apoptose pode ser útil para avaliar o envelhecimento e a sobrevivência do compartimento hematopoiético. O gráfico mostra que a viabilidade celular de CTHs diminui com o envelhecimento. CTHs dos animais de 12 e 24 meses mostraram um aumento significativo na porcentagem de células em estágio inicial de apoptose (10 e 14%, respectivamente), definido pela marcação anexina-V+/PI-, comparado com CTHs de animais de 2 meses (4%). No entanto, apenas CTHs de animais de 24 meses demonstraram um aumento significativo de apoptose tardia (4%), definido por anexina-V+/PI+, quando comparados aos animais de 2 meses (0.1%,  $p < 0.05$ ) e 12 meses (0.3%,  $p < 0.05$ ). O processo de necrose, definido por anexina-V-/PI+, foi detectado em CTHs de animais de 12 e 24 meses (~5%) quando comparados às CTHs de 2 meses (~1.5%,  $p < 0.05$ ). O aumento nos níveis de EROs se correlacionou positivamente com os aumentos nos níveis de apoptose, como pode ser observado no gráfico abaixo. Esses dados sugerem que o estresse oxidativo pode estar envolvido nas vias de ativação da apoptose.



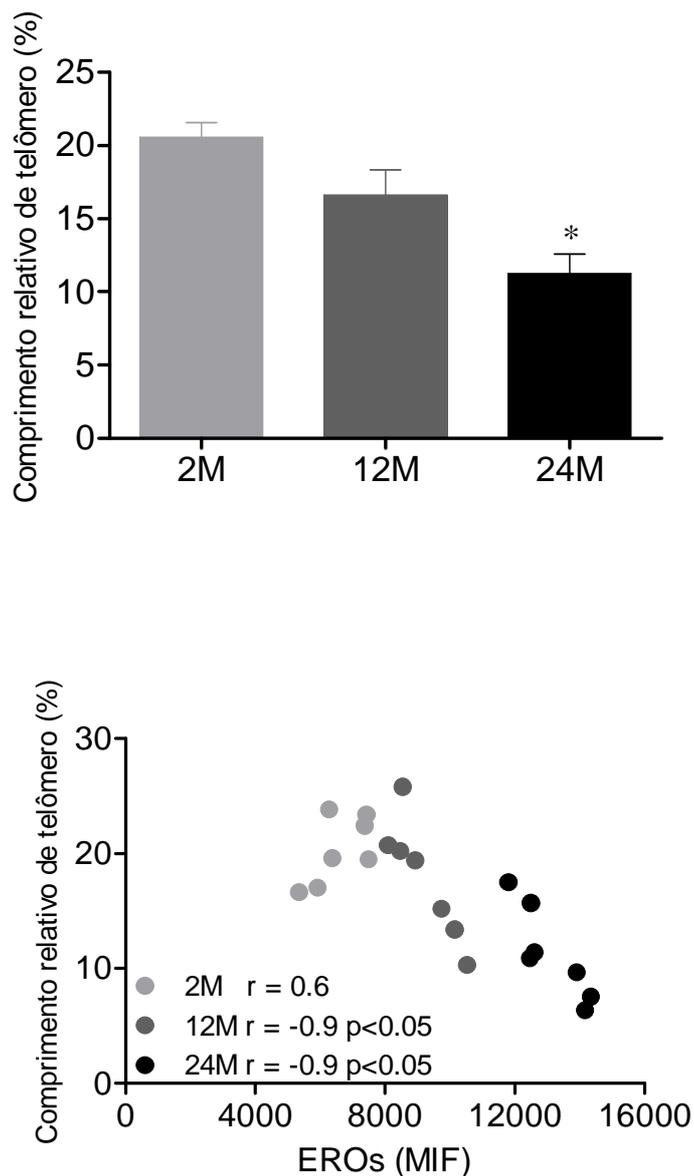


**Figura 20- Efeitos do envelhecimento sobre a apoptose de células-tronco hematopoiéticas.** O gráfico de barras mostra a porcentagem média das células viáveis, apoptose inicial, apoptose tardia e necrose detectados por anexina-V e PI. B – Correlação entre os níveis de EROs e apoptose. Os valores estão expressos como média±EPM, \*p<0.05 vs. 2 meses. #p<0.05 vs. 12 meses.

## 5.9. SENESCÊNCIA CELULAR

### 5.9.1. COMPRIMENTO RELATIVO DE TELÔMERO

Para investigar características senescentes, avaliou-se o comprimento do telômero. O encurtamento do telômero limita a capacidade de proliferação da célula em um número finito de divisões celulares. O acúmulo de danos ao DNA e a disfunção do telômero pode contribuir para o declínio da manutenção e funcionalidade de CTHs. Observou-se uma redução significativa do comprimento relativo dos telômeros das CTHs de animais de 24 meses, aproximadamente 80% em relação ao comprimento dos telômeros de CTHs de animais de 2 meses ( $p<0.05$ ), sugerindo uma redução na atividade da telomerase nos animais idosos. O gráfico de correlação mostra que existe uma relação inversa entre o aumento de EROs e o comprimento dos telômeros nos grupos de 12 meses e 24 meses ( $r = -0.9$ ,  $p<0.05$ ).

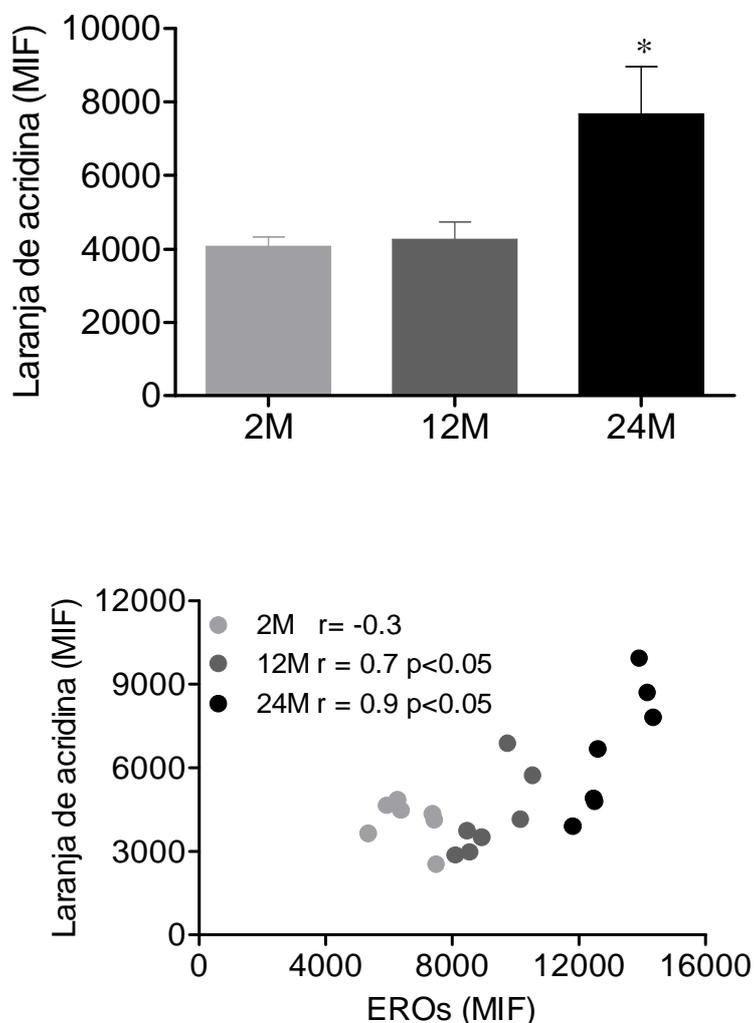


**Figura 21 – Efeitos do envelhecimento sobre o comprimento de telômero.** O gráfico de barras mostra a porcentagem do comprimento relativo de telômero (CRT) dos três grupos estudados. Correlação entre os níveis de EROs e CRT. Os valores estão expressos como média±EPM, \* $p < 0.05$  vs. 2 meses.

### 5.9.2. CONTEÚDO LISSOSSOMAL

A célula senescente perde a propriedade de autofagia e acumula organelas em seu citoplasma. Uma forma de avaliar a autofagia é através do conteúdo lisossomal. O corante laranja de acridina, utilizado neste ensaio, é capaz de atravessar a membrana da célula e em pH ácido é reduzido e emite luz laranja. A emissão de luz laranja indica a presença de vesículas autofágicas ácidas, que estão relacionadas ao processo de autofagia. Nossos dados mostraram um aumento

significativo do conteúdo lisossomal em CTHs de animais de 24 meses, em torno de 90% comparado aos grupos de 2 e 12 meses. Além disso, observou-se uma correlação entre a intensidade de fluorescência de laranja de acridina e os níveis de EROs.

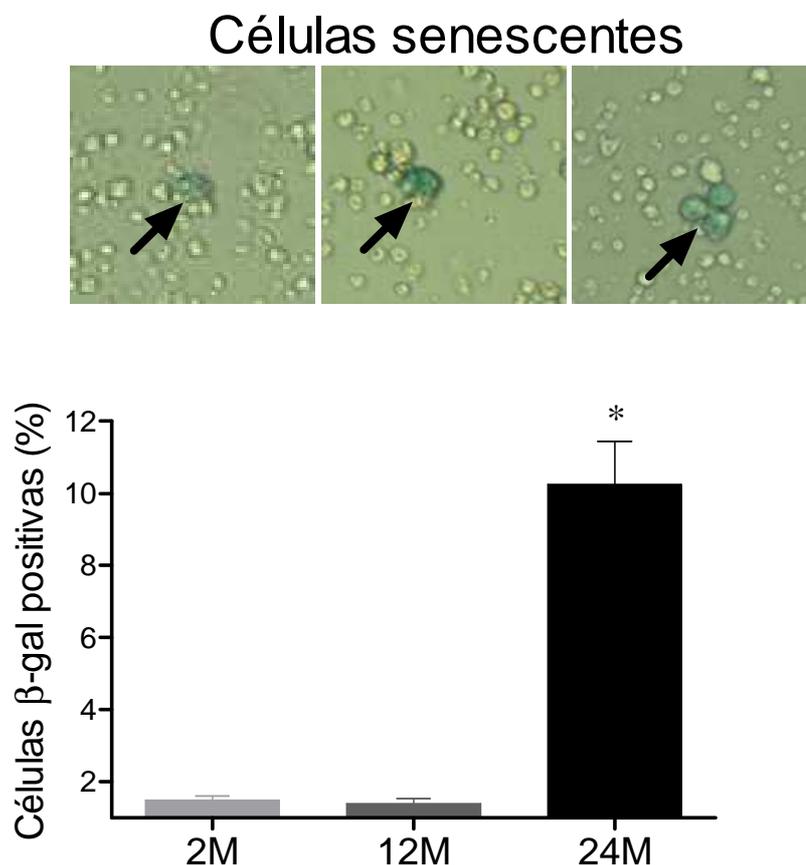


**Figura 22 – Efeito do envelhecimento sobre o conteúdo lisossomal.** O gráfico de barras mostra o aumento das vesículas ácidas medidos laranja de acridina em citômetro de fluxo. Correlação entre a intensidade de fluorescência da laranja de acridina e níveis de EROs. Os valores estão expressos como média±EPM, \*p<0.05 vs. 2 meses.

### 5.9.3. ATIVIDADE DA $\beta$ -GALACTOSIDASE

A expressão da enzima  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) é um importante biomarcador de senescência celular. Para investigar os efeitos do envelhecimento, realizou-se o ensaio de  $\beta$ -gal em CTHs nos três grupos estudados. Como ilustrado na imagem 23,

o citoplasma de células senescente marca em azul e podem ser facilmente identificadas e contadas. Foi observado um aumento significativo de CTHs  $\beta$ -gal positivas em animais de 24 meses, em torno de 10%, quando comparados aos grupos de 2 e 12 meses ( $p < 0.05$ ).

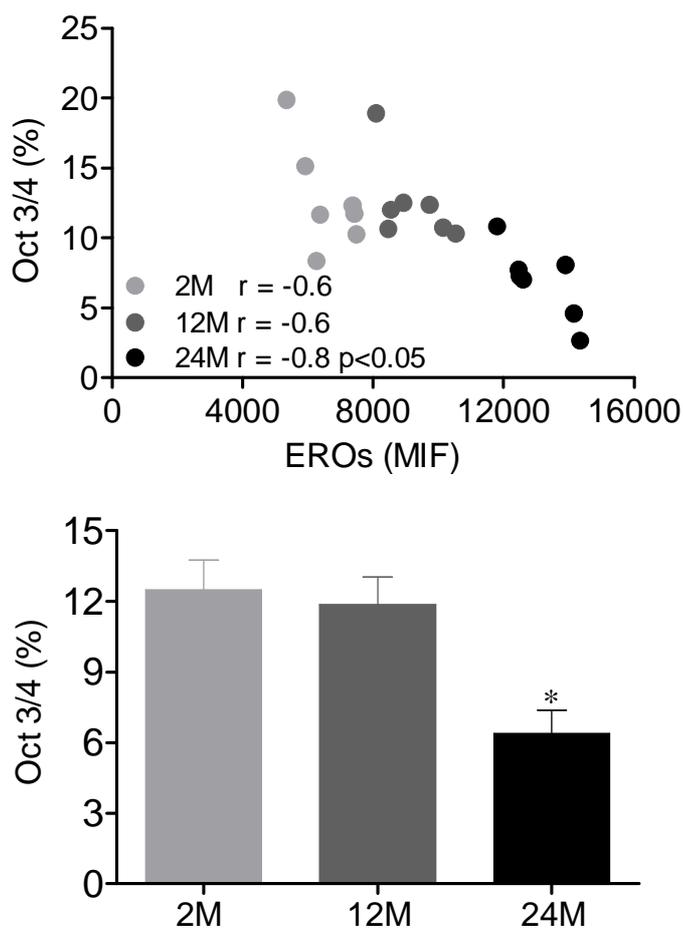


**Figura 23 – Efeito do envelhecimento na senescência celular.** As imagens mostram típicas células senescentes. O painel mostra imagens de típicas células senescentes em azul e o gráfico de barras apresenta a porcentagem de células  $\beta$ -gal positivas. Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM, \* $p < 0.05$  vs. 2 meses e 12 meses.

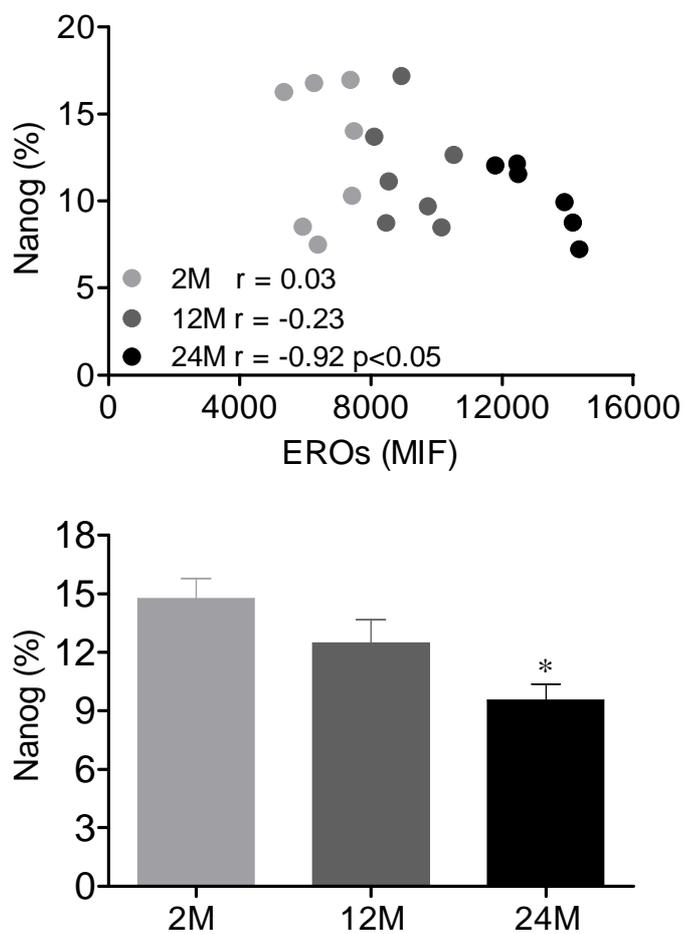
### 5.10. EXPRESSÃO DOS MARCADORES DE PLASTICIDADE CELULAR E AUTO-RENOVAÇÃO

O dano ao DNA induzido por aumento dos níveis de EROs está associado a perda da capacidade regenerativa, disfunção na auto-renovação e alteração no perfil do ciclo celular. O objetivo deste ensaio foi avaliar se elevados níveis de EROs poderiam influenciar a expressão dos fatores Oct-3/4, Nanog e Sox-2 (ONS)

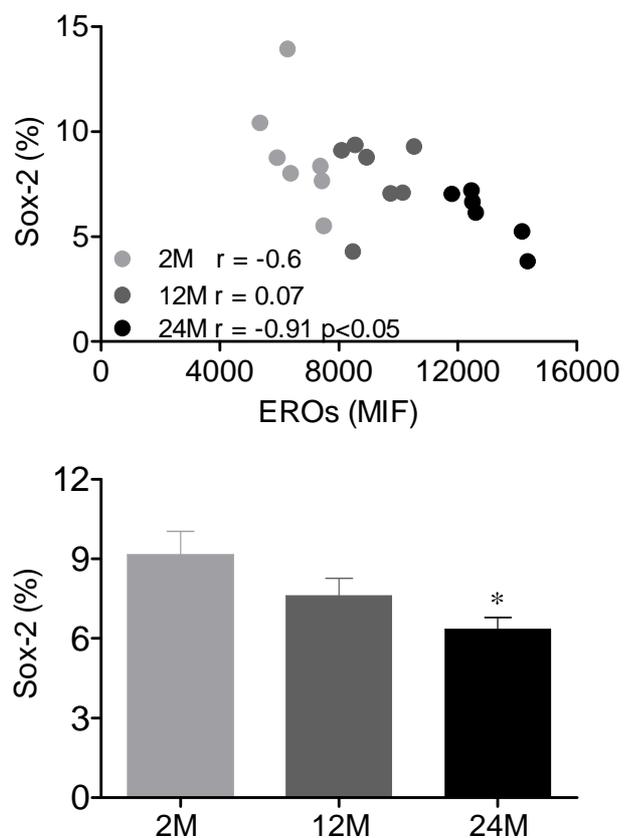
envolvidos na manutenção da potencial plástica e de auto-renovação. Como pode ser observado nas figuras abaixo (Figuras 24-26), a expressão ONS estava significativamente reduzida em CTHs derivadas de medula óssea de animais de 24 meses quando comparados aos grupos de 2 e 12 meses (Oct-3/4: -50%; Sox-2: -30%; Nanog: -23%,  $p < 0.05$ ). Os gráficos de correlação sugerem que a perda da capacidade de regeneração das CTHs está relacionada aos altos níveis de EROs.



**Figura 24 - Expressão do marcador Oct3/4 envolvido na potencial plástica de CTHs.** Correlação entre os níveis de EROs e a porcentagem de células positivas para Oct3/4. Os valores estão expressos como média±EPM, \* $p < 0.05$  vs. 2 meses.



**Figura 25 - Expressão do marcador Nanog envolvido na manutenção da indiferenciação de CTHs.** Correlação entre os níveis de EROs e a porcentagem de células positivas para Nanog. Os valores estão expressos como média±EPM, \* $p < 0.05$  vs. 2 meses.



**Figura 26 - Expressão do marcador Sox-2 envolvido na manutenção da pluripotência e auto-renovação de CTHs.** Correlação entre os níveis de EROs e a porcentagem de células positivas para Sox-2. Os valores estão expressos como média±EPM, \* $p < 0.05$  vs. 2 meses.

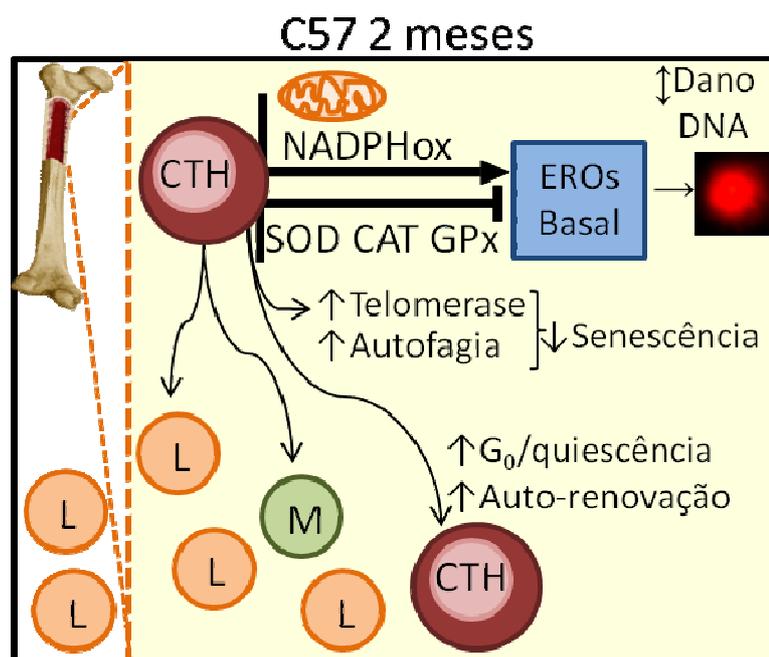
# DISCUSSÃO

## 6. DISCUSSÃO

No presente trabalho, investigaram-se as alterações causadas pelo envelhecimento na funcionalidade de células-tronco hematopoiéticas derivadas de medula óssea de camundongos C57BL/6. Observou-se um aumento significativo no número total de CTHs, prevalência de células nas fases proliferativas do ciclo celular e um desvio para a produção de células diferenciadas da linhagem mieloide no sangue periférico, justificado pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias.

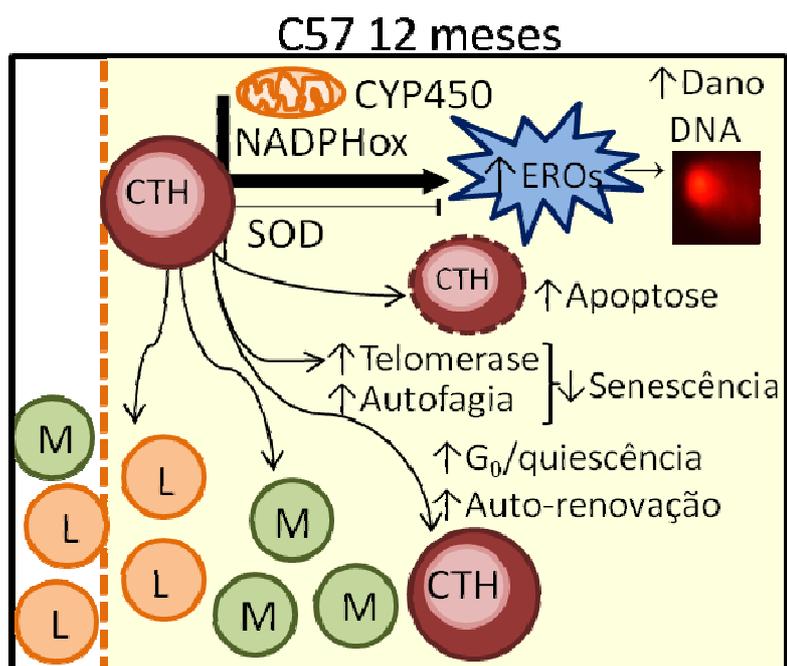
Até o presente momento, pouco se sabia sobre a participação das vias de produção de EROs em CTHs. Este estudo relata a caracterização das principais fontes de EROs em CTHs, bem como o efeito do envelhecimento sobre as principais vias de produção e redução de EROs por enzimas antioxidantes. Nossos dados mostraram que o envelhecimento levou ao aumento do dano ao DNA, apoptose, senescência e perda de potencial plástico e de indiferenciação que ocorreram em consequência do acúmulo de EROs em CTHs e do ambiente pró-inflamatório.

Apesar do principal objetivo deste trabalho ser avaliar os efeitos do envelhecimento sobre a funcionalidade de CTHs, vale ressaltar os desfechos celulares encontrados em cada grupo de animais estudados. De acordo com os nossos estudos, em CTHs de animais de 2 meses, as principais fontes de EROs são mitocôndria e NADPHox. O sistema antioxidante está ativo e controla os níveis de EROs à níveis fisiológicos. Consequentemente, as CTHs apresentaram baixo nível de dano ao DNA e baixos níveis de apoptose e senescência. A maior parte das células estão quiescentes e com alta expressão dos fatores de transcrição relacionados a auto-renovação e pluripotência. No sangue periférico, a produção de células da linhagem linfóide e mieloide estão normais (Figura 27).



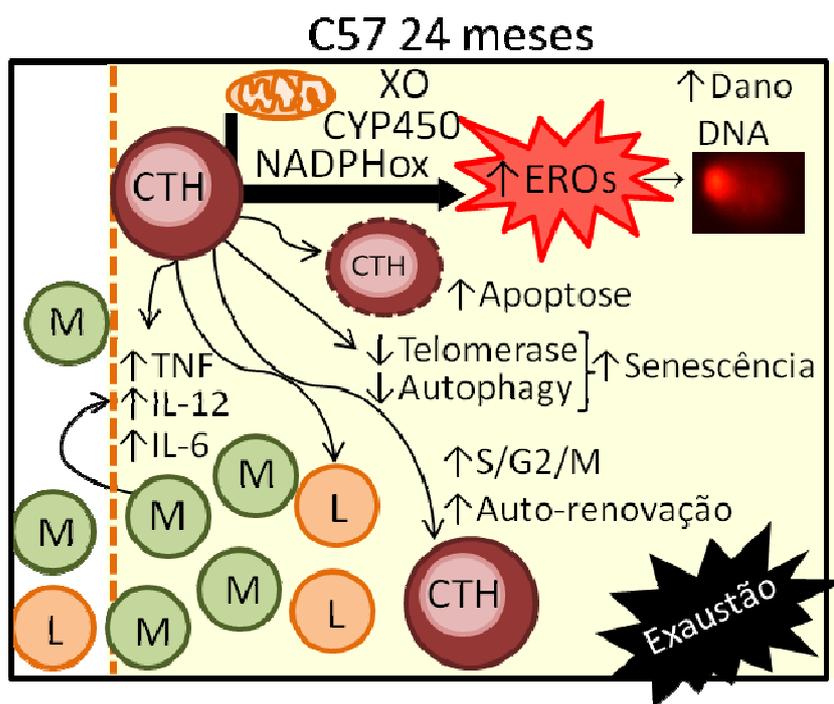
**Figura 27 – Descrição das células-tronco hematopoiéticas (CTH) derivadas de medula óssea de animais de 2 meses.** Abreviações: NADPHox – NADPH oxidase; EROs – espécies reativas de oxigênio; L- células linfoides; M – células mieloides.

Como ilustrado na Figura 28, CTHs derivadas de medula óssea de animais de 12 meses apresentam mitocôndria, NADPHox e CYP450 como as principais fontes de EROs. O sistema antioxidante apresentou prejuízo nas enzimas catalase e glutathiona peroxidase, mas a atividade da SOD está preservada. Observou-se um incremento nos níveis de EROs. Conseqüentemente, as CTHs apresentaram alto nível de dano ao DNA e aumento na taxa de apoptose. A maior parte das células estão quiescentes e com alta expressão dos fatores de transcrição relacionados a auto-renovação e pluripotência. No sangue periférico, observa-se discreta redução na produção de células da linhagem linfóide (estatisticamente não significativo).



**Figura 28 - Descrição das células-tronco hematopoéticas (CTH) derivadas de medula óssea de animais de 12 meses.** Abreviações: NADPHox – NADPH oxidase; citocromo P450 – CYP450; EROs – espécies reativas de oxigênio; L- células linfoides; M – células mieloides.

CTHs derivadas de medula óssea de animais de 24 meses apresentam mitocôndria, NADPHox, CYP450 e xantina oxidase como as principais fontes de EROs. O sistema antioxidante apresentou prejuízo nas três enzimas testadas SOD, catalase e glutathiona peroxidase. Observou-se um aumento significativo nos níveis de EROs nessas células. Conseqüentemente, as CTHs apresentaram alto nível de dano ao DNA, aumento na taxa de apoptose e senescência celular. O número de células quiescentes reduziu, levando a mais células para a fase proliferativa do ciclo S/G<sub>2</sub>/M. Observa-se aumento das citocinas inflamatórias no ambiente medular e sistêmico. Houve redução da auto-renovação e do potencial plástico. No sangue periférico, observa-se um desvio na produção de células da linhagem mieloide e linfosenescência (Figura 29).



**Figura 29 - Descrição das células-tronco hematopoiéticas (CTH) derivadas de medula óssea de animais de 24 meses.** Abreviações: NADPHox – NADPH oxidase; citocromo P450 – CYP450; XO – xantina oxidase; EROs – espécies reativas de oxigênio; L- células linfoides; M – células mieloides; TNF – fator de necrose tumoral; IL-12 – interleucina-12; IL-6 – interleucina-6.

### 6.1. NÚMERO DE CTHs, CICLO CELULAR, HEMOGRAMA E CITOCINAS

Resultados de estudos clínicos e experimentais anteriores já demonstraram que o envelhecimento promove aumento do número de CTHs na medula óssea (DE HAAN *et al.*, 1997; KURANDA *et al.*, 2011). No presente trabalho, também observamos um aumento da taxa proliferativa de CTHs associado ao envelhecimento. CTHs de animais de 24 meses de idade apresentaram um aumento de aproximadamente 10% do número de células nas fases S/G2/M do ciclo celular.

O perfil do ciclo celular de cada população celular corresponde ao estágio funcional delas: as células-tronco mais primitivas estão em estado quiescente (em G0 do ciclo), a maioria das células-tronco que estão auto-renovando estão em G1 e ciclaram lentamente, já os progenitores comissionados estão ativamente no ciclo celular em efetiva expansão (ROSSI *et al.*, 2005).

Inicialmente, nós especulamos que esse aumento da atividade proliferativa poderia ser uma mecanismo de compensação para manter a hematopoese e a capacidade de auto-renovação em CTHs. No entanto, nós observamos que o envelhecimento resultou em diminuição do número das células de linhagem linfóide e aumento do número de células de linhagem mielóide. Além disso, nossos dados mostraram alterações nas contagens globais de leucócitos e eritrócitos, bem como aumento dos níveis de citocinas mielóides (IL-6, TNF, IL-12), sem alteração nos níveis de citocinas linfóides (IFN- $\gamma$ , IL-10).

Nossos dados estão de acordo com outros estudos, que mostraram que CTHs provenientes de animais idosos estão ativamente ciclando e se diferenciam preferencialmente em células da linhagem mielóide (CHAMBERS *et al.*, 2007; ROSSI *et al.*, 2007), apesar dessa característica não ser comum a todas as espécies (DE HAAN *et al.*, 1997). Rossi e cols. em 2005 realizaram ensaios de microarray e revelaram upregulation de genes mielóides e downregulation de genes linfóides em CTHs derivadas de medula óssea de animais de 22 – 24 meses de idade quando comparados aos genes expressos em CTHs de animais de 2 – 3 meses de idade (ROSSI *et al.*, 2005).

O estresse oxidativo pode induzir a produção de citocinas mielóides sistêmicas e locais (ZHANG *et al.*, 2004) e sabe-se que CTHs são extremamente sensíveis à extensa acumulação de EROs (YAMAGUCHI *et al.*, 2013). Logo, nós utilizamos a citometria de fluxo para investigar como o aumento da produção de EROs poderia contribuir para amplificar o desvio mielóide ao longo da vida do animal.

Inflamação está envolvida em muitas doenças, por isso se torna tão importante investigá-la. Muitos transplantes atribuem o sucesso às propriedades anti-inflamatórias das células-tronco (VENDRAME *et al.*, 2005). No presente estudo, observamos aumento dos marcadores inflamatórios, o que poderia ser uma limitação para o uso de CTHs derivadas de medula óssea de animais ou humanos idosos em transplantes.

## 6.2. PRODUÇÃO DE EROs EM CTHs

Sabe-se que, fisiologicamente, as células exigem um equilíbrio entre as condições pró-oxidantes e antioxidantes do organismo. Logo, o rompimento do estado estacionário em favor da condição pró-oxidante é denominado de estresse oxidativo. Sabemos que este processo tem como consequência danos às biomoléculas como ao DNA, aos lipídios e às proteínas (SIES, 1997; RIBEIRO, 2005).

Sob condições fisiológicas, EROs são continuamente produzidas na maioria das células, e os seus níveis são regulados por uma série de enzimas antioxidantes, tais como a catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase, bem como por outros antioxidantes não enzimáticos (BEERMAN *et al.*, 2014).

O sistema hematopoiético é geralmente regulado por diferentes fatores no microambiente medular (nicho), incluindo as citocinas e os níveis fisiológicos de EROs (YAMAGUCHI *et al.*, 2013). É sabido que CTHs de medula óssea com níveis baixos de EROs exibem produção linfóide normal, o que permite manter o nível de quiescência de CTHs e o potencial de auto-renovação (CHINN *et al.*, 2012). Alguns mecanismos parecem proteger CTHs do estresse oxidativo, como a alta capacidade do sistema antioxidante e a utilização preferencial da via de glicólise anaeróbica ao invés da fosforilação oxidativa para a produção de ATP nessas células (SIMSEK *et al.*, 2010).

No presente estudo, nós observamos que essa proteção contra o estresse oxidativo foi gradualmente perdida com o processo de envelhecimento. Nós detectamos que CTHs exibiram aumento na produção de EROs por diferentes probes. CTHs de medula óssea de animais de 24 meses de idade exibiram altos níveis de várias espécies, como pode ser observado nos resultados de citometria de fluxo:  $\bullet\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , NO, incluindo espécies altamente reativas como:  $\bullet\text{ONOO}^-$  and  $\bullet\text{OH}^-$ . Esses dados corroboram os resultados obtidos por outros autores (ITO *et al.*, 2004; YU *et al.*, 2011) e enfatiza a possibilidade da contribuição do estresse oxidativo no aumento da produção mieloide durante o envelhecimento.

Tradicionalmente, acreditava-se que as ROS eram apenas subprodutos de reações biológicas (BALABAN *et al.*, 2005; MUELLER *et al.*, 2005). Posteriormente, descobriu-se que elas podem ser o produto principal de reações catalisadas por oxidases, como a NAD(P)H oxidase desempenhando funções biológicas importantes em vias de sinalização celular que envolvem a sobrevivência, proliferação e apoptose (ZARUBIN & HAN, 2005).

### **6.3. FONTES DE PRODUÇÃO DE EROs E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE**

Alguns estudos já demonstraram que todos os tipos celulares produzem EROs em organismos multicelulares (CHIARUGI *et al.*, 2007; KOBAYASHI *et al.*, 2012). Apesar da mitocôndria ser tradicionalmente considerada a principal fonte de EROs intracelular (POYTON *et al.*, 2009), outros sistemas enzimáticos podem também contribuir para a geração de EROs, como NADPH oxidase (SONG *et al.*, 2012), xantina oxidase, ciclooxygenase, complexo citocromo P450, óxido nítrico sintase e lipoxigenases (FINKEL *et al.*, 2011). No entanto, antes deste estudo, pouco se conhecia sobre quais fontes de EROs estavam envolvidas no envelhecimento, e ainda, mais especificamente, quais vias estavam envolvidas na produção de EROs em CTHs de medula óssea.

Na tentativa de ajudar a esclarecer esses mecanismos, nós testamos a possibilidade de pelo menos quatro fontes estarem envolvidas com a produção de EROs durante o envelhecimento. Os dados obtidos com o uso de bloqueadores farmacológicos confirmaram a ideia de que a mitocôndria e NADPHox eram as também as principais fontes de EROs em CTHs de animais jovens (2 meses de idade), como descrito e revisado por Urao and Ushio-Fukai (2013) em células progenitoras (URAO & USHIO-FUKAI, 2013). Além disso, nós avaliamos as principais vias em CTHs de animais de 12 e 24 meses de idade, que revelaram que outras fontes de EROs também contribuem para aumento do estresse oxidativo. Nossos resultados mostraram que CYP450 possui importante papel em CTHs de animais 12 e 24 meses e a xantina oxidase representa uma importante fonte para CTHs de animais idosos (24 meses).

O processo de envelhecimento gera um ambiente de inflamação, aonde níveis de EROs podem ativar mediadores de inflamação e vice-versa (SALMINEN *et al.*, 2012). Nós observamos que diferentes complexos contribuem para o aumento do estresse oxidativo e a elevação dos níveis de citocinas pro-inflamatórias na medula óssea e no sangue periférico. Nossos dados são consistentes com outros estudos que demonstraram que aumento dos níveis de EROs em medula óssea de animais idosos possuem capacidade de induzir a produção de mediadores inflamatórios locais (ZHANG *et al.*, 2004) e que o envelhecimento pode aumentar níveis de citocinas sistêmicas (CHINN *et al.*, 2012).

Em relação a capacidade antioxidante, nós observamos que CTHs de animais de 12 meses apresentaram prejuízo da atividade da catalase e glutatona, mas a atividade da SOD estava preservada. Esses resultados explicam o acúmulo de  $H_2O_2$  e na manutenção do  $\bullet O_2^-$  quando comparados aos níveis dessas moléculas em CTHs de animais jovens (2 meses). Diferentemente, CTHs de animais idosos apresentaram prejuízo de todas as três enzimas antioxidantes testadas nesse trabalho, o que pode ter refletido no aumento de EROs.

Como consequência desse processo, altos níveis de EROs podem estar envolvidos na sinalização celular e podem regular diferentes mediadores (SARDINA *et al.*, 2012). Dentre eles, os fatores de transcrição *forkhead homeobox type O* (FoxO) parecem ser mediadores de resposta celular frente ao estresse oxidativo. Por exemplo, Tothova e cols. (2007) demonstraram que a falta de alguns subtipos de FoxO em CTHs pode diminuir a expressão de enzimas antioxidantes (como SOD e catalase) e conseqüentemente levar ao aumento dos níveis de EROs no compartimento hematopoiético (TOTHOVA *et al.*, 2007). Com base nesse estudo, podemos especular que o envelhecimento pode diminuir a expressão de componentes da família FoxO e conseqüentemente reduzir os níveis de enzimas antioxidantes.

#### 6.4. DANO AO DNA E APOPTOSE

EROs são altamente reativas e podem oxidar ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos e membranas celulares do núcleo e mitocondrial (CAMPAGNARO *et al.*, 2013; DIAS *et al.*, 2014). Logo, o ensaio do cometa surgiu como uma necessidade de observar possíveis danos ao DNA em células hematopoiéticas.

Sabe-se que aproximadamente  $2 \times 10^4$  danos no DNA ocorrem em cada célula por dia, a maioria via EROs. Nas DCNT e no envelhecimento, a produção de radicais livres aumenta ainda mais (ANDREASSI, 2003; MAHMOUDI *et al.*, 2006). Nossas células estão expostas diariamente a agentes oxidantes de todos os tipos, portanto é normal que sofram fragmentação de DNA. Entretanto mecanismos de reparo e enzimas antioxidantes agem continuamente gerando um balanço positivo nessa batalha. O resultado em um organismo saudável é o equilíbrio dessas duas forças: oxidantes e antioxidantes. Entretanto, em determinadas situações, como no envelhecimento ou DCNT, há um desbalanceamento neste sistema, ocasionando o dano oxidativo ao DNA (TONINI *et al.*, 2013).

Nós realizamos o ensaio do cometa alcalino que avalia danos no DNA em CTHs de animais de 2, 12 e 24 meses. Nossos dados mostraram uma forte correlação entre os níveis de produção de EROs, dano ao DNA e apoptose. Como esperado, a fragmentação de DNA, morte celular e produção de EROs estavam agravados em CTHs de animais idosos.

Nossos dados estão de acordo com os resultados de Jang e cols. (2007) que demonstraram que níveis reduzidos de EROs estão envolvidos com a manutenção da quiescência em CTHs, altos níveis de EROs podem contribuir para aumento da proliferação, senescência e apoptose, levando a uma exaustão prematura da auto-renovação dessas células (JANG *et al.*, 2007).

Os estímulos apoptóticos resultam em diversos eventos moleculares organizados e em cascata que ocorrem em resposta a estímulos intra e extracelulares e que requerem energia e síntese protéica para sua execução. As principais mudanças morfológicas decorrentes da apoptose são retração celular, perda da aderência com

a matriz extracelular e com as células vizinhas, condensação da cromatina, fragmentação internucleossômica do DNA e formação de corpos apoptóticos (TAYLOR *et al.*, 2008; WANG & YOULE, 2009).

Os métodos disponíveis para avaliação de apoptose são divididos em três classes principais: que identificam alterações na estrutura da membrana plasmática, que avaliam o núcleo apoptótico e que analisam moléculas específicas, como caspases e DNases (AREF *et al.*, 2011). Entretanto, é importante considerar a combinação de diferentes moléculas com o intuito de aumentar a especificidade e a sensibilidade destas técnicas de forma a refletir a real situação da integridade da membrana plasmática nestas condições.

Neste contexto, a proteína anexina V associada a corantes de viabilidade vem sendo amplamente estudada e utilizada para detectar apoptose em diversos modelos biológicos (GYLYS *et al.*, 2004), além de ser empregada como agente de diagnóstico clínico em situações como quimioterapia, rejeição de órgãos transplantados e no infarto agudo do miocárdio (TAIT *et al.*, 2004).

A anexina V combinada com moléculas fluorescentes tem sido utilizada como um marcador de apoptose, por ser uma proteína capaz e se ligar fortemente a fosfolípídeos de carga negativa, especificamente à fosfatidilserina, na presença de íons cálcio. Os resíduos de fosfatidilserina residem constitutivamente da face interna da membrana plasmática e, logo no início do processo de apoptose, são rapidamente translocados para a face externa da membrana em resposta a agentes indutores de apoptose (GLYLYS *et al.*, 2004; TAIT *et al.*, 2004; BRUMATTI *et al.*, 2008).

Células vivas apresentam membranas intactas e, portanto, podem ser distinguidas de células mortas com a utilização de corantes vitais, como o iodeto de propídeo (PI), capazes de se difundir para o interior da célula morta, devido a permeabilidade celular aumentada, corando-a e tornando sua identificação bastante fácil (DE BOER *et al.*, 2002).

Como a externalização da fosfatidilserina ocorre no início do processo de apoptose, antes de a membrana celular ter sua permeabilidade comprometida, a anexina V pode ser utilizada para identificar células em estágio inicial ou precoce de apoptose. Células em estágio avançado de apoptose ou em necrose apresentam membrana desestruturada e, conseqüentemente, permeável ao PI. Portanto, a anexina V deve ser utilizada associada a corantes especiais, como o PI, para permitir a identificação de células apoptóticas e discriminar entre apoptose (precoce e tardia) e necrose (BAATOUT, 2004).

No presente estudo a proteína anexina V conjugada à fluoresceína foi utilizada simultaneamente com o corante de viabilidade PI para verificar apoptose por citometria de fluxo. Esta metodologia é bastante vantajosa uma vez que fornece parâmetros diferentes para avaliação do estado funcional das células (CORNELISSEN *et al.*, 2002). Os dados obtidos neste estudo mostraram aumento de apoptose em CTHs de medula óssea de animais de 12 e 24 meses de idade.

Trabalhos recentes em nosso laboratório mostraram a relação entre o aumento do estresse oxidativo e, conseqüente, elevação do dano ao DNA. Campagnaro *et al.* (2013) mostraram um aumento na fragmentação do DNA associado ao aumento da geração de  $\bullet\text{O}_2^-$  em células da medula óssea de camundongos com hipertensão renovascular (CAMPAGNARO *et al.*, 2013). Bem como, os trabalhos de Dalboni *et al.* e Tonini *et al.* que relacionaram o dano ao DNA, respectivamente, em células sanguíneas e células mononucleares da medula óssea de camundongos ateroscleróticos com o envelhecimento, a hipercolesterolemia e o estresse oxidativo (DALBONI *et al.*, 2012; TONINI *et al.*, 2013), mostrando uma correlação entre aterosclerose, hipercolesterolemia, estresse oxidativo e dano ao DNA.

Nós observamos que altos níveis de EROs podem levar ao acúmulo de danos ao DNA. Células em que o dano ao DNA pode ser reparado continuam no ciclo celular, enquanto que células que sofrem dano irreparável sofrem apoptose ou parada do ciclo celular (BEERMAN *et al.*, 2014). Logo, o papel do aumento na produção de EROs na perda de viabilidade celular pode ser justificado pelo aumento da fragmentação de DNA.

## 6.5. SENESCÊNCIA CELULAR

O estresse oxidativo é um fator determinante para a senescência celular, uma resposta biologicamente ativa que contribui para o envelhecimento tissular por pelo menos dois mecanismos (ROSSI *et al.*, 2007; ROSSIELO *et al.*, 2014): primeiro, intrinsecamente, pela falta de habilidade de manter a proliferação para renovar os tecidos com novas células; segundo, por ativação de genes que regulam a expressão de citocinas inflamatórias, fatores de crescimento e enzimas que degradam matriz extracelular (ROSSIELO *et al.*, 2014). Portanto, nós investigamos o impacto do envelhecimento na senescência celular utilizando diferentes ensaios, atividade de  $\beta$ -gal, fluorescência do corante laranja de acridina e o comprimento de telômero.

A senescência celular pode ser induzida por sinal intrínseco e extrínseco. A senescência replicativa é desencadeada por disfunção telomérica e a prematura por estímulo oncogênico e estresse. Ambas apresentam o mesmo fenótipo e atividade do biomarcador associado à senescência (atividade  $\beta$ -gal) (PEREIRA *et al.*, 2010).

O ensaio de atividade de  $\beta$ -gal é um protocolo bem estabelecido e aceito, pois deflagra senescência celular independentemente da via. (PEREIRA *et al.*, 2010). Uma das melhores técnicas para avaliação indireta de senescência celular (KURZ *et al.*, 2000; ERUSALIMSKY & KURZ, 2005) e o ensaio enzimático da  $\beta$ -gal em pH=6,0. Trata-se de uma hidrolase presente em lisossomos que cliva ligações glicosídicas do tipo  $\beta$  1-4. O seu pH ótimo é aproximadamente entre 4.0 a 4.5, compatível com o pH lisossomal, podendo ter sua atividade mensurada através do substrato Xgal. Entretanto, em pH próximo de 6.0, a atividade da  $\beta$ -gal bem como a expressão de seu respectivo RNAm foi encontrada elevada apenas em tecidos senescentes como culturas de fibroblastos humanos, queratinócitos e endotélio (ERUSALIMSKY & KURZ, 2005; MINAMINO & KOMURO, 2007). Ainda, dados recentes mostram uma relação direta dessa técnica com expressão aumentada de proteínas inibidoras de replicação como p53 e p21 (KUNIEDA *et al.*, 2006; MINAMINO & KOMURO, 2007).

Em conjunto, a laranja de acridina reflete indiretamente o mau funcionamento lisossomal; quando a propriedade de autofagia da célula é perdida, os lisossomos se acumulam em células senescentes (KURZ *et al.*, 2000; CHEN *et al.*, 2014).

No presente estudo, nós encontramos aumento do número de células  $\beta$ -gal positivas e também elevação da fluorescência do corante laranja de acridina em CTHs de animais idosos. Esses resultados indicam que a senescência celular aumentam os níveis de atividade de  $\beta$ -galactosidase e do conteúdo lisossomal em CTHs senescentes.

Outro método investigado para confirmar a senescência celular é o encurtamento do comprimento de telômeros. Na verdade, telômeros disfuncionais foram observados em células senescentes in vivo em primatas, e é sabido que a perda da função da telomerase em animais murinos causam senescência e prejuízo fisiológico de muitos tecidos (ROSSIELO *et al.*, 2014).

No nosso estudo, CTHs de animais idosos apresentaram telômeros reduzidos quando comparados às CTHs de animais de 2 e 12 meses de idade. No entanto, vale ressaltar que nem todos os estudos de senescência celular envolvem o encurtamento do comprimento dos telômeros (YU *et al.*, 2011), uma vez que o processo de senescência pode ocorrer de maneira independente (FUMAGALLI *et al.*, 2012).

Além disso, uma diminuição da capacidade autofágica causada pelo envelhecimento pode levar ao acúmulo de organelas danificadas, como as mitocôndrias. Consequentemente, esse aumento de mitocôndrias podem causar um aumento na produção de EROs, que estimulam a secreção de citocinas pró-inflamatórias e aceleram o processo de envelhecimento (SALMINEN *et al.*, 2012).

## **6.6. POTENCIAL PLÁSTICO E DE AUTO-RENOVAÇÃO**

O controle do destino celular é um processo complexo em que as células devem coordenar vários sinais diferentes (FOSSET *et al.*, 2013). Considerando a

importância dos níveis de EROs na sinalização celular e na regulação da expressão de genes, é razoável pensar que essas moléculas possam estar envolvidas com o processo de diferenciação celular (SARDINA *et al.*, 2012).

A perda progressiva dos fatores de transcrição de pluripotência é um indicador do efeito do envelhecimento sobre a capacidade de multipotência de CTHs. Por exemplo, já está bem documentado que a atuação combinada dos fatores de transcrição ONS está associada com a manutenção da pluripotência e indiferenciação de células-tronco embrionárias (YU *et al.*, 2011).

Nós avaliamos os efeitos do envelhecimento o potencial plástico e de auto-renovação de CTHs e nossos resultados revelaram alterações na expressão do perfil ONS em CTHs de animais de 24 meses quando comparados aos animais jovens. Similarmente, Assumda *et al.* (2011) descobriram que a expressão dos marcadores ONS estava reduzida em células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea de ratos idosos (ASSUMDA *et al.*, 2011). Além disso, um recente estudo mostrou que a perda da indiferenciação e potencial plástico de células multipotentes foram induzidas por secreção de citocinas inflamatórias de células senescentes (YOON *et al.*, 2014).

Nossos dados sugerem que os níveis aumentados de EROs diminuem a expressão de NOS, como observado nos gráficos de correlação entre ONS e EROs. Em acordo com esta hipótese, estudos recentes demonstraram a importância dos níveis de EROs na diferenciação celular de camundongos e humanos (SERENA *et al.*, 2009; SASAKI *et al.*, 2009) e que células-tronco embrionárias humanas pluripotentes podem ser melhoradas pela redução dos níveis de EROs (VARUM *et al.*, 2009). Apesar do exato papel de EROs na manutenção da indiferenciação e potencial plástico de CTHs não estar totalmente elucidado, está claro que a homeostase redox deve ser estreitamente regulada para evitar exaustão das CTHs.

# Conclusão

## 7. CONCLUSÃO

Acreditava-se que CTHs tinham o potencial de manter sua funcionalidade e integridade durante toda a vida. No entanto, o presente estudo oferece novas evidências que revelam alterações celulares e moleculares em CTHs durante o envelhecimento. Nós investigamos diversos aspectos funcionais, incluindo auto-renovação, viabilidade, indiferenciação, proliferação e potencial plástico. Observou-se que as CTHs derivadas de medula óssea de animais idosos exibiram um aumento do número de CTHs, da produção de células mieloides, do dano ao DNA, redução de células quiescentes e aumento da fase proliferativa S/G2/M do ciclo celular, quando comparadas aos CTHs de animais jovens. As taxas de apoptose e senescência podem ter aumentado para controlar essas alterações relacionadas ao envelhecimento. Vale ressaltar que o estresse oxidativo, o prejuízo do sistema antioxidante e a inflamação foram importantes estímulos que levaram aos desfechos celulares encontrados neste estudo. Portanto, nosso trabalho contribui para o melhor entendimento das alterações funcionais de CTHs e podem auxiliar a explicar as mudanças degenerativas observadas em órgãos durante o processo de envelhecimento. Sugere-se que as CTHs sejam analisadas criteriosamente para o sucesso das terapias celulares que possuam doadores idosos.

# Referências

## 8. REFERÊNCIAS

ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4 ed. New York: Garland Science, 2002.

ALSALAMEH, S.; et al. Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum.*, 2004, v. 50, p. 1522-1532.

ANDREASSI MG. Coronary atherosclerosis and somatic mutations: an overview of the contributive factors for oxidative DNA damage. *Mutat Res*. 2003, 543(1):67-86.

AREF S, ABDULLAH D, FOUUDA M, et al. Neutrophil apoptosis in neutropenic patients with hepatitis C infection: role of caspases 3, 10, and GM-CSF. *Indian J Hematol Blood Transfus* 2011; 27(2):81-87.

ASHKENAZI A, DIXIT VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 1998 281(5381):1305-8.

ASSUMDA FZ, CHASE PB. Age-related changes in rat bone-marrow mesenchymal stem cell plasticity. *BMC Cell Biol*. 2011 12;12:44.

AVILION, A.A.; et al. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes*, 2003, v. 17, n. 1, p. 126-140.

BAATOUT S, DERRADJI H. Cytometric methods to analyze radiation effects. *J Biol Regul Homeost Agents* 2004; 18(2):101-105.

BALABAN RS, NEMOTO S, FINKEL T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*. 2005, 25; 120(4): 483-95.

BARRETO SM, PASSOS VMA, CARDOSO ARA, LIMA-COSTA MF. Quantificando o Risco de Doença Coronariana na Comunidade. Projeto Bambuí. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 81: 549-555, 2003.

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

BAXTER MA, WYNN RF, JOWITT SN, WRAITH JE, FAIRBAIRN LJ, BELLANTUONO I. Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem Cells*. 2004, 22:675-682.

BEAGHOLE R, SARACCI R, PANICO S. Cardiovascular diseases: causes, surveillance and prevention. *International Journal of Epidemiology*. 2001, 30:1-4.

BEERMAN I, SEITA J, INLAY MA, WEISSMAN IL, ROSSI DJ. Quiescent hematopoietic stem cells accumulate DNA damage during aging that is repaired upon entry into cell cycle. *Cell Stem Cell*. 2014, 3;15(1):37-50.

BERRA CM, MENCK CFM, et al. Oxidative stress, genome lesions and signaling pathways in cell cycle control. *Quím Nova*. 2006, 29(6).

BLANK M, SHILOH Y. Programs for cell death: apoptosis is only one way to go. *Cell Cycle*. 2007, 6(6): 686-695.

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

BORNER C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol*. 2003, 39:615-647.

BOTTO N, RIZZA A, COLOMBO MG. et al. Evidence for DNA damage in patients with coronary artery disease. *Mutat Res*. 2001, 493: 23–30.

BOYER, L.A.; et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*. 2005, v. 122, n. 6, p. 947-956.

BRUMATTI G, SHERIDAN C, MARTIN SJ. Expression and purification of recombinant annexin V for the detection of membrane alterations on apoptotic cells. *Methods* 2008; 44:235-240.

BUDIHARDJO I, OLIVER H, LUTTER M, et al. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1999, 15:269-290.

CAMPAGANARO BP. Utilização da citometria de fluxo para análise do efeito da hipertensão renovascular 2R1C sobre células sanguíneas, endoteliais e da medula óssea de camundongos. 2012. Tese de doutorado. Universidade Federal do Espírito Santo.

CAMPAGNARO BP, TONINI CL, DOCHE LM, NOGUEIRA BV, VASQUEZ EC, MEYRELLES SS. Renovascular hypertension leads to DNA damage and apoptosis in bone marrow cells. *DNA Cell Biol.* 2013, 32(8):458-66.

CHAMBERS SM, SHAW CA, GATZA C, FISK CJ, DONEHOWER LA, GOODELL MA. Aging hematopoietic stem cells decline in function and exhibit epigenetic dysregulation. *PLoS Biol.* 2007, 5(8):e201.

CHEN C, MU XY, ZHOU Y, SHUN K, GENG S, LIU J, WANG JW, CHEN J, LI TY, WANG YP. Ginsenoside Rg1 enhances the resistance of hematopoietic stem/progenitor cells to radiation-induced aging in mice. *Acta Pharmacol Sin.* 2014 35(1):143-50.

CHEW J-L, LOH Y-H, ZHANG W, CHEN X, TAM W-L, YEAP L-S, LI P, ANG Y-S, LIM B, ROBSON P, NG H-H. Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol.* 2005, 25:6031-6046.

CHIARUGI P, FIASCHI T. Redox signalling in anchorage-dependent cell growth. *Cell Signal.* 2007, 19(4):672-82.

CHINN IK, BLACKBURN CC, MANLEY NR, SEMPOWSKI GD. Changes in primary lymphoid organs with aging. *Semin Immunol.* 2012, 24(5):309-20.

CLEMPUS RE, GRIENGLING KK. Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res.* 2007, 71(2):216–25.

COHEN HJ, PIEPER CF, HARRIS T, RAO KM, CURRIE MS. The association of plasma IL-6 levels with functional disability in community-dwelling elderly. *J Gerontology A Biol Sci Med Sci.* 1997 Jul; 52(4): M201-8.

COLLINS T. INFLAMAÇÃO AGUDA E CRÔNICA. IN: ROBBINS. *PATOLOGIA ESTRUTURAL E funcional.* 6ª ed. Rio de Janeiro; Guanabara Koogan, pp. 45-78. 2000.

CORNELISSEN M, PHILIPPE J, DE SITTER S, et al. Annexin-V expression in apoptosis peripheral blood lymphocytes: an electron microscopic evaluation. *Apoptosis.* 2002, 7:41-47.

DADHEECH N, SRIVASTAVA A, BELANI M, GUPTA S, PAL R, BHONDE RR, SRIVASTAVA AS, GUPTA S. Basal expression of pluripotency-associated genes can contribute to stemness property and differentiation potential. *Stem Cells Dev.* 2013, 15;22(12):1802-17.

Dalboni SP, Campagnaro BP, Tonini Cl, et al. The concurrence of hypercholesterolemia and aging promotes DNA damage in apolipoprotein E-deficient mice. *OJBD.* 2012, 2:51-55.

DAN, Y.Y., YEOH, G.C. Liver stem cells: a scientific and clinical perspective. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008, v. 23, n. 5, p. 687-698.

DANIAL NN, KORSMEYER SJ. Cell death: critical points. *Cell.* 2004, 116:205-219.

DANIEL PT, WIDER T, STURM I, et al. The Kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in câncer therapy. *Leukemia.* 2001, 15:1022-1032.

DATASUS – Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde. Indicadores e dados básicos para saúde no Brasil. Ministério da Saúde 2012. Disponível em: <http://www.tabnet.datasus.gov.br>.

DE BOER F, DRAGER AM, PINEDO HM, et al. Early apoptosis largely accounts for functional impairment of CD34 positive cells in frozen-thawed stem cells grafts. *J Hematother Stem Cell*. 2002, 11(2):951-963.

DE HAAN G, NIJHOF W, VAN ZANT G. Mouse Strain-Dependent Changes in Frequency and Proliferation of Hematopoietic Stem Cells During Aging: Correlation Between Lifespan and Cycling Activity. *Blood*. 1997, 89:1543–1550.

DE SOUZA PINTO R, CASTILHO G, PAIM BA, MACHADO-LIMA A, INADA NM, NAKANDAKARE ER, VERCESI AE, PASSARELLI M. Inhibition of macrophage oxidative stress prevents the reduction of ABCA-1 transporter induced by advanced glycosylated albumin. *Lipids*. 2012, 47(5):443-50.

DIAS AT, RODRIGUES BP, PORTO ML, GAVA AL, BALARINI CM, FREITAS FP, PALOMINO Z, CASARINI DE, CAMPAGNARO BP, PEREIRA TM, MEYRELLES SS, VASQUEZ EC. Sildenafil ameliorates oxidative stress and DNA damage in the stenotic kidneys in mice with renovascular hypertension. *J Transl Med*. 2014, 6;12:35.

DIK MG, JONKER C, HACK CE, SMIT JH, COMIJS HC, EIKELENBOOM P. Serum inflammatory proteins and cognitive decline in older persons. *Neurology*. 2005, 64: 1371-1377.

DINARELLO, C. A. Proinflammatory cytokines. *Chest*. 2000, 118, 503-508.

DUARTE ACG. Semiologia Imunológica Nutricional. In: Duarte ACG. Mediadores imunológicos. Axcel Books do Brasil Editora. Rio de Janeiro, pp. 22-36. 2003.

DUMAY A, RINCHEVAL V, TROTOT P, MIGNOTTE B, VAYSSIÈRE JL. The superoxide dismutase inhibitor diethyldithiocarbamate has antagonistic effects on apoptosis by triggering both cytochrome c release and caspase inhibition. *Free Radic Biol Med.* 2006, 15;40(8):1377-90.

DUMBLE M, MOORE L, CHAMBERS SM, GEIGER H, VAN ZANT G, GOODELL MA, DONEHOWER LA. The impact of altered p53 dosage on hematopoietic stem cell dynamics during aging. *Blood.* 2007, 15;109(4):1736-42.

ERUSALIMSKY JD, KURZB DJ. Cellular senescence in vivo: Its relevance in ageing and cardiovascular disease. *Experimental Gerontology.* 2005, 40:634-642.

FARRUGIA G, BALZAN R. Oxidative stress and programmed cell death in yeast. *Front Oncol.* 2012;2:64.

FENTON M, BARKER S, KURZ DJ, ERUSALIMSKY JD . Cellular senescence after single and repeated balloon catheter denudations of rabbit carotid arteries. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology.* 2001, 21, 220–226.

FIBBE, W.E., NOORT, W.A. Mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells transplantation. *Ann NY Acad Sci.* 2003, v. 996, p. 235-244.

FINKEL T, HOLBROOK NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* 2000, 9;408(6809):239-47.

FINKEL T. Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol.* 2011, 11;194(1):7-15.

FOSSETT N. Signal transduction pathways, intrinsic regulators, and the control of cell fate choice. *Biochim Biophys Acta.* 2013, 1830(2):2375-84.

FRAGA CG, SHIGENAGA MK, PARK JW, DEGAN P, AMES BN. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990, 87:4533–4537.

FRANCO JL, POSSER T, DUNKLEY PR, DICKSON PW, MATTOS JJ, MARTINS R, BAINY AC, MARQUES MR, DAFRE AL, FARINA M. Methylmercury neurotoxicity is associated with inhibition of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase. *Free Radic Biol Med.* 2009, 15;47(4):449-57.

FRASCOLI M, PROIETTI M, GRASSI F. Phenotypic analysis and isolation of murine hematopoietic stem cells and lineage-committed progenitors. *J Vis Exp.* 2012, 8;(65). pii: 3736.

FUMAGALLI M, ROSSIELLO F, CLERICI M, BAROZZI S, CITTARO D, KAPLUNOV JM, BUCCI G, DOBREVA M, MATTI V, BEAUSEJOUR CM, HERBIG U, LONGHESE MP, D'ADDA DI FAGAGNA F. Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. *Nat Cell Biol.* 2012, 18;14(4):355-65.

GILLE G, SIGLER K. Oxidative stress and living cells. *Folia Microbiol.* 1995,40(2):131-52.

GRIVICICH V, REGNER A, ROCHA AB. Apoptosis: Programmed Cell Death. *Rev Bras Canc.* 2007, 53(3): 335-343.

GRONTHOS, S.; et al. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J. Cell Physiol.* 2001, v. 189, n. 1, 54-63,

GUILLOT PV, GOTHERSTROM C, CHAN J, KURATA H, FISK NM. Human firsttrimester fetal MSC express pluripotency markers and grow faster and have longer telomeres than adult MSC. *Stem Cells.* 2007;25:646-654.

GUPTA S. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. *Int J Oncoll.* 2003, 22:15-20.

GUTTERIDGE JM, HALLIWELL B. Antioxidants: molecules, medicines, and myths. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 393(4):561-4.

GYLYS KH, FEIN JA, WILEY DJ, et al. Rapid annexin-V labeling in synaptosomes. *Neurochem Int.* 2004, 44:125-131.

HALLIWELL B, CROSS CE. Oxygen-derived species: the irrelation to human disease and environmental stress. *Environ. Health Perspect.* 1994, 102: 5–12.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JM. *Free Radical in Biology and Medicine*, 3 ed., Oxford University Press: Oxford, 2007.

HASSAN M, FEYEN O, GRINSTEIN E. Fas-induced apoptosis of renal cell carcinoma is mediated by apoptosis signal-regulating kinase 1 via mitochondrial damage-dependent caspase-8 activation. *Cell Oncol.* 2009, 31: 437-456.

HAYFLICK L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 1965, 37:614–636.

HENGARTNER MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000, 407:770-76.

HOPKINS, SJ. The pathophysiological role of cytokines. *Legal Medicine.* 2003, 5, 45-57.

IGNARRO LJ, BALESTRIERI ML, NAPOLI C. Nutrition, physical activity, and cardiovascular disease: An update. *Cardiovascular Research.* 2007, 73(2): 326-340.

INSINGA A, CICALESE A, PELICCI PG. DNA damage response in adult stem cells. *Blood Cells Mol Dis.* 2014, 52(4):147-51.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. *Projeção da população do Brasil e das unidades da Federação.* IBGE, 2015.

ITO K, HIRAO A, ARAI F, MATSUOKA S, TAKUBO K, HAMAGUCHI I, NOMIYAMA K, HOSOKAWA K, SAKURADA K, NAKAGATA N, IKEDA Y, MAK TW, SUDA T. Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature.* 2004, 431:997–1002.

JANG Y-Y, SHARKIS SJ. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. *Blood*. 2007, 110:3056–3063.

JIANG, Y.; et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002, Jul 4;418(6893):41-9.

KAJSTURA M, HALICKA HD, PRYJMA J, DARZYNKIEWICZ Z. Discontinuous fragmentation of nuclear DNA during apoptosis revealed by discrete "sub-G1" peaks on DNA content histograms. *Cytometry A* 71(3):125-31, 2007.

KELEKAR A. Autophagy. *Ann NY Acad Sci* 2005; 1066:259-271.

KERKIS, I.; et al. Isolation and Characterization of a Population of Immature Dental Pulp Stem Cells Expressing OCT-4 and Other Embryonic Stem Cell Markers. *Cells Tissues Organs*. 2006, v. 184, p. 105-116.

KERMANI, A.J., FATHI, F., MOWLA, S.J. Characterization and genetic manipulation of human umbilical cord vein mesenchymal stem cells: potential application in cell-based gene therapy. *Rejuvenation Res*. 2008, v. 11, n. 2, p. 379-386.

KIM JB, SEBASTIANO V, WU G, ARAÚZO-BRAVO MJ, SASSE P, GENTILE L, KO K, RUAU D, EHRICH M, VAN DEN BOOM D, MEYER J, HÜBNER K, BERNEMANN C, ORTMEIER C, ZENKE M, FLEISCHMANN BK, ZAEHRES H, SCHÖLER HR. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell*. 2009, 136:411-419.

KOBAYASHI CI, SUDA T. Regulation of reactive oxygen species in stem cells and cancer stem cells. *J Cell Physiol*. 2012 (2):421-30.

KROEMER G, GALLUZZI L, BRENNER C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev*. 2007, 87:99-163.

KROEMER G, JAATTELA M. Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat Rev Cancer*. 2005, 5:886–897.

KROEMER G, REED JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med*. 2000, 6:513-516.

KUNIEDA T, MINAMINO T, NISHI J, TATENO K, OYAMA T, KATSUNO T, MIYAUCHI H, ORIMO M, OKADA S, TAKAMURA M, NAGAI T, KANEKO S AND KOMURO I. Angiotensin II Induces Premature Senescence of Vascular Smooth Muscle Cells and Accelerates the Development of Atherosclerosis via a p21-Dependent Pathway. *Circulation*. 2006, 114:953-960.

KURANDA K, VARGAFTIG J, DE LA ROCHERE P, DOSQUET C, CHARRON D, BARDIN F, TONNELLE C, BONNET D, GOODHARDT M. Age-related changes in human hematopoietic stem/progenitor cells. *Aging Cell*. 2011, 10:542–546.

KURZ DJ, DECARY S, HONG Y, ERUSALIMSKY JD. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci*. 2000, 113 20:3613-22.

KUWANA T, NEWMAYER DD. Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*. 2003, 15(6):691-699.

LEE, J.; et al., The human Oct-4 isoforms differ in their ability to confer self-renewal. *J Biol. Chem.*, 2006.

LIANG Q, ZHOU B. Copper and manganese induce yeast apoptosis via different pathways. *Mol Biol Cell*. 2007, 18:4741–4749.

LIANG Y, VAN ZANT G, SZILVASSY SJ. Effects of aging on the homing and engraftment of murine hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 2005, 106(4):1479-87.

LOEFFLER M, KREMER G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cellular Res.* 2000, 256:19-26.

LUM JJ, DEBERARDINIS RJ, THOMPSON CB. Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005, Jun;6(6):439-48.

MAHMOUDI M, MERCER J, BENNETT M. DNA damage and repair in atherosclerosis. *Cardiovasc Res.* 2006, 71(2):259-68.

MALE D; ROIT I. Introdução ao sistema imune. IN: Roit I, Brostoff J, Male D. *Imunologia.* São Paulo; Manole, pp. 1-11. 1999.

MARESCHI K, FERRERO I, RUSTICHELLI D, ASCHERO S, GAMMAITONI L, AGLIETTA M, MADON E, FAGIOLI F. Expansion of mesenchymal stem cells isolated from pediatric and adult donor bone marrow. *J Cell Biochem.* 2006, 97:744-754.

MARTIN SJ, GREEN DR. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell.* 1995, 82(3):349-352.

MARTINET W, KNAAPEN MW, DE MEYER GR, et al. Elevated levels of oxidative DNA damage and DNA repair enzymes in human atherosclerotic plaques. *Circulation.* 2002, 106(8):927-32.

MASSUDI H, GRANT R, BRAIDY N, et al. Age-associated changes in oxidative stress and NAD<sup>+</sup> metabolism in human tissue. *PLoS One.* 2012, 7(7):42357.

MCNALLY JS, DAVIS ME, GIDDENS DP, SAHA A, HWANG J, DIKALOV S, JO H, HARRISON DG. Role of xanthine oxidoreductase and NAD(P)H oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003, 285(6):H2290-7.

MENEZES TN, CARNIELLI JB, GOMES HL, PEREIRA FE, LEMOS EM, BISSOLI NS, LOPES-FERREIRA M, ANDRICH F, FIGUEIREDO SG. Local inflammatory

response induced by scorpionfish *Scorpaena plumieri* venom in mice. *Toxicon*. 2012, 60(1):4-11.

MIKI, T.; et al. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells*. 2005, v. 23, n. 10, p. 1549-1559.

MINAMINO T, KOMURO I. Vascular Cell Senescence: Contribution to Atherosclerosis. *Circulation Research*. 2007, 100: 15-26.

MINAMINO T, MIYAUCHI H, YOSHIDA T, ISHIDA Y, YOSHIDA H, KOMURO I. Endothelial Cell Senescence in Human Atherosclerosis Role of Telomere in Endothelial Dysfunction. *Circulation*. 2002, 105:1541-1544.

MINGUELL, J.J., ERICES, A., CONGET, P. Mesenchymal stem cells. *Exp. Biol. Med*. 2001, v. 226, n. 6, p. 507-520.

MITSUI, K.; et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*. 2003, v. 113, n. 5, p. 631-642, 2003.

MONTEIRO, Marcela Piedade. Bebida a base de subproduto da uva: efeito sobre o estresse oxidativo e marcadores de risco de doenças cardiovasculares em mulheres saudáveis. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo. 2011.

MORRISON SJ, WANDY CZ AM, AKASHI K, GLOBERSON A, WEISSMAN IL. The aging of hematopoietic stem cells. *Nat Med*. 1996, 2:1011–1016.

MUELLER CF, LAUDE K, MCNALLY JS, et al. ATVB in focus: redox mechanisms in blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005, 25:274-278.

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

NEUMANN L, PFORR C, BEAUDOUIN J, et al. Dynamics within the CD95 death-inducing signaling complex decide life and death of cells. *Mol Syst Biol.* 2010, 6: 352-359.

NIWA, H., MIYAZAKI, J., SMITH, A.G. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat. Genet.* 2000, v. 24, n. 4, p. 372-376.

PAPAHARALAMBUS CA, GRIENGLING KK. Basic mechanisms of oxidative stress and reactive oxygen species in cardiovascular injury. *Trends Cardiovasc Med.* 2007,17(2):48-54.

PEREIRA TM, NOGUEIRA BV, LIMA LC, et al. Cardiac and vascular changes in elderly atherosclerotic mice: the influence of gender. *Lipids Health Dis.* 2010, 9:87.

Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochem Biophys Acta.* 2004, 1644:83-94.

PITTENGER, M.F.; et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, v. 284, p. 143-147, 1999.

POYTON RO, BALL KA, CASTELLO PR. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends Endocrinol Metab.* 2009, 20(7):332–40.

PUYAL J, VASLIN A, MOTTIER V, CLARKE PG. Postischemic treatment of neonatal cerebral ischemia should target autophagy. *Ann Neurol.* 2009, 66:378-389.

RATTAN SI. Theories of biological ageing: genes, proteins, and free radicals. *Free Radic Res.* 2006, 40(12): 1230-8.

RAUSCHER FM, GOLDSCHMIDT-CLERMONT PJ; et al. Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis. *Circulation.* 2003, 29;108(4):457-63.

Rede Interagencial de informações para saúde. Indicadores básicos de saúde no Brasil: conceitos e aplicações. Rede Interagencial de informações para saúde – RIPSA. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde, 2002. 299p.

Revista Scientific American – Edição especial Ciência e Saúde nº3, Brasil 2006.

RIBEIRO SM, QUEIROZ JH, PELUZO MC, COSTA NM, MATTA SL, QUEIROZ ML. The formation and the effects of the reactive oxygen species in biological media. Biosci. J. 2005, 21.(3) 133-149.

RODDA, D.J.; et al. Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. J Biol Chem. 2005, v. 280, n. 26, p. 24731-24737.

RODRIGUES, BP. Efeito do sildenafil na genotoxicidade induzida pelo estresse oxidativo em camundongos ateroscleróticos. Dissertação de mestrado. Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde, 2013.

RODRIGUEZ C, MAYO JC, SAINZ RM; ET AL. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. J Pineal Res. 2004, Jan; 36(1): 1-9.

ROOBROUCK VD, ULLOA-MONTOYA F, VERFAILLIE CM. Self-renewal and differentiation capacity of young and aged stem cells. Exp Cell Res. 2008, 314:1937-1944.

ROSSI DJ, BRYDER D, SEITA J; et al. Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. Nature. 2007, 447:725-9.

ROSSI DJ, BRYDER D, ZAHN JM; et al. Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005, 28;102(26):9194-9.

ROSSIELLO F, HERBIG U, LONGHESE MP; et al. Irreparable telomeric DNA damage and persistent DDR signalling as a shared causative mechanism of cellular senescence and ageing. Curr Opin Genet. 2014, 4;26C:89-95.

SALMINEN A, KAARNIRANTA K, KAUPPINEN A. Inflammaging: disturbed interplay between autophagy and inflammasomes. *Aging*. 2012, 4(3):166-75.

SANZ J E, FAYAD SA. Imaging of atherosclerotic cardiovascular disease. *Nature*. 2008, 21;451(7181):953-957.

SARASTE A, PULKKI K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res*. 2000, 45:528-37.

SARDINA JL, LÓPEZ-RUANO G, SÁNCHEZ-SÁNCHEZ B, LLANILLO M, HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ A. Reactive oxygen species: are they important for haematopoiesis? *Crit Rev Oncol Hematol*. 2012, 81(3):257-74.

SASAKI H, YAMAMOTO H, TOMINAGA K, MASUDA K, KAWAI T, TESHIMAKONDO S, ROKUTAN K. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species are essential for differentiation of a mouse macrophage cell line (RAW264.7) into osteoclasts. *J Med Invest*. 2009, 56(1-2):33-41.

SAUER H, RAHIMI G, HESCHELER J, WARTENBERG M. Role of reactive oxygen species and phosphatidylinositol 3-kinase in cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells. *FEBS Lett*. 2000, 476(3):218-23.

SCHRAM MT, EUSER SM, DE CRAEN AJ et al. Systemic Markers of Inflammation and Cognitive Decline. *J Am Geriatr Soc*. 2007, 55: 708-716.

SCHWEICHEL JU, MERKER HJ. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 1973, 7(3):253-266.

SERENA E, FIGALLO E, TANDON N; et al. Electrical stimulation of human embryonic stem cells: cardiac differentiation and the generation of reactive oxygen species. *Exp Cell Res*. 2009, 315(20):3611-9.

SETSUKINAI K, URANO Y, KAKINUMA K, MAJIMA HJ, NAGANO T. Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. *J Biol Chem*. 2003, 31;278(5):3170-5.

SHOCKLEY, K.R.; et al. PPARgamma2 Regulates a Molecular Signature of Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Res*.2007, p. 81219.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*. 1997, 82:291-295.

SILVA WM, FERRARI CB. Metabolismo Mitocondrial, Radicais Livres e Envelhecimento. *Rev. bras. geriatr. gerontol*. 2011, 14(3):441-451.

SIMSEK T, KOCABAS F, ZHENG J; et al. The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. *Cell Stem Cell*. 2010, 7:380–390.

SOHAL RS, AGARWAL A, AGARWAL S. Simultaneous overexpression copper and zinc containing superoxide dismutase and catalase retards age related oxidative damage and increases metabolic potential in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem*. 1995, 270: 15671-15674.

SONG Z, ZHANG J, JU Z, RUDOLPH KL. Telomere dysfunctional environment induces loss of quiescence and inherent impairments of hematopoietic stem cell function. *Aging Cell*. 2012, 11(3):449-55.

SPOSITO AC, CARAMELLI B, FONSECA FAH, BERTOLAMI MC. IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2007, 88 (1): 2-19.

STENDERUP, K.; et al. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*. 2003, v. 33, n. 6, p. 919-926.

SUDO K, EMA H, MORITA Y, NAKAUCHI H. Age-associated characteristics of murine hematopoietic stem cells. *J Exp Med*. 2000, 6;192(9):1273-80.

TAIT JF, GIBSON DF, SMIT HC. Measurement of the affinity and cooperativity of annexin V-membrane binding under conditions of low membrane occupancy. *Anal Biochem* 2004; 329:112-119.

TAYLOR RC, CULLEN SP, MARTIN SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008, Mar;9(3):231-41

THÈZE J. *The cytokine Network and Immune Functions*. Oxford University Press, New York, 1999.

TIE G, MESSINA KE, YAN J, MESSINA JA, MESSINA LM. Hypercholesterolemia induces oxidant stress that accelerates the ageing of hematopoietic stem cells. *J Am Heart Assoc*. 2014, 27;3(1):e000241.

TONINI CL, CAMPAGNARO BP, LOURO LP, PEREIRA TM, VASQUEZ EC, MEYRELLES SS. Effects of Aging and Hypercholesterolemia on Oxidative Stress and DNA Damage in Bone Marrow Mononuclear Cells in Apolipoprotein E-deficient Mice. *Int J Mol Sci*. 2013, 5;14(2):3325-42.

TOTHOVA Z, GILLILAND DG. FoxO transcription factors and stem cell homeostasis: insights from the hematopoietic system. *Cell Stem Cell*. 2007, 16;1(2):140-52.

TSATMALI M, WALCOTT EC, MAKARENKOVA H, CROSSIN KL. Reactive oxygen species modulate the differentiation of neurons in clonal cortical cultures. *Mol Cell Neurosci*. 2006, 33(4):345–57.

UEDA M, KINOSHITA H, YOSHIDA T, KAMASAWA N, OSUMI M, TANAKA A. Effect of catalase-specific inhibitor 3-amino-1,2,4-triazole on yeast peroxisomal catalase in vivo. *FEMS Microbiol Lett*. 2003, 14;219(1):93-8.

URAO N, USHIO-FUKAI M. Redox Regulation of Stem/Progenitor Cells and Bone Marrow Niche. *Free Radic Biol Med.* 2013 54: 26–39.

VAN ZANT G, LIANG Y. Concise review: hematopoietic stem cell aging, life span, and transplantation. *Stem Cells Transl Med.* 2012 1(9):651-7.

VANDENABEELE P, DECLERCQ W, VAN DEN BERGHE T. Necrotic cell death and ‘necrostatins’: now we can control cellular explosion. *Trends Biochem Sci* 2008; Aug;33(8):352-5.

VANNUCCI SJ, HAGBERG H. Hypoxia-ischemia in the immature brain. *J Exp Biol* 2004, 207:3149-3154.

VARUM S, MOMCILOVIC O, CASTRO C, BEN YEHUDAH A, RAMALHO-SANTOS J, NAVARA CS. Enhancement of human embryonic stem cell pluripotency through inhibition of the mitochondrial respiratory chain. *Stem Cell Res.* 2009, 3(2–3):142–56.

VENDRAME M, GEMMA C, DE MESQUITA D, COLLIER L, BICKFORD PC, SANBERG CD, SANBERG PR, PENNYPACKER KR, WILLING AE. (2005) Anti-inflammatory effects of human cord blood cells in a rat model of stroke. *Stem Cells Dev.* 2005,14(5):595-604.

WALLACE DC. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet,* 2005 39:359–407.

WANG X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 2001; 15(22):2922-2933.

WANG C, YOULE RJ. The role of mitochondria in apoptosis. *Annu Rev Genet* 2009; 43:95–118.

WANG Y, LIU L, ZHOU D (2011) Inhibition of p38 MAPK Attenuates Ionizing Radiation-Induced Hematopoietic Cell Senescence and Residual Bone Marrow Injury. *Radiat Res* 176(6): 743–752.

WEI YH, LEE HC. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Ex Bio Med (Maywood)*. 2002 Oct; 227(9): 671-82.

WEISSMAN IL (2000) Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 7;100(1):157-68.

WILD S, ROGLIC G, GREEN A, SICREE R, KING H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes care*. 2004, 27 (5); 1047-53.

WONG P, BECK AL, BERGLUND P, MCKENAS DK, PRONK NP, GREGORY E, et al. Effects of major depression on moment-in-time work performance. *The American Journal of Psychiatry*. Washington. 2004; v. 161, n.10, p. 1885-1892.

XING Z, RYAN MA, DARIA D, NATTAMAI KJ, VAN ZANT G, WANG L, ZHENG Y, GEIGER H. Increased hematopoietic stem cell mobilization in aged mice. *Blood*. 2006, 108:2190 –2197.

XU B, CHEN S, LUO Y, et al. Calcium signaling is involved in cadmium-induced neuronal apoptosis via induction of reactive oxygen species and activation of MAPK/mTOR network. *PLoS One*. 2011, 6(4):e19052.

YAHATA T, TAKANASHI T, MUGURUMA Y; et al. Accumulation of oxidative DNA damage restricts the self-renewal capacity of human hematopoietic stem cells. *Blood*. 2011, 15;118(11):2941-50.

YAMAGUCHI M, KASHIWAKURA I. Role of reactive oxygen species in the radiation response of human hematopoietic stem/progenitor cells. *PLoS One*. 2013 25;8(7):e70503.

YOON DS, KIM YH, LEE S, LEE KM, PARK KH, JANG Y, LEE JW. Interleukin-6 induces the lineage commitment of bone marrow-derived mesenchymal multipotent cells through down-regulation of Sox2 by osteogenic transcription factors. *FASEB J.* 2014, 28(7):3273-86.

YU JM, WU X, GIMBLE JM, GUAN X, FREITAS MA, BUNNELL BA. Age-related changes in mesenchymal stem cells derived from rhesus macaque bone marrow. *Aging Cell.* 2011, 10:66-79.

YU SP, CHOI DW. Ions, cell volume, and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000, 97:9360-362.

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

ZARUBIN T, HAN J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res* 2005, 15:11-18.

ZHANG J, DAI J, LU Y; et al. In vivo visualization of aging associated gene transcription: evidence for free radical theory of aging. *Experimental Gerontology.* 2004, 39:239–247.

ZHU, Y.; et al. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *Cell. Biochem. Funct.* 2008, v. 26, n. 6, p. 664-675, 2008.

## 9. ANEXO

Artigo em análise para publicação

**Reactive oxygen species contribute to dysfunction of bone marrow hematopoietic stem cells in aged C57BL/6J mice**

**Running title:** Age-related changes in hematopoietic stem cells

Marcella L. Porto<sup>a</sup>, Bianca P. Rodrigues<sup>a</sup>, Thiago N. Menezes<sup>a</sup>, Geisiane S. Bezerra<sup>a</sup>, Sara L. Ceschim<sup>b</sup>, Dulce E. Casarini<sup>c</sup>, Agata L. Gava<sup>a</sup>, Thiago Melo C. Pereira<sup>a,d</sup>, Elisardo C. Vasquez<sup>a,b</sup>, Bianca P. Campagnaro<sup>b</sup>, Silvana S. Meyrelles<sup>a,§</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Translational Physiology, Health Sciences Center, Federal University of Espírito Santo, Vitoria, Brazil;

<sup>b</sup>Pharmaceutical Sciences Graduate Program, Vila Velha University, Vila Velha, ES, Brazil;

<sup>c</sup>Nephrology Division, Department of Medicine, Federal University of Sao Paulo, Sao Paulo, SP, Brazil;

<sup>d</sup>Federal Institute of Education, Science and Technology, Vila Velha, ES, Brazil.

Email addresses:

MLP: [cella.porto@gmail.com](mailto:cella.porto@gmail.com)

BPR: [biancarodrigues02@hotmail.com](mailto:biancarodrigues02@hotmail.com)

TNM: [thiagonmenezes@gmail.com](mailto:thiagonmenezes@gmail.com)

GSB: [geisiane.dsb@gmail.com](mailto:geisiane.dsb@gmail.com)

SLC: [saraceschim@gmail.com](mailto:saraceschim@gmail.com)

DEC: [casarini.elena@unifesp.br](mailto:casarini.elena@unifesp.br)

ALG: [agatagava@hotmail.com](mailto:agatagava@hotmail.com)

TMCP: [pereiratmc@gmail.com](mailto:pereiratmc@gmail.com)

ECV: [evasquez@pq.cnpq.br](mailto:evasquez@pq.cnpq.br)

BPC: [biancacampagnaro@yahoo.com.br](mailto:biancacampagnaro@yahoo.com.br)

SSM: [smeyrelles@pq.cnpq.br](mailto:smeyrelles@pq.cnpq.br)

<sup>§</sup>Corresponding author

## **Abstract**

Stem cells of intensely regenerative tissues are susceptible to cellular damage. Although the response to this process in hematopoietic stem cells (HSCs) is crucial, the mechanisms by which hematopoietic homeostasis is sustained are not completely understood. Aging increases reactive oxygen species (ROS) levels and inflammation, which contribute to increased proliferation, senescence or apoptosis, leading to self-renewal premature exhaustion. In this study, we assessed ROS production, DNA damage, apoptosis, senescence and plasticity in young, middle and aged (2-, 12- and 24-month-old, respectively) C57BL/6 mice. Aged HSCs showed an increase in intracellular superoxide anion (1.4-fold), hydrogen peroxide (2-fold), nitric oxide (1.6-fold), peroxynitrite/hydroxyl (2.6-fold) compared with young cells. We found that mitochondria and NADPHox were the major sources of ROS production in the three groups studied, whereas CYP450 contributed to middle and aged, and xanthine oxidase only to aged, HSCs. In addition, we observed DNA damage and apoptosis in the middle (4.2- and 2-fold, respectively) and aged (6- and 4-fold, respectively) mice; aged mice also exhibited a significantly shorter telomere length (-1.8-fold) and a lower expression of plasticity markers. These data suggest that aging impairs the functionality of HSCs and that these age-associated alterations may affect the efficacy of aged HSC recovery and transplantation.

**Key words:** aging, oxidative stress, hematopoietic stem cell, DNA damage, apoptosis, senescence

**Abbreviations:** catalases (CAT), cytochrome P450 (CYP450), glutathione peroxidases (GPx), hematopoietic stem cells (HSC), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interleukin-12p70 (IL-12), interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10), lymphoid cells (L), myeloid cells (M), NADPH oxidases (NADPHox), reactive oxygen species (ROS), superoxide dismutases (SOD), tumoral necrosis factor (TNF), xanthine oxidase (XO).

## **Introduction**

Stem cells are important for the maintenance of functional tissues and organs and have the abilities to self-renew and replace damaged cells [1]. However, this finely tuned regulatory system may become altered with aging [2]. In fact, recent studies have suggested that the ability to successfully regenerate cells/tissues is gradually lost with aging, as justified by multiple physiological changes at the molecular, cellular, organ, and system levels that occur via mechanisms that are not fully understood [3]. Therefore, the mechanisms that lead to biochemical and cellular age-related alterations in the most primitive cells of hematopoietic system are under investigation in some laboratories.

It is well known that hematopoietic stem cells (HSCs) from aged donor mice have negative effects on stem-cell homing and engraftment [4], are more easily mobilized into the peripheral blood [5] and are therapeutically less efficient [6]. Although some researchers have highlighted the impact of aging on HSCs, the molecular events that trigger the biology of aging remain unclear. In both mice and humans, researchers have profiled the expression of the genes involved in genomic integrity and transcriptional regulation and have observed the downregulation of these genes in aged cells to be a consequence of high levels of reactive oxygen species (ROS) [7,8] in different diseases [9].

Conventionally, though the quiescence of HSCs is related to low levels of ROS, their proliferation, senescence and apoptosis have been attributed to a status of increased ROS production, which can lead to the premature exhaustion of self-renewal in these cells [10,11]. Although the relative contributions of different pathways in ROS production are still poorly explored, oxidative stress must be considered an important cause of bone marrow HSC dysfunction during the aging process. In this study, we analyzed the effects of biological aging on the molecular pathways of ROS production in HSCs. Our findings show a novel age-

dependent decline in HSC function that correlates with increased ROS production by different sources. These data suggest that aging impairs the functionality and quality of HSCs and may affect the efficacy of aged HSC recovery and use in transplantation procedures.

## **Materials and Methods**

### **Animals**

Experiments were performed in young, middle and aged (2-, 12- and 24-month-old, respectively) male C57BL/6 (C57) mice that were bred and maintained in the Laboratory of Translational Physiology animal facility (Vitoria, ES, Brazil). The mice were fed a standard chow diet and provided water ad libitum. Animals were housed in individual plastic cages with controlled temperature (22°C) and humidity (60%) and were exposed to a 12/12 h light-dark cycle. All of the experimental procedures were performed in accordance with the National Institutes of Health (NIH) guidelines. Mice were euthanized with sodium thiopental overdose (100 mg/kg, intraperitoneal injection). Care and use of laboratory animals were in accordance with NIH guidelines. All experiments were conducted in compliance with the guidelines for biomedical research, as stated by the Brazilian Societies of Experimental Biology, and were approved by the Institutional Ethics Committee - Emescam College of Health Sciences (CEUA-EMESCAM 014/2011).

### **Blood and Bone Marrow Samples**

The mice were euthanized, blood was collected for a complete blood count (CBC) and the femurs and tibiae were removed. The marrow cavities were flushed with sterile Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Cell suspension were placed in culture with DMEM supplemented with 20% FBS (Gibco Life Technologies, São Paulo, SP, Brazil), 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. An aliquot of the cell suspension was counted on a hemocytometer chamber. To enrich the hematopoietic progenitor cell fraction, lineage committed cells were depleted. The cell suspension ( $1-2 \times 10^7$  cells/mL) was labeled with the Mouse Hematopoietic Stem Cell Enrichment Set containing antibodies against CD3e (CD3  $\epsilon$  chain), CD11b (Integrin  $\alpha$ M chain), CD45R/B220, Ly-6G

and Ly-6C (Gr-1), and TER-119/Erythroid Cells (Ly-76) (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) for 15 minutes on ice. Subsequently, the cell suspension was incubated with magnetic nanoparticles at 6 - 12°C for 30 minutes. The cell suspension was loaded into an Imagnet column (BD), and the unlabeled cells that passed through the column were collected (Lin<sup>-</sup> fraction). The column was then washed twice with 1 mL of buffer, and the remaining Lin<sup>-</sup> cells were collected.

### **Cell Staining**

To enrich stem/progenitor hematopoietic stem cell, Lin<sup>-</sup> cells were stained with monoclonal antibodies conjugated to different fluorochromes. These antibodies included: Sca-1(BD), CD133 (eBioscience, San Diego, CA, USA), c-kit (BD), Thy-1<sup>lo</sup> (BD) and the appropriate isotype controls. HSCs were defined as c-kit<sup>+</sup> Thy-1<sup>lo</sup>Lineage<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>(KTLS) CD133<sup>+</sup> in this study. No differences were found in the fluorescent intensity among the groups (data not shown). The expression of the intracellular pluripotency markers was also analyzed by labeling cells with three fluorochrome-conjugated antibodies: Oct3/4, Sox-2 and Nanog (BD), according to the manufacturer's instruction.

### **Cell Cycle Analysis**

Cell cycle distribution was evaluated by flow cytometry. Prior to staining, 1x10<sup>6</sup> cells were washed with PBS. The cells were treated with 50 µL of RNase (1 mg/mL) and 100 µL propidium iodide (PI, 400 µg/mL) (Sigma-Aldrich) for 30 min at 37°C in the dark. The fluorescence of the stained cells was analyzed by flow cytometry, and the relative percentage of gated cells in each cell cycle phase was determined [12].

### **Measurement of Cytokine Levels**

Cytokine (IL-12p70, TNF, IFN-γ, IL-10 and IL-6) levels were measured in the supernatants by flow cytometry using a Cytometric Bead Array – Mouse Inflammation Kit, according to the manufacturer's instructions (BD). For these analyses, a typical forward and side scatter

gate was set to exclude aggregates; a total of 5000 events in the gate were analyzed using FACSCanto II and FACSDiva Software (BD). The samples were quantified by comparison with standard curves of recombinant mouse cytokines using FCAP Array software. The results were expressed as pg/mL.

### **Measurement of intracellular ROS and hROS**

ROS analysis was performed by flow cytometry as previously described [11].

Dihydroethidium (DHE, 160  $\mu$ M) and 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF, 20 mM) were added to the cell suspension ( $10^6$  cells) and incubated at 37°C for 30 min in the dark to estimate the intracellular  $\bullet\text{O}_2^-$  or  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration, respectively. The measurement of nitric oxide (NO) was performed as previously described (Dias et al., 2014). Briefly, the NO-sensitive fluorescent probe 4,5-diaminofluorescein-2/diacetate (DAF, 2  $\mu$ M) was added to cell suspension ( $10^6$  cells) and incubated at 37°C for 180 minutes in the dark. Highly reactive oxygen species (hROS), such as hydroxyl radical and peroxynitrite, were selectively detected by 2-[6-(4'-hydroxy)phenoxy-3H-xanthen-3-on-9-yl]benzoic acid (HPF). 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). For the quantification of DHE, DCF, DAF and HPF fluorescence, the samples were acquired in duplicate and 10,000 events were used for each measurement. The cells were excited at 488 nm; DHE fluorescence was detected using a 585/42 bandpass filter, and DCF/DAF/HPF fluorescence was detected using a 530/30 bandpass filter. The data are expressed as the median fluorescence intensity.

### **Identification of the source of oxidative stress**

The cells were incubated in the presence of the inhibitors based on previous experiments [14] and ROS production was analyzed using DHE and DCF probes following established protocols from our laboratory [12]. The inhibitor concentrations were as follows: 100  $\mu$ M

clotrimazole for 10 minutes, 600  $\mu$ M apocynin for 10 minutes, 100  $\mu$ M allopurinol for 10 minutes, and 1  $\mu$ M Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) for 45 minutes. To investigate a decline in the capacity of the antioxidant enzyme system, 3 inhibitors were used: SOD - Sodium diethyldithiocarbamate (DDC) 500  $\mu$ M for 16 hours, CAT - 3-Amino-1,2,4-triazole (3-AT) 20 mM for 2 hours and GPx - mercaptosuccinic acid 50  $\mu$ M for 2 hours.

### **Measurement of oxidized DNA by alkaline comet assay**

DNA damage was assessed using alkaline single cell gel electrophoresis (the alkaline comet assay), following established protocols from our laboratory [12]. In brief, histological slides were pre-coated with 1.5% normal melting point agarose in PBS in a water-bath at 65°C. Subsequently, 20  $\mu$ L of the cell suspension was embedded in 100  $\mu$ L 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 40 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 for 1 hour. Migration of the DNA fragments towards the anode creates a comet 'tail' as visualized by staining with ethidium bromide (20  $\mu$ g/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).

### **HSC Apoptosis**

Apoptotic HSCs were quantified by annexin V-FITC and propidium iodide (PI) double staining using the annexin V-FITC apoptosis detection kit (BD). In brief, the cells were washed twice with PBS and adjusted to 500  $\mu$ L in binding buffer ( $5 \times 10^5$  cells). Then, annexin

V-FITC and PI were added to cell suspension, and the cells were gently vortexed. The cells were then incubated for 15 min at room temperature (25°C) in the dark. Finally, the cells were analyzed by flow cytometry using a FACSCanto II (BD). Necrotic cells were defined as annexin V<sup>-</sup>/PI<sup>+</sup>, late apoptotic or secondary apoptotic were defined as annexin V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>, and annexin V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> cells were recognized as early or primary apoptotic cells [12].

### **Telomere Length Measurement**

Telomere length was measured with the telomere PNA kit/FITC (DAKO Denmark, Glostrup, DK). In brief, the sample DNA was denatured for 10 minutes at 82°C in microcentrifuge tubes either in the presence of hybridization solution without probe or in hybridization solution containing a fluorescein-conjugated PNA telomere probe. The hybridization then took place in the dark at room temperature overnight, followed by two 10-minute post-hybridization washes with a wash solution at 40°C. The sample was then resuspended in the appropriate buffer for further analysis by flow cytometry. The DNA Staining Solution included in the kit was used for the identification of G0/1 cells. After flow cytometry analysis, the data obtained were used to determine the relative telomere length (RTL). The RTL value was calculated as the ratio between the telomere signal of each sample and the control cells (1301 cell line) with correction for the DNA index of G0/1 according to manufacturer's instructions.

### **Assessment of lysosomal content**

Quantification of the cellular lysosomal mass was carried out by flow cytometry. The cells were stained with Acridine Orange as described before [15]. Briefly, 0.2 mL of cell suspensions were gently admixed with a solution containing 0.08 M HCl, 0.1% Triton X-100 (Sigma), and 0.15 M NaCl on ice. After 15 sec, the ice-cold solution containing 1 mg/ml of AO (Invitrogen, Eugene, OR), 1 mM EDTA-Na, and 0.15 M NaCl in phosphate-citric acid buffer (pH 6.0) was added for 10 min. The photomultiplier settings on the flow cytometer

were adjusted to detect the green fluorescence signal of Acridine Orange (mostly due to nucleic acid staining) on the 530/30 nm bandpass filter and the orange fluorescence signal (due to lysosomal staining) on the 585/42 nm bandpass filter.

### **SA- $\beta$ -gal activity analysis**

HSC senescence activity was determined using a SA- $\beta$ -gal staining kit (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instruction. Briefly, the cells were washed with PBS and fixed in 2% formaldehyde–0.2% glutaraldehyde. Then, the cells were washed and incubated at 37°C overnight with fresh senescence-associated  $\beta$ -gal staining solution (1 mg 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside [XGal] per mL, 40 mM citric acid–sodium phosphate [pH 6.0], 150 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM potassium ferrocyanide, 5 mM potassium ferricyanide). Senescent cells were identified as blue-stained cells by standard light microscopy, and a total of 1000 cells were counted in random fields on a slide to determine the percentage of SA- $\beta$ -gal–positive cells. Photography of cells was performed on microscope (Nikon Eclipse Ti, Melville, NY, EUA) equipped with CCD camera (Nikon).

### **Statistical Analysis**

Data are presented as mean  $\pm$  SEM. The normality of the variables was evaluated using the Kolmogorov–Smirnov test. Analyses of variance (ANOVA) were performed using Graphpad prism 6 software followed by Tukey's multiple comparison tests to establish statistical significance between experimental groups at the  $p < 0.05$  (\*) level.

## Results

### Aging stimulates cell cycling and myeloid skewing

To evaluate the impact of aging on HSCs (c-kit<sup>+</sup> Thy-1<sup>lo</sup>Lineage<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>), we determined the number of cells and proliferation by cell cycle analysis (Table 1) and complete blood count (CBC) (Table 2). We observed a 3.3-fold increase in the number of HSCs during the lifespan (p<0.05) when comparing aged and young mice. The cell cycle profile revealed an increased proliferation rate in HSCs from aged mice compared with young and middle mice, indicating that more HSCs began cycling with age (Table 1). Moreover, we observed a change in the number of mature hematopoietic cells in the peripheral blood. The increased engraftment of the myeloid lineage (1.6-fold, p<0.05) and loss of lymphopoiesis support (-1.3-fold, p<0.05) by aged HSCs was observed compared with young mice (Table 2). These data suggest that the natural aging process causes increased proliferation rates of HSCs, lymphoid senescence and myeloid skewing.

### Inflammatory cytokines are increased during aging

Aging is characterized by an increase in the levels of pro-inflammatory markers, which may contribute to impaired bone marrow HSC function and result in a state of chronic inflammation or “inflamm-aging” [16]. The pro-inflammatory cytokines IL-12p70, IL-6 and TNF can act as growth factors to stimulate proliferation. The data obtained by flow cytometry showed both locally (Table 1) and systemically (Table 2) increased levels of myeloid pro-inflammatory molecules in aged mice compared with young mice. However, no differences were found in the concentrations of IL-10 and IFN- $\gamma$ , which could be expected to counteract the effects of pro-inflammatory cytokines.

### Measurement of ROS production

Based on previous experiments showing that high levels of ROS represent a key mechanism for intrinsic HSC dysfunction [10,17], we evaluated the intracellular ROS levels in HSCs in the three groups of animals. As illustrated in the top panel and summarized in the bar graphs of Figure 1, we observed a clear age-related increase in ROS production. Specifically, our data showed significant increases in the levels of superoxide anion ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) and nitric oxide (NO) only in aged HSCs (1.4- and 1.6-fold, respectively) and augmentation in the hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) and the peroxynitrite/hydroxyl ( $\bullet\text{ONOO}^-/\bullet\text{OH}^-$ ) levels in both middle (1.2-, 1.4-fold, respectively) and aged (2-, 2.6-fold, respectively) compared with young HSCs ( $p < 0.05$ ). This imbalance between ROS production and degradation could lead to genomic instability and, consequently, permanent changes in the genetic material.

### **Sources of ROS and antioxidant enzyme capacity in HSCs**

Considering that little is known about which pathways are involved in ROS production in HSCs and the stimuli of cell intrinsic alterations that trigger HSC aging, we evaluated the relative contributions of different pathways, which could lead to augmented ROS production and/or the loss of antioxidant capacity. To achieve our goal, we blocked the main sources of ROS and measured the fluorescent intensities of DHE and DCF. Figure 2 shows the average changes in pro-oxidative and anti-oxidative pathways in the three different age groups. We observed that in young animals the mitochondria and NADPHox represented the major pro-oxidative sources in HSCs. In the middle group, CYP450 contributed significantly in addition to these two sources. In aged HSCs, all of the investigated sources in this study actively contributed to the high levels of ROS production (NADPHox, mitochondria, CYP450 and XO). In a separate set of experiments, to investigate the involvement of the anti-oxidative pathways in the process of aging, we blocked three important enzymes: SOD, CAT and GPx. Our data showed high activity of these three anti-oxidative pathways in HSCs from young animals. In contrast, HSCs from middle mice exhibited a significant impairment in CAT and

GPx function, which was more greatly impaired in cells from aged mice that showed reduced activity in the entire system compared with HSCs from young mice.

### **DNA damage and apoptosis**

In this study, we used an alkaline comet assay to evaluate DNA damage. In this assay, most of the DNA damage is expressed by the percentage of DNA in the tail, which represents the number of fragments that migrated during electrophoresis, and the comet tail moment, which is an index of both the migration of the genetic material and the relative amount of DNA in the tail [11]. Figure 3A shows a remarkable increase in DNA fragmentation in HSCs from middle (4.2-fold) and aged (5.9-fold) mice compared with young mice in the tail moment parameter ( $p < 0.05$ ). Moreover, HSCs from middle and aged mice showed more DNA in the tail (2.8- and 3.3-fold, respectively) compared with HSCs from young mice ( $p < 0.05$ ). High ROS levels are frequently associated with an increase in DNA fragmentation and, consequently, more apoptosis [11].

An analysis of apoptosis can be used to assess aging and survival in the hematopoietic compartment. Figure 3B shows that cell viability was reduced throughout the life span. Middle and aged mice showed a significant increase in the percentage of cells in early apoptosis (10% and 14%, respectively), as defined by annexin-V+/PI-, compared with young mice (4%). In contrast, only aged HSCs demonstrated a remarkable change in late apoptosis (4%), as defined by annexin-V+/PI+, compared with young (0.1%,  $p < 0.05$ ) and middle (0.3%,  $p < 0.05$ ) mice. Necrosis, defined as annexin-V-/PI+, increased in middle and aged HSCs (~5%) compared with the young group (~1.5%,  $p < 0.05$ ). The increase in ROS levels during the life span was positively correlated with the increase in apoptosis. These data suggest that increased ROS production in aged HSC may be involved in the apoptotic signaling pathway.

### **Senescence**

To investigate the effects of aging on HSCs, we performed a senescence assay- $\beta$ -gal (SA- $\beta$ -gal), which is one of the most widely used biomarkers for aging cells [11]. As illustrated in Figure 4 (A, top panel), the cytoplasm of senescent cells stains blue allowing easy identification. The aging process induced a remarkable increase in the percentage of SA- $\beta$ -gal positive HSCs (~10%) compared with young and middle (~1.5%) animals, as summarized in the bar graphs (Fig. 4A). To investigate senescent characteristics, we evaluated telomere length and lysosomal mass. Telomere shortening limits the cell proliferation capacity to a finite number of cell divisions. The accumulation of DNA damage and telomere dysfunction can contribute to the decline of stem cell maintenance and function [8]. In the present study, the HSC telomere length was shortened in approximately 80% ( $p < 0.05$ ) of aged and 23% of middle mice compared with young mice, suggesting reduced telomerase activity in aged mice (Fig. 4B). We also observed a remarkable inverse correlation between the intracellular ROS levels and the relative telomere length in HSC from middle and aged ( $r = -0.9$ ,  $p < 0.05$ ) mice (Fig. 4B, top panel). Then, we investigated whether the senescence could also result from changes in lysosomal mass. Our data indicated an increased side scatter profile in the HSC aged group (SSC), which is an indicator of cellular granularity (data not shown). Finally, we also performed a flow cytometry analysis of Acridine Orange (AO) fluorescence, and the aged group showed a dramatic increase of ~90% compared to middle and young mice (Fig. 4C). Therefore, the increase in both SSC and AO fluorescence is indicative of augmented lysosomal content in aging cells [15]. Moreover, the increase in AO fluorescence correlated closely with the increase in ROS levels observed in the aged group (Fig. 4C, top panel). Altogether, these data indicate that high ROS levels can trigger senescence.

### **Cell fate and self-renew are impaired in HSC bone marrow niche**

ROS-induced DNA damage is associated with the loss of regenerative capacity, self-renewal dysfunction and cell cycle arrest of HSCs. We tested the hypothesis that the high ROS levels

observed in aged HSCs may influence the expression profile of the Oct-3/4, Sox-2 and Nanog transcription factors (ONS) derived from young, middle and old bone marrow. As illustrated in Figure 5 (bottom panels), our data showed that ONS expression was significantly decreased in aged HSCs compared with the middle and young groups (Oct-3/4: -50%; Sox-2: -30%; Nanog: -23%,  $p < 0.05$ ). This finding in aged HSC supports the idea that the loss of the regenerative capacity and self-renewal of these cells is correlated with the high ROS levels (Fig. 5, top panels).

## **Discussion**

In the present study, we investigated age-related changes in HSC function and found an increase in the number of cells, prevalence of cells in the cycling phases, and a myeloid skewing of committed hematopoietic cells that was induced by the high levels of proinflammatory cytokines. The novel finding of this study was the characterization of the major sources of ROS production in HSCs, which occurred in an aging-dependent manner. Our data show that the consequences of ROS accumulation in HSCs include DNA damage, apoptosis, senescence and the loss of multipotency of these aged cells.

### **HSC number, cell cycle, cbc and cytokines**

Previous experimental and clinical data have shown that aging promotes the increase of HSCs number in the bone marrow [18,19]. In our study, we also observed high HSC proliferative activity that was associated with aging, which in turn was associated with an approximately 10% increase in the number of cells in the S/G2/M phases of cell cycle in aged mice. Initially, we speculated that this augmented proliferative activity might be a fundamental compensatory mechanism to maintain the lymphopoiesis and self-renewal functions of these HSCs. However, we detected that the aging process resulted in a decrease of lymphopoiesis and in myeloid skewing. Moreover, our data revealed a change in CBC and an increase in the

myeloid-derived cytokine levels (IL-6, TNF, IL-12), without alterations in the lymphoid-derived cytokines (IFN- $\gamma$ , IL-10). Our data are in accordance with those of other studies, which showed that aged HSC are more actively cycling and preferentially differentiating toward myelopoiesis [7,8]. Because oxidative stress is involved in the induction of systemic and local myeloid cytokines production [20] and because HSCs are extremely sensitive to the extensive accumulation of ROS [21], we used flow cytometry to investigate whether excessive ROS production could contribute to the amplification of myeloid skewing over time.

### **ROS overproduction in aged HSCs**

It is known that bone marrow HSCs with low ROS activity exhibit normal lymphoid production, which allows them to maintain their quiescence and self-renewal potential [22]. Some mechanisms appear to protect HSC from oxidative stress, such as antioxidant enzyme status and preferential anaerobic glycolysis instead of oxidative phosphorylation to ATP production [23]. In our study, we observed that the protection against this oxidative stress was lost in the aging process; we detected higher levels of ROS production in aged HSCs with different probes. Aged mice exhibited high levels of all molecules, as indirectly measured by flow cytometry:  $\bullet\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , NO, including the strongest oxidant produced in biological systems:  $\bullet\text{ONOO}^-$  and  $\bullet\text{OH}$ . These data complement and strengthen those obtained in previous studies regarding ROS detection [17,24] and highlight the possible contribution of oxidative stress for myeloid skewing over time.

### **Sources of ROS and antioxidant enzyme activity**

Several studies have demonstrated that all cell types produce ROS in multicellular organisms [25,26]; although the mitochondria has traditionally been considered the main source of intracellular ROS [27], other enzymatic systems also contribute to ROS generation, including NADPHox [28], xanthine oxidase (XO), cyclooxygenases, CYP450 complex, nitric oxide

synthase and lipoxygenases [29]. However, prior to the present study, little was known about which sources of ROS are involved in aging and, more specifically, which pathways are involved in bone marrow HSCs. For this purpose, we tested the hypothesis that at least four main sources could be involved in ROS overproduction during the life span. The data obtained through the use of specific pharmacological blockers confirmed the idea that the mitochondria and NADPHox are the major sources of ROS in young HSCs, as reviewed by Urao and Ushio-Fukai (2013)[30]. However, in the present study, we expanded the time-course, and our data revealed a different profile for ROS sources. For instance, CYP450 played a relevant role in both middle and aged HSCs, and XO was an important source in aged HSCs.

The process of aging generates an inflamm-aging environment, in which higher levels of ROS may activate inflammatory mediators and vice-versa [31]. We observed different complexes contributing to an increase in oxidative stress and the augmentation of local and systemic proinflammatory cytokines. Our data are consistent with those of other studies demonstrating that elevated ROS activity in aged bone marrow has the ability to induce local mediators of inflammatory production [20] and that aging increases the systemic cytokine levels [22].

In relation to antioxidant enzymes, we observed that in HSCs from middle mice, the SOD activity was preserved but the CAT and GPx were impaired, which could explain the accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and the maintenance of •O<sub>2</sub><sup>-</sup> levels compared with young HSCs.

Conversely, in aged HSCs, there was an impairment of all three antioxidant enzymes, which may directly reflect ROS augmentation. As a consequence of this process, high intracellular ROS production may be involved in cellular signaling and may regulate different mediators [32]. Among them, the forkhead homeobox type O (FoxO) transcription factors appear to be critical mediators of the cellular responses to oxidative stress. For instance, it has been demonstrated that the lack of FoxO subtypes in HSCs down-regulates the expression of

antioxidant enzymes (such as SOD and catalase) and consequently leads to an increase in ROS levels within the HSC compartment [33]. Based on these data, we speculated that aging may impair the expression of the FoxO family and consequently diminish the anti-oxidative enzyme levels.

### **DNA damage and apoptosis**

ROS are highly reactive and can oxidize nucleic acids, proteins and lipids [12,13]. We performed an alkaline comet assay to assess single- and double-strand breaks in DNA from young, middle and aged HSCs. Our data showed a strong correlation among ROS production, DNA damage and apoptosis. As expected, DNA fragmentation, cell death and ROS production were aggravated in the aged HSCs. Our data are in agreement with those of Rossi et al. (2007) [8], who investigated the HSC reserves and function in aged mice, which are deficient in several genomic maintenance pathways, including nucleotide excision repair, telomere maintenance and non-homologous end-joining with elevated levels of apoptosis. Moreover, Jang et al. (2007) [10] demonstrated that although low levels of ROS are involved in the maintenance of quiescence in HSCs, higher levels of ROS contribute to greater proliferation, senescence or apoptosis, which in turn lead to the premature exhaustion of self-renewal in these cells. We observed that high ROS production leads to the accumulation of DNA damage. Cells in which the damage can be repaired may continue through the cell-cycle, whereas those that have suffered irreparable DNA damage undergo apoptosis or cell-cycle arrest [34]. Therefore, the causative role of augmented ROS production in the loss of cell viability is substantiated by increased DNA fragmentation. This is favored by an augmented cell proliferation rate, suggesting that ROS can act as secondary messengers to modulate multiple cell signaling pathways.

### **HSC Senescence**

Oxidative stress is a determining factor of cellular senescence, a biologically active response that contributes to tissue aging through at least two mechanisms [8,35]: first, intrinsically, through the inability to further proliferate to replace tissues with new cells, and second, by up-regulating genes that encode inflammatory cytokines, growth factors and extracellular-matrix-degrading enzymes [35]. Then, we investigated the impact of aging on cellular senescence using a SA- $\beta$ -gal assay and AO fluorescence, which indirectly reflects the lysosome malfunction; when the property of autophagy is lost, the lysozymes accumulate in the aging cells [15,36]. In the present study, we found that both the number of SA- $\beta$ -gal positive HSCs and AO fluorescence were increased in aged mice. These results indicate that cell senescence increases the level of  $\beta$ -galactosidase activity and lysosomal content in aged cells.

To confirm senescence using a second, well-established procedure, we investigated the shortening of telomeres. Indeed, dysfunctional telomeres have been found in senescent cells *in vivo* in primates, and it is known that the loss of telomerase function in mice causes the senescence and physiological impairment of many tissues [35]. In our study, aged HSCs showed shorter telomeres than did HSCs from the young group. However, it should be noted that not all studies have detected the association between telomere shortening and senescence [24] because cellular senescence may occur in an independent manner [37]. Furthermore, a decline in autophagic capacity caused by aging leads to an accumulation of damaged mitochondria and, consequently, to an increase in ROS production, which can stimulate the secretion of proinflammatory cytokines and accelerate the aging process, the so-called inflamm-aging condition [31].

### **HSC ONS Transcription Factors**

The control of cellular fating is a complex process in which the cell must coordinate many different signals [38]. Considering the importance of ROS in cellular signaling and the regulation of gene expression, it is feasible that ROS are involved in cell differentiation [32].

We next evaluated the age-related changes in cell plasticity and self-renewal. The uniform expression of hematopoietic markers (KTLS CD133<sup>+</sup> fraction: c-kit<sup>+</sup> Thy-1<sup>lo</sup>Lineage<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>) in each group, as observed in this study, indicates homogeneity in the isolated bone marrow-derived HSC population and does not necessarily correlate with plasticity. Conversely, the progressive loss of pluripotent transcription factors is an indication of the age-related loss of multipotency. For instance, it is well documented that the combinatorial transcription factor interaction network of ONS is associated with pluripotency and stemness in embryonic stem cells [24]. Interestingly, our results revealed age-related changes in the ONS expression profile. Similarly, Assumda et al. (2011) [39] found the decreased expression of ONS markers in bone marrow-derived mesenchymal stem cells from old rats. Moreover, a recent study showed stemness loss and lineage commitment of multipotent populations induced by the inflammatory cytokine secretion of senescent-like cells [40]. Our data suggest that increased levels of intracellular ROS diminish ONS positivity, as observed through the negative correlation between ONS and ROS (Fig. 5). In accordance with this hypothesis, recent studies have demonstrated the importance of ROS in cell differentiation in the mouse and human [41,42] and that human embryonic stem cell pluripotency can be improved through reduced levels of ROS [43]. Although the exact role of ROS in stemness has yet to be clarified, it is now clear that redox homeostasis should be strictly regulated to avoid HSC exhaustion.

## **Conclusion**

The lifelong potential of HSCs has led to the hypothesis that these cells could preserve both stemness function and integrity. However, the present study provides new evidence that reveals that cellular and molecular changes occur in HSCs during aging. We investigated aspects of HSCs, including self-renew, survival, differentiation, proliferation and

mobilization. We observed that aged mice exhibited an increase in HSC number, myeloid skewing, damaged DNA, fewer quiescent cells and more cells in S/G2/M phase of the cell cycle. Apoptosis and senescence may have increased to control age-dependent alterations. The scheme proposed in Figure 6 emphasizes oxidative stress, the impairment in antioxidant defenses and inflammation as the most important stimuli leading to age-related changes observed in the bone marrow niche. Therefore, our model contributes to a better understanding of age-related changes in stem cells and may be helpful in explaining the degenerative changes observed in organs during aging.

### **Acknowledgments**

We are grateful to Tommasi Laboratory analysis and Bioclin kits.

### **Author contributions**

MLP carried out experimental analysis and acquisition of data, analysis and interpretation of the data and drafted the manuscript. BPR, TNM, GSB and SLC participated in data acquisition, analysis and interpretation. DEC, ALG and TMCP participated in the supervision and in the critical revision of the manuscript. ECV, BPC and SSM contributed to the conception, design and supervision of the study and interpretation of data. All authors read and approved the final version of the manuscript.

### **Funding**

SSM is supported by the National Council for the Development of Science and Technology (CNPq, Ref.305188/2012-7 Grant) and the State Agency for the Development of Science and Technology (FAPES/CNPq/Pronex Grant 012/2009). ECV is supported by CNPq (Ref.

302582/2011-8 and 476525/2012-8 Grants). ALG is supported by CNPq (Ref. 473177/2013-7 Grant). TMCP is supported by CNPq (Ref. 445080/2014-0 Grant).

**Conflict of interest**

The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Insinga A, Cicalese A, Pelicci PG: **DNA damage response in adult stem cells.** *Blood Cells Mol Dis* 2014 **52**(4):147-51.
2. Van Zant G, Liang Y: **Concise review: hematopoietic stem cell aging, life span, and transplantation.** *Stem Cells Transl Med* 2012 **1**(9):651-7.
3. Dumble M, Moore L, Chambers SM, Geiger H, Van Zant G, Goodell MA, Donehower LA: **The impact of altered p53 dosage on hematopoietic stem cell dynamics during aging.** *Blood* 2007 **15**;109(4):1736-42.
4. Liang Y, Van Zant G, Szilvassy SJ: **Effects of aging on the homing and engraftment of murine hematopoietic stem and progenitor cells.** *Blood* 2005 **15**;106(4):1479-87.
5. Xing Z, Ryan MA, Daria D, Nattamai KJ, Van Zant G, Wang L, Zheng Y, Geiger H: **Increased hematopoietic stem cell mobilization in aged mice.** *Blood* 2006 **108**:2190–2197.
6. Rauscher FM, Goldschmidt-Clermont PJ, Davis BH, Wang T, Gregg D, Ramaswami P, Phippen AM, Annex BH, Dong C, Taylor DA: **Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis.** *Circulation* 2003 **29**;108(4):457-63.
7. Chambers SM, Shaw CA, Gatz C, Fisk CJ, Donehower LA, Goodell MA: **Aging hematopoietic stem cells decline in function and exhibit epigenetic dysregulation.** *PLoS Biol* 2007 **5**(8):e201.
8. Rossi DJ, Bryder D, Seita J, Nussenzweig A, Hoeijmakers J, Weissman IL: **Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age.** *Nature* 2007 **447**:725-9.

9. Vasquez EC, Peotta VA, Gava AL, Pereira TM, Meyrelles SS. **Cardiac and vascular phenotypes in the apolipoprotein E-deficient mouse.** *J Biomed Sci* 2012 **13**;19:22.
10. Jang Y-Y, Sharkis SJ: **A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche.** *Blood* 2007 **110**:3056–3063.
11. Tonini CL, Campagnaro BP, Louro LP, Pereira TM, Vasquez EC, Meyrelles SS: **Effects of Aging and Hypercholesterolemia on Oxidative Stress and DNA Damage in Bone Marrow Mononuclear Cells in Apolipoprotein E-deficient Mice.** *Int J Mol Sci* 2013 **5**;14(2):3325-42.
12. Campagnaro BP, Tonini CL, Doche LM, Nogueira BV, Vasquez EC, Meyrelles SS: **Renovascular hypertension leads to DNA damage and apoptosis in bone marrow cells.** *DNA Cell Biol* 2013 **32**(8):458-66.
13. Dias AT, Rodrigues BP, Porto ML, Gava AL, Balarini CM, Freitas FP, Palomino Z, Casarini DE, Campagnaro BP, Pereira TM, Meyrelles SS, Vasquez EC: **Sildenafil ameliorates oxidative stress and DNA damage in the stenotic kidneys in mice with renovascular hypertension.** *J Transl Med* 2014 **6**;12:35.
14. McNally JS, Davis ME, Giddens DP, Saha A, Hwang J, Dikalov S, Jo H, Harrison DG: **Role of xanthine oxidoreductase and NAD(P)H oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003 **285**(6):H2290-7.
15. Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD: **Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells.** *J Cell Sci* 2000 **113** **20**:3613-22.

16. Franceschi C, Bonafe M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, De Benedictis G: **Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence.** *Ann N Y Acad Sci* 2000 **908**:244–54.
17. Ito K, Hirao A, Arai F, Matsuoka S, Takubo K, Hamaguchi I, Nomiyama K, Hosokawa K, Sakurada K, Nakagata N, Ikeda Y, Mak TW, Suda T: **Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells.** *Nature* 2004 **431**:997–1002.
18. de Haan G, Nijhof W, Van Zant G: **Mouse Strain-Dependent Changes in Frequency and Proliferation of Hematopoietic Stem Cells During Aging: Correlation Between Lifespan and Cycling Activity.** *Blood* 1997 **89**:1543–1550.
19. Kuranda K, Vargaftig J, de la Rochere P, Dosquet C, Charron D, Bardin F, Tonnelle C, Bonnet D, Goodhardt M: **Age-related changes in human hematopoietic stem/progenitor cells.** *Aging Cell* 2011 **10**:542–546.
20. Zhang J, Dai J, Lu Y, Yao Z, O'Brien CA, Murtha JM, Qi W, Hall DE, Manolagas SC, Ershler WB, Keller ET: **In vivo visualization of aging associated gene transcription: evidence for free radical theory of aging.** *Experimental Gerontology* 2004 **39**:239–247.
21. Yamaguchi M, Kashiwakura I: **Role of reactive oxygen species in the radiation response of human hematopoietic stem/progenitor cells.** *PLoS One* 2013 **25**;8(7):e70503.
22. Chinn IK, Blackburn CC, Manley NR, Sempowski GD: **Changes in primary lymphoid organs with aging.** *Semin Immunol.* 2012 **24**(5):309-20.
23. Simsek T, Kocabas F, Zheng J, Deberardinis RJ, Mahmoud AI, Olson EN, Schneider JW, Zhang CC, Sadek HA. **The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche.** *Cell Stem Cell* 2010 **7**:380–390.

24. Yu JM, Wu X, Gimble JM, Guan X, Freitas MA, Bunnell BA: **Age-related changes in mesenchymal stem cells derived from rhesus macaque bone marrow.** *Aging Cell* 2011 **10**:66-79.
25. Chiarugi P, Fiaschi T: **Redox signalling in anchorage-dependent cell growth.** *Cell Signal* 2007 **19**(4):672-82.
26. Kobayashi CI, Suda T: **Regulation of reactive oxygen species in stem cells and cancer stem cells.** *J Cell Physiol* 2012 (2):421-30.
27. Poyton RO, Ball KA, Castello PR: **Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling.** *Trends Endocrinol Metab* 2009 **20**(7):332–40.
28. Song Z, Zhang J, Ju Z, Rudolph KL: **Telomere dysfunctional environment induces loss of quiescence and inherent impairments of hematopoietic stem cell function.** *Aging Cell* 2012 **11**(3):449-55.
29. Finkel T. **Signal transduction by reactive oxygen species.** *J Cell Biol* 2011 **11**;194(1):7-15.
30. Urao N, Ushio-Fukai M. **Redox Regulation of Stem/Progenitor Cells and Bone Marrow Niche.** *Free Radic Biol Med* 2013 **54**: 26–39.
31. Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A: **Inflammaging: disturbed interplay between autophagy and inflammasomes.** *Aging* 2012 **4**(3):166-75.
32. Sardina JL, López-Ruano G, Sánchez-Sánchez B, Llanillo M, Hernández-Hernández A: **Reactive oxygen species: are they important for haematopoiesis?** *Crit Rev Oncol Hematol* 2012 **81**(3):257-74.
33. Tothova Z, Gilliland DG: **FoxO transcription factors and stem cell homeostasis: insights from the hematopoietic system.** *Cell Stem Cell* 2007 **16**;1(2):140-52.

34. Beerman I, Seita J, Inlay MA, Weissman IL, Rossi DJ: **Quiescent hematopoietic stem cells accumulate DNA damage during aging that is repaired upon entry into cell cycle.** *Cell Stem Cell* 2014 3;**15**(1):37-50.
35. Rossiello F, Herbig U, Longhese MP, Fumagalli M, d'Adda di Fagagna F. **Irreparable telomeric DNA damage and persistent DDR signalling as a shared causative mechanism of cellular senescence and ageing.** *Curr Opin Genet Dev* 2014 4;26C:89-95.
36. Chen C, Mu XY, Zhou Y, Shun K, Geng S, Liu J, Wang JW, Chen J, Li TY, Wang YP: **Ginsenoside Rg1 enhances the resistance of hematopoietic stem/progenitor cells to radiation-induced aging in mice.** *Acta Pharmacol Sin* 2014 **35**(1):143-50.
37. Fumagalli M, Rossiello F, Clerici M, Barozzi S, Cittaro D, Kaplunov JM, Bucci G, Dobrev M, Matti V, Beausejour CM, Herbig U, Longhese MP, d'Adda di Fagagna F: **Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation.** *Nat Cell Biol* 2012 18;**14**(4):355-65.
38. Fossett N: **Signal transduction pathways, intrinsic regulators, and the control of cell fate choice.** *Biochim Biophys Acta* 2013 **1830**(2):2375-84.
39. Assumda FZ, Chase PB: **Age-related changes in rat bone-marrow mesenchymal stem cell plasticity.** *BMC Cell Biol* 2011 **12**;12:44.
40. Yoon DS, Kim YH, Lee S, Lee KM, Park KH, Jang Y, Lee JW: **Interleukin-6 induces the lineage commitment of bone marrow-derived mesenchymal multipotent cells through down-regulation of Sox2 by osteogenic transcription factors.** *FASEB J* 2014 **28**(7):3273-86.
41. Serena E, Figallo E, Tandon N, Cannizzaro C, Gerecht S, Elvassore N, Vunjak-Novakovic G. **Electrical stimulation of human embryonic stem cells: cardiac**

- differentiation and the generation of reactive oxygen species.** *Exp Cell Res* 2009 **315**(20):3611–9.
42. Sasaki H, Yamamoto H, Tominaga K, Masuda K, Kawai T, Teshima-Kondo S, Rokutan K: **NADPH oxidase-derived reactive oxygen species are essential for differentiation of a mouse macrophage cell line (RAW264.7) into osteoclasts.** *J Med Invest* 2009 **56**(1–2):33–41.
43. Varum S, Momcilovic O, Castro C, Ben Yehudah A, Ramalho-Santos J, Navara CS: **Enhancement of human embryonic stem cell pluripotency through inhibition of the mitochondrial respiratory chain.** *Stem Cell Res* 2009 **3**(2–3):142–56.

**Table 1.** Effects of aging on body weight, hematopoietic stem cell number, cell cycle profile and cytokines levels in C57BL/6 mice.

Parameters	Groups		
	Young	Middle	Aged
Body weight (g)	28 ± 1	29 ± 1	34 ± 1*
Hematopoietic stem cells (x10 <sup>6</sup> )	1.7 ± 0.2	4.3 ± 1	5.6 ± 1 <sup>#</sup>
Cell cycle (%)			
Sub G0	1 ± 0.2	4 ± 0.2	5 ± 0.5*
G0/G1	81 ± 2.6	75 ± 2.3	66 ± 2.9*
S/G2/M	18 ± 2.5	21 ± 2.6	29 ± 2.8*
Myeloid Cytokines (pg/mL)			
IL-6	23 ± 2	28 ± 2	63 ± 8*
TNF	111 ± 7	122 ± 7	227 ± 27*
IL-12p70	141 ± 11	142 ± 10	203 ± 14*
Lymphoid Cytokines (pg/mL)			
IFN-γ	3.2 ± 0.5	3.3 ± 0.6	4.1 ± 0.3
IL-10	181 ± 17	164 ± 16	149 ± 8

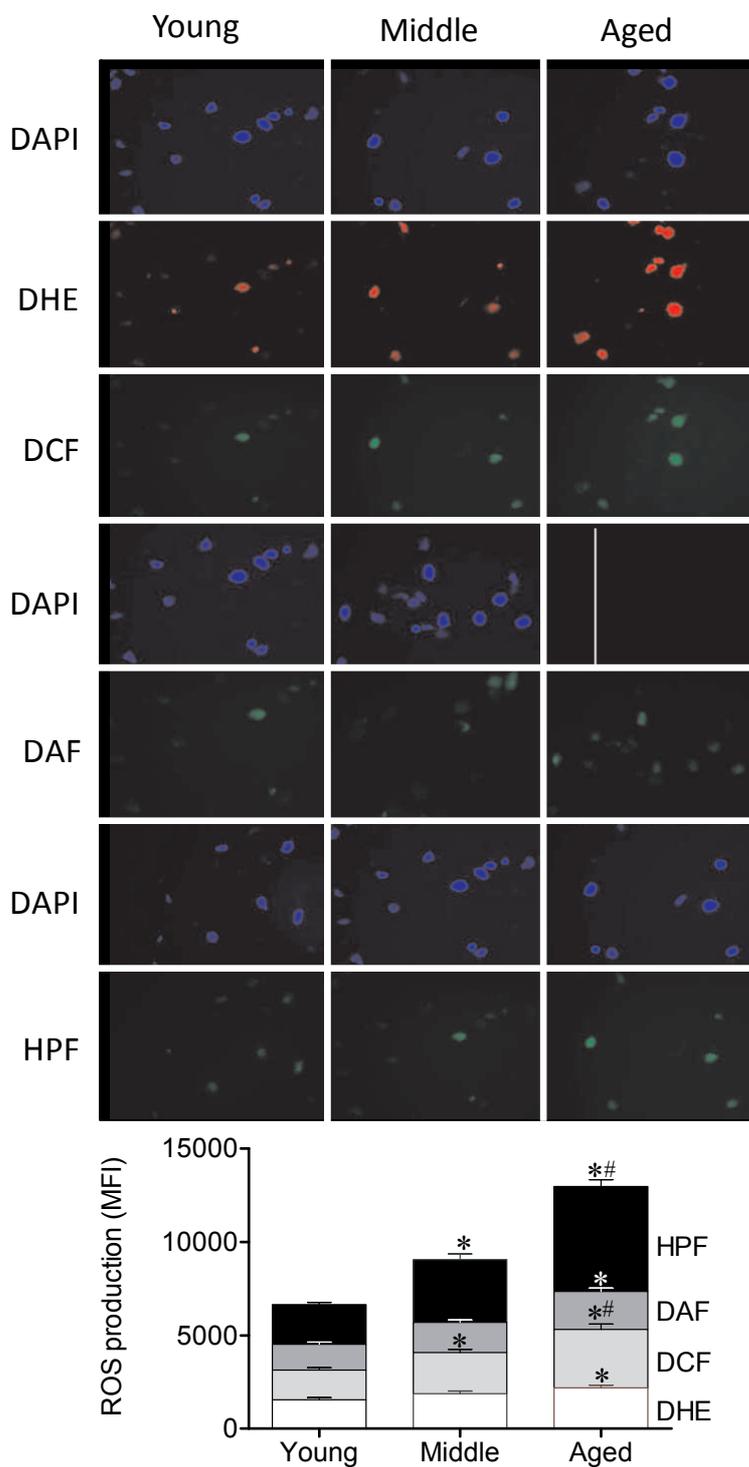
Values are means±SEM for 6 to 11 animals per group. \*p<0.05 vs young and middle age; # p<0.05 vs young (one-way ANOVA).

**Table 2.** The effect of aging on hematological parameters and systemic cytokines profile.

Parameters	Groups		
	Young	Middle	Aged
Cell Blood Count (CBC)			
Red blood cell number (10 <sup>6</sup> / mm <sup>3</sup> )	4.4 ± 1	7.3 ± 0.2 <sup>#</sup>	7.0 ± 0.3 <sup>#</sup>
White blood cell number (10 <sup>3</sup> / mm <sup>3</sup> )	2.9 ± 0.4	2.8 ± 0.3	5.3 ± 1
Myeloid (%)	24 ± 4.3	27 ± 4.1	40 ± 4.2*
Lymphoid (%)	76 ± 4.3	73 ± 4.1	60 ± 4.2*
Myeloid Cytokines (pg/mL)			
IL-6	256 ± 30	348 ± 34	543 ± 37*
TNF	265 ± 19	398 ± 17	588 ± 80*
IL-12	153 ± 12	187 ± 8	172 ± 16
Lymphoid Cytokines (pg/mL)			
IFN-γ	69 ± 1.5	77 ± 2.3	75 ± 3.3
IL-10	516 ± 34	586 ± 22	573 ± 19

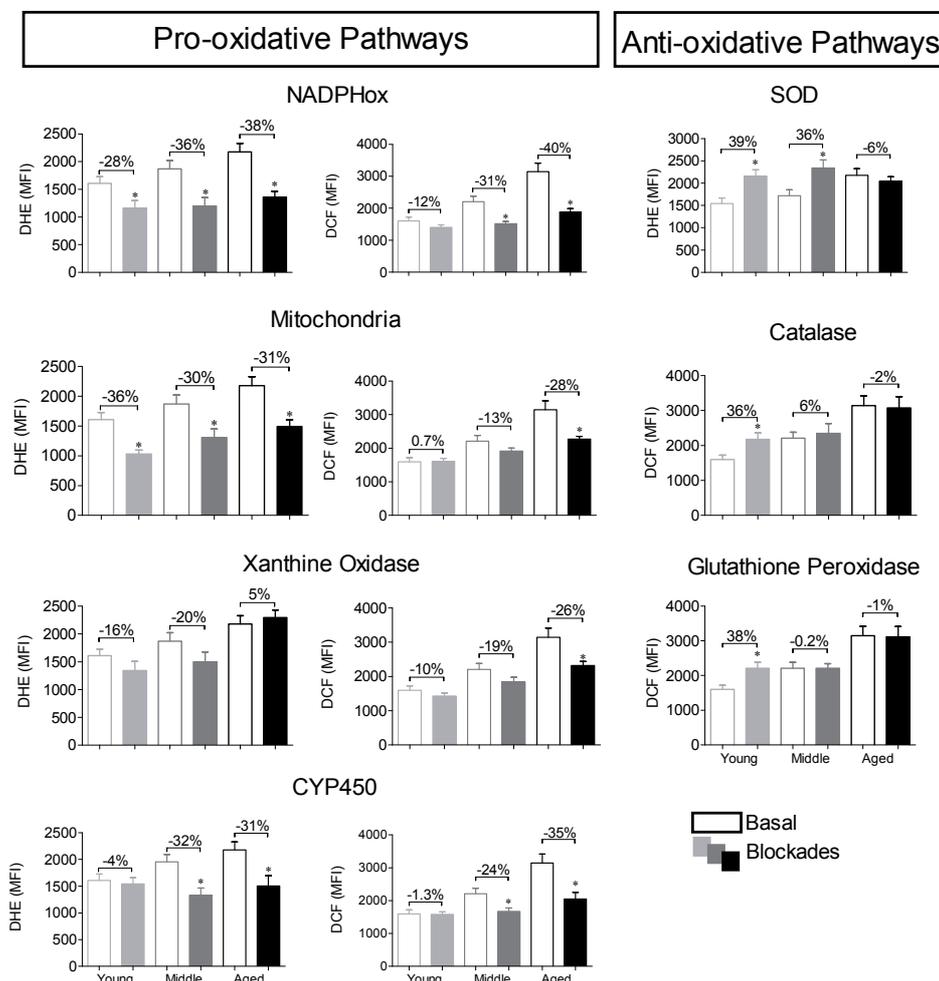
Values are means±SEM for 6 to 11 animals per group. \*p<0.05 vs young and middle age; # p<0.05 vs young (one-way ANOVA).

### Figure Legends

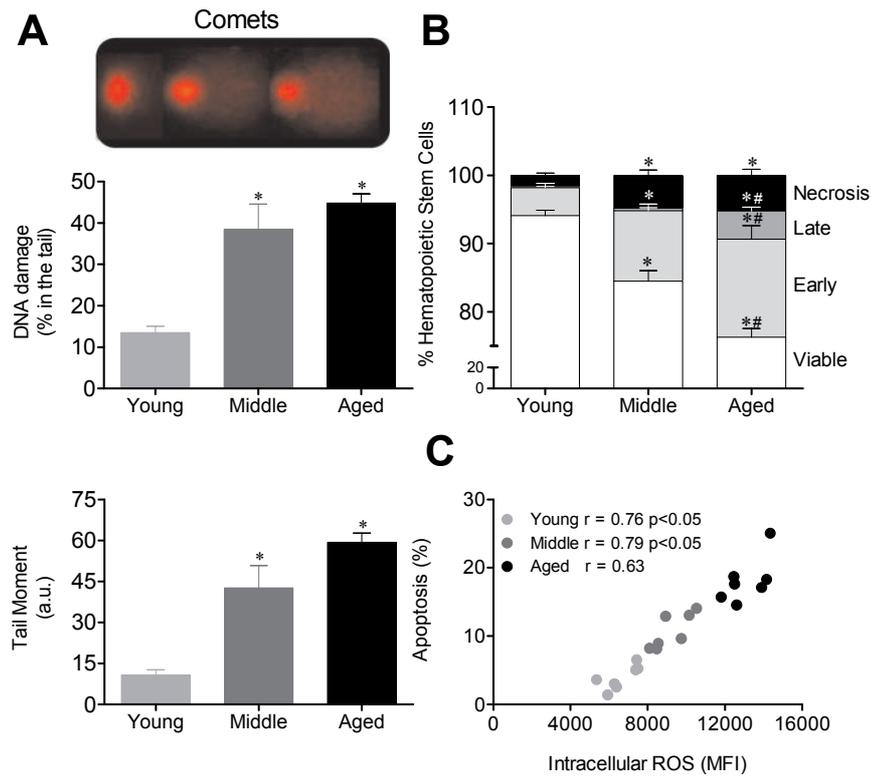


**Figure 1- ROS generation and oxidative stress pathways are involved in aging.** A- ROS production was assessed by DHE, DCF, DAF and HPF staining. Top panel shows representative images of HSCs; the aged group presented change in the number of cells that stained ROS compared with young animals. Bar graph shows the difference on MFI of the

ROS measured by flow cytometry among the groups. Values are means $\pm$ SEM, \* $p$ <0.05 vs. young. # $p$ <0.05 vs. middle.

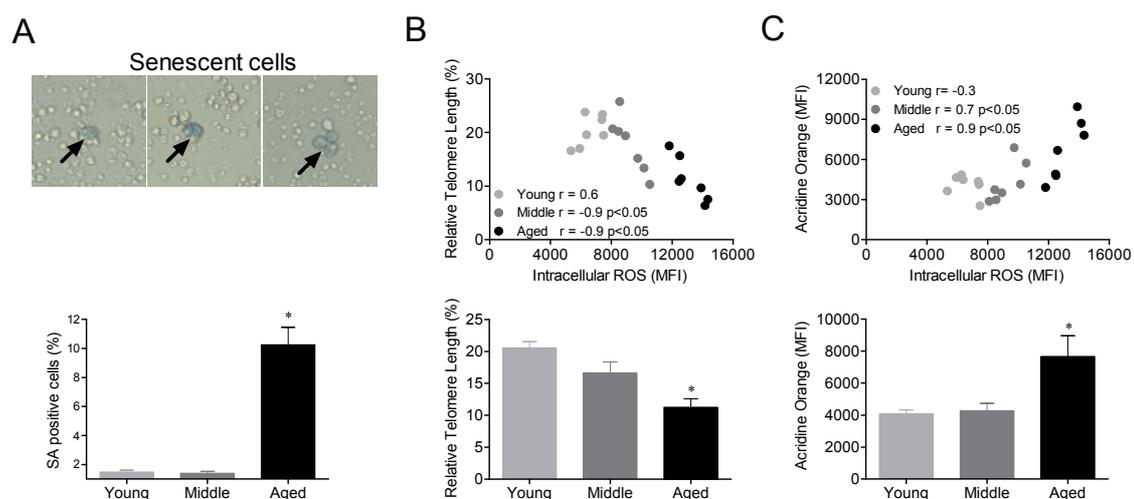


**Figure 2- Identification of the main sources of ROS production and anti-oxidant enzyme capacity by oxidative stress pathway analysis.** Bar graphs show the effect of different oxidant proteins inhibitors on ROS production and anti-oxidant proteins inhibitors on ROS reduction. ROS levels were analyzed by DHE and DCF fluorescence intensity. Unshaded bars represent basal ROS levels, and shaded bars show ROS levels after blockade. Abbreviations: NADPH oxidases (NADPHox), xanthine oxidase (XO), cytochrome P450 (CYP450), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx). Values are means $\pm$ SEM, \* $p$ <0.05 vs. matched basal.

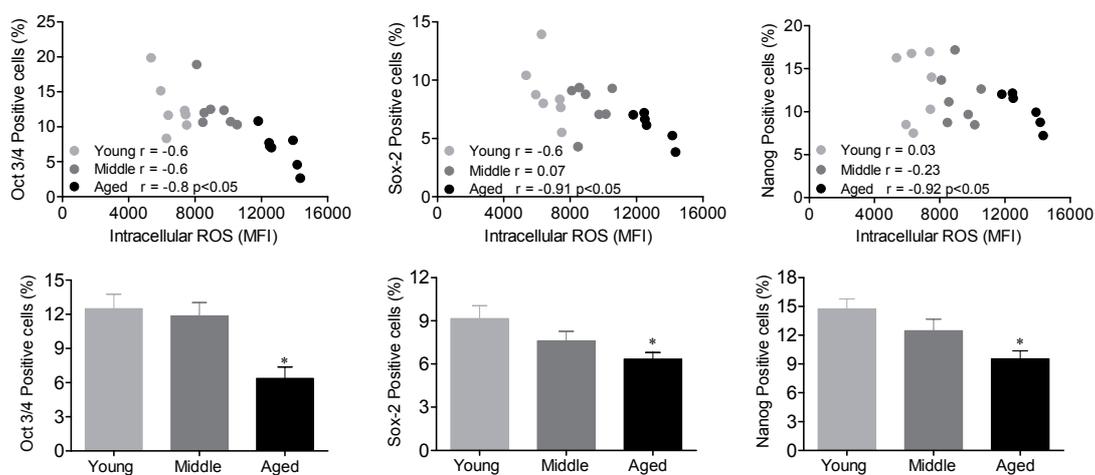


**Figure 3- Augmented ROS leads to DNA damage and apoptosis of HSCs during aging.**

A- The top panel shows typical photographs of comets with higher DNA fragmentation in the middle and aged groups. Bar graphs show the percentage of DNA in the tail and the tail moment. B- Bar graph shows the average percentage of viable cells, early apoptosis, late apoptosis and necrosis detected by annexin-V and PI staining. C- Correlation between intracellular ROS levels and apoptosis. Values are means $\pm$ SEM, \* $p < 0.05$  vs. young. # $p < 0.05$  vs. middle

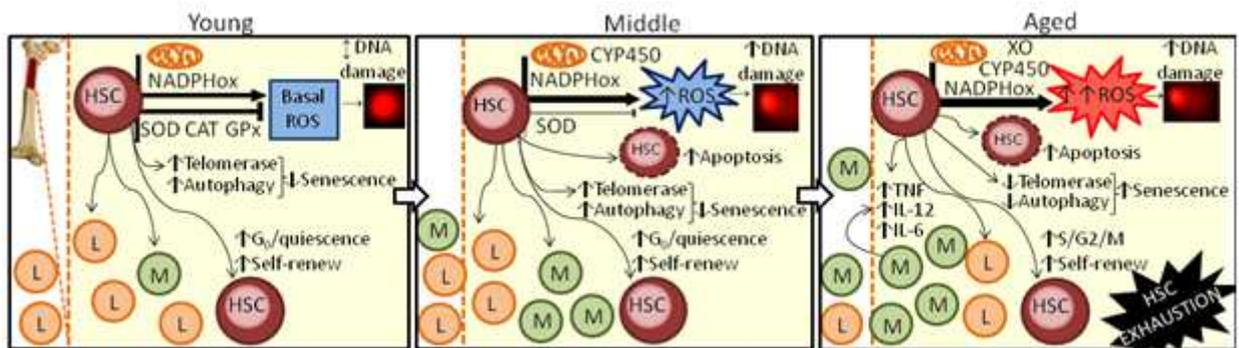


**Figure 4- Aging leads to molecular and cellular senescence of HSCs.** A- The top panel shows typical senescent cells with blue cytoplasm (arrow) and the bar graph shows the percentage of positive cells quantified by cell counting (bottom panel). B- Top panel shows the correlation between intracellular ROS levels and acridine orange fluorescence. The bar graph shows the median fluorescence intensity of acridine orange (bottom panel). C- The top panel shows the correlation between the intracellular ROS levels and relative telomere length (RTL). Bottom panel show the percentage of RTL. Values are means $\pm$ SEM, \* $p < 0.05$  vs. young.



**Figure 5- Pluripotency markers are downregulated by augmented ROS production during aging.** The top panels show the correlation between intracellular ROS and ONS

transcription factors. Bar graphs show the percentage of positive ONS cells. Values are the means $\pm$ SEM, \* $p$ <0.05 vs. young.



**Figure 6- Scheme showing multiple age-related factors regulating hematopoietic stem cell function.** Alterations in HSC function observed in aging: generation and main types of damage induced by ROS, different mechanisms of oxidative cellular/molecular damage and the potential role of anti-oxidants on HSC fate during the aging process. Lines with arrowhead indicate stimulation and lines with crosshead indicate inhibition. A line with a double arrowhead indicates a normal condition. Abbreviations: hematopoietic stem cells (HSC), reactive oxygen species (ROS), NADPH oxidases (NADPHox), cytochrome P450 (CYP450), xanthine oxidase (XO), lymphoid cells (L), myeloid cells (M), tumoral necrosis factor (TNF), interleukin-12p70 (IL-12), interleukin-6 (IL-6).