

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

CHRISTIANO MARCELLO VAZ BARBOSA

**ESTUDO *IN VITRO* DO EFEITO INIBITÓRIO DO COMPLEXO PALADACICLO
FERROCENO 1:2 SOBRE A ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA-I
NA HEMATOPOESE MEDULAR**

Mogi das Cruzes, SP

2006

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

CHRISTIANO MARCELLO VAZ BARBOSA

**ESTUDO *IN VITRO* DO EFEITO INIBITÓRIO DO COMPLEXO PALADACICLO
FERROCENO 1:2 SOBRE A ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA-I
NA HEMATOPOESE MEDULAR**

**Dissertação apresentada a Universidade de
Mogi das Cruzes, para obtenção do título
de Mestre em Biotecnologia.**

Área de concentração: Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª CLAUDIA BINCOLETTO TRINDADE

Mogi das Cruzes, SP

2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Barbosa, Christiano Marcello Vaz

Estudo in vitro do efeito inibitório do complexo paladacilo ferroceno 1:2 sobre a enzima conversora de angiotensina-I na hematopoese medular / Christiano Marcello Vaz Barbosa. – 2006.

87 f.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Mogi das Cruzes, 2006.

Área de concentração: Ciências biológicas

Orientador : Profª. Drª. Claudia Bincoletto Trindade

1. Hematopoese 2. Enzima conversora de angiotensina-I 3. AcSDKP 4. Complexos ciclopaldados 5. Captopril 6. Células S-17 I. Título II. Trindade, Claudia Bincoletto

CDD 615.1

DEDICATÓRIA

O trabalho que aqui se encontra é na sua essência direcionado ao futuro, às novas possibilidades de aperfeiçoamento e de avanço científico no campo da Farmacologia Experimental.

Em suma, é uma aposta no que ainda está por vir, na expansão dos limites estabelecidos, na negação da mediocridade que tantas vezes nos avista e ataca como uma serpente – símbolo do mal. No entanto, mesmo a rastejante e traiçoeira serpente possui seu impiedoso predador, um ser elegante, dotado de visão e coragem aguçadas, o gavião, que dela se alimenta, lhe garantindo apenas o medo e a destruição.

Neste momento de reflexão percebo que as lições a nós atribuídas não são, de forma alguma, incompatíveis com o estágio atual de nosso desenvolvimento. O grau de dificuldade é proporcional ao grau de nosso desenvolvimento espiritual. Por isso, mesmo uma dificuldade aparentemente insolúvel, está dentro dos limites de capacidade de solução de cada um de nós. “Não é porque certas coisas são difíceis que deixamos de ousar. É por falta de ousadia que certas coisas são difíceis”.

Mire na Lua, pois se você não puder atingi-la, com certeza irá conhecer grandes estrelas.....ou, poder ser uma delas!!!

Dedico este trabalho que – a exemplo da alma – permanecerá até mesmo diante da inexorável ausência física do autor, aos meus pais Nilton e Adélia, com algum sangue, muito suor, orgulho e satisfação.

AGRADECIMENTOS

À Deus, não só se agradece mas demonstra o cumprimento dos mandamentos sagrados.

Aos meus pais, que souberam compreender, aceitar e incentivar minhas decisões, e pelo apoio incondicional aos estudos, desde os primeiros anos que eu gostava muito de fugir da escola e bem pouco de retornar à mesma. E por todo inesgotável apoio - físico, psicológico e financeiro - sem o qual esta história seria outra. Obrigado pela vida!!

À minha orientadora, professora **Dr^a Claudia Bincoletto Trindade**, pela atenção e por todo incentivo, paciência, confiança e alegria destinados a este trabalho. Discutimos artigos, brincamos, reclamamos, sorrimos e até choramos (de alegria, é claro)!! Agradeço principalmente pelas oportunidades, e por apresentar-me ao grande mundo da cultura de células. “Nenhuma vitória seria gloriosa, e nenhuma derrota humilhante, sem a testemunha ocular de uma mulher”. Minha querida Claudia, muito obrigado, muito obrigado mesmo, por tudo!!

Ao professor **Dr. Ivarne Luis Santos Tersariol**, cientista criativo e convicto, possuidor de raro saber. Pela generosa participação neste trabalho, pelas idéias e incentivo constante. Espero algum dia poder retribuir à altura, muito obrigado.

Ao professor **Dr. Ronaldo de Carvalho Araújo**. Grau maior de humildade, paciência e praticidade. Por todo apoio, confiança, sugestões sempre bem vindas e pela colaboração neste trabalho. Obrigado.

Ao professor **Dr. Antonio Carlos Fávero Caires**, pela possibilidade de estudo.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da UMC, todos, sem exceção.

Ao professor **Dr. Radovan Borojevic**, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, exemplo maior de amor à ciência. Todo espírito de grupo que existe em seu laboratório, deve-se a este grande líder. Agradeço pelas oportunidades e por todo apoio estratégico a este trabalho. Muito obrigado.

Aos amigos e conselheiros do Laboratório de Proliferação e Diferenciação Celular do Departamento de Histologia e Embriologia da UFRJ: **Prof^a Márcia Cury, Prof. Cristiano, Prof^a Kátia Arcanjo, Hamilton, Felipe, Sandra**

Hurtado, Alex Balduino, Leonardo HP, Lígia, Luciene, Rodrigo, Guilherme, Bárbara e Laure. É muito difícil falar deste grupo, mas é extremamente fácil agradecer por tudo que me ensinaram e dizer que são “foras-de-série”. Destes, não poderia deixar de agradecer duas vezes ao Felipe e ao Leonardo HP, por todos os macetes, pelas dicas sobre as infindáveis facetas da cultura de células, pelo apoio, paciência, incentivo e vontade de acertar. Agradeço pelo aprendizado técnico, mas também pelos momentos que vivenciamos, não só no laboratório, mas principalmente fora dele. As festinhas no Fundão, o futebol na Biofísica e as mesas de bar. Não vamos envelhecer nunca!! Obrigado por tudo.

Ao grande amigo **Carlos Rocha Oliveira**, o “Ninja” do laboratório. Convivência esplendorosa. Exemplo de dedicação, seriedade e honestidade. Por toda paciência e solidariedade nos momentos mais críticos, pelo incentivo, por todos os sonhos compartilhados, e pelas saudáveis discussões sobre Química. Cérebro e personalidade que certamente brilhará em breve!! Grande abraço amigo. Esta tese também é sua!!!

À grande amiga **Maria Cecília Piola Brandt**, por sua peculiaridade. Exemplo de calma, disciplina, inteligência e liderança. Pelo apoio, incentivo e por acreditar na minha capacidade. Pelas longas conversas, conselhos, pelas alegrias e lágrimas compartilhadas no NIB, por tudo.

A todos do Laboratório de Cultura de Células: **Mickaela, Tatiana e Daniela.** Aos amigos que tomaram outro rumo: **Sandra, Vanessa e Ricardo.** A “nova geração”: **Marília, Camila e Wesley**, pela paciência, apoio e compreensão. Obrigado pelo incentivo.

Aos amigos do Laboratório de Animais Transgênicos e Estrutura de Proteínas: **Prof. Jorge Pesquero, Frank, Milton, Débora, Sandro, Daniela Sgai, Cacá, João Davison, Viviane e Elice**, pelo incentivo constante, pela confiança, apoio, atenção e disponibilidade, pelas discussões envolvendo Biologia Molecular, pelas conversas no almoço, por tudo. Muito obrigado.

As meninas, **Neilce, Taíz, e Renata**, pelo auxílio, incentivo, paciência e companheirismo, e pelo excelente trabalho nos bastidores. Beijos e boa sorte!!

Ao povo de São Paulo, pelo carinho que sempre fui tratado.

E a todos aqueles que não foram citados nominalmente, mas que foram muito importantes para a realização deste trabalho.

Agradeço por todas as experiências técnicas, mas principalmente as experiências de vida ao longo deste período, onde aprendi, dentre outras coisas, a enfrentar as maiores dificuldades com a serenidade daqueles que não se curvam diante dos desafios da vida, por maiores que estes pareçam ser.

“Não faças de ti
Um sonho a realizar.
Vai.
Sem caminho marcado.
Tu és o de todos os caminhos.
Se apenas uma presença.
Invisível presença silenciosa.
Todas as coisas esperam a luz,
Sem dizerem que a esperam.
Sem saberem que existe.
Todas as coisas esperarão por ti,
Sem te falarem.
Sem lhes falares”.

Cecília Meireles

RESUMO

Foi demonstrado que as drogas inibidoras da enzima conversora de angiotensina-I (ECA) são capazes de proteger as células-tronco hematopoéticas e progenitoras dos efeitos tóxicos da quimioterapia e radioterapia, via regulação do tetrapeptídeo AcSDKP. O complexo paladaciclo ferroceno 1:2, um novo composto contendo paládio como metal de transição, apresenta propriedade inibitória sobre a ECA. Diante disso, o presente trabalho buscou ampliar o conhecimento acerca deste comportamento inibitório sobre a hematopoese medular, através de sistemas de cultivo bidimensional *in vitro*. Nestes ensaios utilizamos captopril e AcSDKP como parâmetro de referência. Nas co-culturas sobre as células S-17, onde adicionamos o paladaciclo ferroceno 1:2 a 1,2 μ M, verificamos redução de 50% sobre a proliferação de células hematopoéticas ao longo de 10 dias, corroborando com os dados obtidos com AcSDKP a 1 nM. Por outro lado, nas culturas sob ação de captopril a 1,2 μ M, não verificamos proliferação celular ao longo de 3 dias, e para os dias 7 e 10, observamos diminuição na celularidade total de 70% em relação ao controle. Os ensaios clonogênicos em soft-ágar obtidos das culturas tratadas com paladaciclo ferroceno 1:2 a 1,2 μ M e AcSDKP a 1 nM, apresentaram redução de 50% no número de CFU-GM em relação ao controle durante o período de estudo. Pela técnica de CFU-F, observamos que ambos os compostos apresentam comportamento inibitório sobre a formação de colônias mesenquimais, no entanto, o captopril mostrou-se mais potente. Neste trabalho, apresentamos um novo composto com propriedade hematomoduladora, por sua ação sobre a atividade da ECA, o que sugere sua possível aplicação em neoplasias medulares. Por outro lado, foi estabelecido um modelo de estudo *in vitro* da modulação do microambiente medular pela ECA, uma vez que as células S-17 expressam constitutivamente esta metaloprotease, a componente chave do sistema renina-angiotensina (SRA). Diante disso, nossa proposta é sugerir a utilização desta linhagem estabelecida como um novo modelo de estudos envolvendo o SRA na MO, uma vez que as células estromais fornecem suporte estrutural e molecular ao sistema hematopoético.

Palavras-chave: Hematopoese, complexos ciclopaladados, AcSDKP, enzima conversora de angiotensina-I.

ABSTRACT

Angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitors may be of value in protecting hematopoietic stem cells and progenitors from the cytotoxic effect of chemotherapy and radiotherapy by up-regulation of AcSDKP concentration. Biphosphinic Palladacycle Complex (BPC), a new compound with palladium as transition metal, presents inhibitory properties on the ACE activity. The aim of this study was to investigate the role of BPC on the ACE activity using *in vitro* murine bone marrow (BM) cultures. We used captopril and AcSDKP as reference parameters. In co-cultures on the S-17 cells, when we added BPC at 1,2 μ M, we verified 50% reduction on the hematopoietic cells proliferation throughout 10 days, corroborating the data obtained with AcSDKP at 1 nM. On the other hand, in cultures incubated with captopril at 1,2 μ M, we have not observed cellular proliferation on the third day-incubation. However, on days 7 and 10, we observed a 70% reduction in the total cellularity in relation to control. The clonogenic assays obtained from co-cultures treated with BPC at 1,2 μ M and AcSDKP at 1 nM, resulted in a 50% reduction in the number of CFU-GM in relation to control during all of the study period. By CFU-F assays, we observed that BPC and captopril also inhibited the mesenchymal colonies formation, however, further reduction in this parameter was observed with captopril. In this study, we introduce a new drug with hematomodulator properties by its action on the ACE activity, which suggest a possible application of BPC in neoplastic disorders involving BM. On the other hand, in this work it was established one model of study *in vitro* of the modulation of hematopoietic microenvironment for the ACE, since the S-17 cells express constitutively this metalloprotease, the key component of the renin-angiotensin system (RAS). Therefore, we proposed the use of S-17 cells as an experimental model of RAS in the BM, since the stromal cells providing molecular and scaffolding of the hematopoietic system.

Key-words: Hematopoiesis, palladacycle complex, AcSDKP, angiotensin-I converting enzyme.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	<i>Primers</i> utilizados na reação de PCR.....	48
Tabela 2	Número de células hematopoéticas totais co-cultivadas sobre as células S-17 ao longo de 3 dias.....	89
Tabela 3	Número de células hematopoéticas totais co-cultivadas sobre as células S-17 ao longo de 7 dias.....	89
Tabela 4	Número de células hematopoéticas totais co-cultivadas sobre as células S-17 ao longo de 10 dias.....	89
Tabela 5	Número de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) obtidas do 3º dia de co-culturas de células não aderentes de medula óssea sobre as células S-17.....	90
Tabela 6	Número de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) obtidas do 7º dia de co-culturas de células não aderentes de medula óssea sobre as células S-17.....	90
Tabela 7	Número de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) obtidas do 10º dia de co-culturas de células não aderentes de medula óssea sobre as células S-17.....	90
Tabela 8	Número de colônias mesenquimais obtidas ao final de 10 dias de cultivo.....	91

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1	Representação da celularidade sob forma de tabelas.....	88
Anexo 2	Parecer do Comitê de Ética (CEMEA/UMC).....	92

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Formação das Ilhotas sangüíneas no saco vitelino de camundongos.....	18
Figura 2	Localização intraembrionária das células-tronco hematopoéticas, visão geral do embrião no 10,5-11 dia embrionário demonstrando a área de atividade homogênea.....	19
Figura 3	Esquema simplificado da cascata de diferenciação hematopoética de um indivíduo adulto.....	20
Figura 4	Modelo esquemático de corte transversal de um osso longo demonstrando o local de hematopoese e o fluxo das células hematopoéticas na cavidade medular.....	22
Figura 5	Esquema do microambiente hematopoético, demonstrando a interação das células estromais com os precursores hematopoéticos.....	27
Figura 6	Representação esquemática do “hipotético” local do sistema renina-angiotensina na medula óssea.....	30
Figura 7	Modelo tridimensional e estrutura molecular do complexo paladacilo ferroceno 1:2 - $[Pd(C^2,N-(S_{(-)}dmpa)(dppf)] Cl$	35
Figura 8	Morfologia das células S-17 ao microscópio óptico invertido (foto).....	51
Figura 9	Sobrevida celular referente à linhagem estabelecida S-17, na presença dos compostos paladacilo ferroceno 1:2 e captopril, à 37°C, por 72h, pelo ensaio do MTT.....	52
Figura 10	Viabilidade celular pelo teste de exclusão com azul de trypan, das células S-17 na presença do complexo paladacilo ferroceno 1:2, à 37°C, por 72h.....	53
Figura 11	Atividade enzimática da ECA nas células S-17, determinada espectrofluorimetricamente, utilizando o substrato fluorogênico Abz-YRK(Dnp)P-OH, no extrato celular e sobrenadante.....	54

Figura 12	Contagem do número de células hematopoéticas co-cultivadas sobre as células S-17. As células foram contadas em câmara de Newbauer, no 3º, 7º e 10º de cultura.....	56
Figura 13	Co-culturas de células hematopoéticas não aderentes de medula óssea sobre as células S-17 no 7º dia de cultivo, na presença de AcSDKP, paladacilo ferroceno 1:2 e captopril (foto).....	57
Figura 14	Ensaio clonogênico em meio semi-sólido (CFU-GM) a partir de 3, 7 e 10 dias de co-cultura de células não aderentes de medula óssea sobre as células S-17, mostrando o número de colônias por frasco de 25-cm ²	59
Figura 15	Contagem global das colônias de células mesenquimais da medula óssea, no 10º dia de cultura, na presença dos compostos paladacilo ferroceno 1:2 e captopril.....	61
Figura 16	Aspecto morfológico das colônias de células mesenquimais da medula óssea observada ao microscópio de contraste de fase, no 4º e 10º dia de cultura, na presença de captopril e paladacilo ferroceno1:2 (foto).....	62
Figura 17a	Análise por eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação orientada (PCR).....	64
Figura 17b	Densidade ótica relativa das bandas específicas, entre ECA e β -actina, obtidos do <i>software</i> LABWORKS.....	64
Figura 18	Contagem do número de células hematopoéticas aderidas ao estroma S-17, em estufa úmida, a 37°C, por 4 horas. As células foram contadas em câmara de Newbauer.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcSDKP	Acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline
AGM	Aorta-Gônada-Mesonefron
Ara-C	Citosina arabinosídeo
AT1	Receptor tipo I de angiotensina II
BFU-E	Burst forming unit erytroid
BPC	Biphosphinic Palladacycle Complex
BSS	Solução salina balanceada
c-DNA	DNA complementar
CFU-F	Colony-forming unit fibroblast
CFU-GM	Colony-forming unit granulocyte-macrophage
CFU-mix	Colony-forming unit mix
CMF.BSS	Solução salina balanceada livre de cálcio e magnésio
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
α -MEM	Meio Dulbecco's α modificado
DMSO	Dimetil sulfóxido
ECA	Enzima conversora de angiotensina-I
EDTA	Ácido etilenodiaminotetra-acético
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
rGM-CSF	GM-CSF recombinante
HPP-CFC	High proliferative potential colony-forming cell
HSC	Hematopoietic stem cell
IL-1	Interleucina-1
IL-3	Interleucina-3
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor

MTT	dimetiltiazol difenil brometo de tetrazólio
NK	Natural killer
PBS	Solução tampão fosfato (phosphate buffer solution)
PCR	Polymerase Chain Reaction
P-Sp	Esplanonopleura para-aortica
RNA	Ácido ribonucléico
RT-PCR	Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
S-17	Linhagem de estroma hematopoético medular murino
SCF	Stem cell factor
SDF-1 α	Stroma-derived factor-1 α
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SRA	Sistema renina-angiotensina
TGF- β	Transforming growth factor- β
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VLA	Very late antigens
WT1	Wilms tumor gene 1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Hematopoese no período embrionário	16
1.2 Hematopoese medular	20
1.3 O microambiente hematopoético	25
1.4 Sistema renina-angiotensina x medula óssea	27
1.5 Enzima conversora de angiotensina-I x hematopoese	31
1.6 Ontogenia dos complexos ciclopaladados	33
1.7 Objetivos	37
1.7.1 Geral	37
1.7.2 Específicos	37
2 MÉTODO	39
2.1 Paladaciclo ferroceno 1:2	39
2.2 Captopril, AcSDKP e Abz-YRK(Dnp)P-OH	39
2.3 Animais	40
2.4 Linhagem celular S-17 (Estroma de medula óssea)	40
2.5 Avaliação da citotoxicidade pela metodologia do MTT	40
2.6 Teste de exclusão por azul de trypan	41
2.7 Dosagem de atividade da ECA nas células estromais S-17 ..	42
2.8 Co-cultura de células da MO sobre as células S-17	43
2.9 Ensaio clonogênico por soft-água (CFU-GM)	44
2.10 Cultura de células progenitoras fibroblastóides da MO	45
2.11 Reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa ..	46
2.12 Ensaio de adesão de células mononucleares	49
3 RESULTADOS	51
3.1 Morfologia das células S-17	51
3.2 Teste de redução do MTT	52
3.3 Viabilidade celular por azul de trypan	53
3.4 Análise da atividade da ECA nas células S-17	54
3.5 Ensaios de co-cultivo	55
3.6 Ensaios clonogênicos (CFU-GM)	58

3.7 Ensaio de progenitores mesenquimais (CFU-F)	60
3.8 RT-PCR	63
3.9 Ensaio de adesão	63
4 DISCUSSÃO	66
5 CONCLUSÕES	74
6 SUGESTÕES	75
7 REFERÊNCIAS	76
8 ANEXOS	88
Anexo I – Tabelas de celularidade	88
Anexo II – Termo de Aprovação do Comitê de Ética	92

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hematopoese no período embrionário

A hematopoese é o processo de produção de todas as linhagens celulares que constituem o sistema imunológico. Este fenômeno compreende dois eventos distintos: a linfopoese (linfócitos B, T e células NK) e a mielopoese (granulócitos, monócitos, eritrócitos e megacariócitos). Contudo, todas estas células se originam a partir de um progenitor comum, indiferenciado, denominado célula-tronco hematopoética (HSC) (OGAWA, 1993). Portanto, durante o desenvolvimento dos vertebrados, este sistema extremamente complexo e dinâmico, é estabelecido em diferentes sítios anatômicos, os quais fornecem condições para a proliferação e diferenciação das células hematopoéticas. Em camundongos, as primeiras células hematopoéticas aparecem nas ilhotas sangüíneas do saco vitelino a partir do 7,5 dia embrionário. A partir do dia 10 *post coitum* até pouco depois do nascimento, o fígado fetal passa a ser o principal órgão hematopoético e, por volta de uma semana após a gestação, o fígado deixa de ser hematopoético e as células migram para a medula óssea, sendo este agora o principal sítio hematopoético, perdurando por toda vida adulta do animal (GODIN e CUMANO, 2002).

O saco vitelino foi o primeiro órgão hematopoético a ser reconhecido. Este sítio é composto por células do mesoderma extraembrionário apostas às células do endoderma visceral. As primeiras células hematopoéticas e a formação de ilhotas sangüíneas são provenientes deste mesoderma. Entre o oitavo e nono dia embrionário, as células que compõem a camada externa da ilhota sangüínea adquirem o fenótipo endotelial, enquanto que as células da massa interna, progressivamente, perdem aderência uma das outras e

diferenciam em eritroblastos primitivos (PALIS e YODER, 2001) (figura 1). A hematopoese no saco vitelino, também chamada *Hematopoese Fulgaz*, é principalmente relacionada com a produção de células eritróides, as quais são nucleadas e expressam hemoglobinas embrionárias. Desta forma, por muitos anos acreditava-se que as células hematopoéticas da medula óssea tinham sua origem embrionária no saco vitelino, e que posteriormente, estas células seriam capazes de repopular sítios intraembrionários. Esta idéia prevaleceu até a década de 70, quando Turpen *et al.* (1981) e Dieterlen-Lièvre (1975) utilizando sistemas de quimeras em anfíbios e aves, respectivamente, mostraram a existência de um sítio intraembrionário, que abrigava células hematopoéticas. Em camundongos, este sítio é composto pela aorta dorsal e o mesoderma que a envolve, denominado de esplanchnopleura para-aortica (P-Sp), formada entre os dias embrionários 8,5-10 (GODIN *et al.*, 1995). Por volta do décimo primeiro dia embrionário, nesta região ocorrerá o desenvolvimento da aorta, das gônadas e do mesonefron, passando a ser chamada de região Aorta-Gônada-Mesonefron (AGM) (CUMANO *et al.*, 2001).

Na verdade, verifica-se dois sítios de produção de células hematopoéticas. Um sítio extraembrionário, que ocorre no saco vitelino, e um sítio intraembrionário que ocorre na região AGM, e que são totalmente independentes. Ao contrário da região AGM, a qual gera células hematopoéticas multipotentes incluindo precursores linfóides, o saco vitelino só gera colônias eritróides e mielóides, mas não precursores linfóides (CUMANO *et al.*, 1996). Além disso, na região AGM que são produzidas as células-tronco hematopoéticas de longa duração, aquelas capazes de reconstituir um animal letalmente irradiado por toda vida, onde ficam concentradas na região denominada de sítio homogênico (GODIN e CUMANO, 2002) (figura 2).

Como já dito anteriormente, o fígado fetal é considerado o principal órgão hematopoético durante a embriogênese murina. Contudo, o fígado não gera células hematopoéticas, mas é colonizado por elas e atua como um reservatório durante a vida fetal, antes do processo hematopoético ser estabelecido

definitivamente na medula óssea. Por outro lado, em camundongos, o timo e o baço são formados relativamente tarde no período embrionário e estão envolvidos com a produção de células altamente diferenciadas, células hematopoéticas maduras provenientes de células precursoras que migraram até estes órgãos (DZIERZAK *et al.*, 1998).

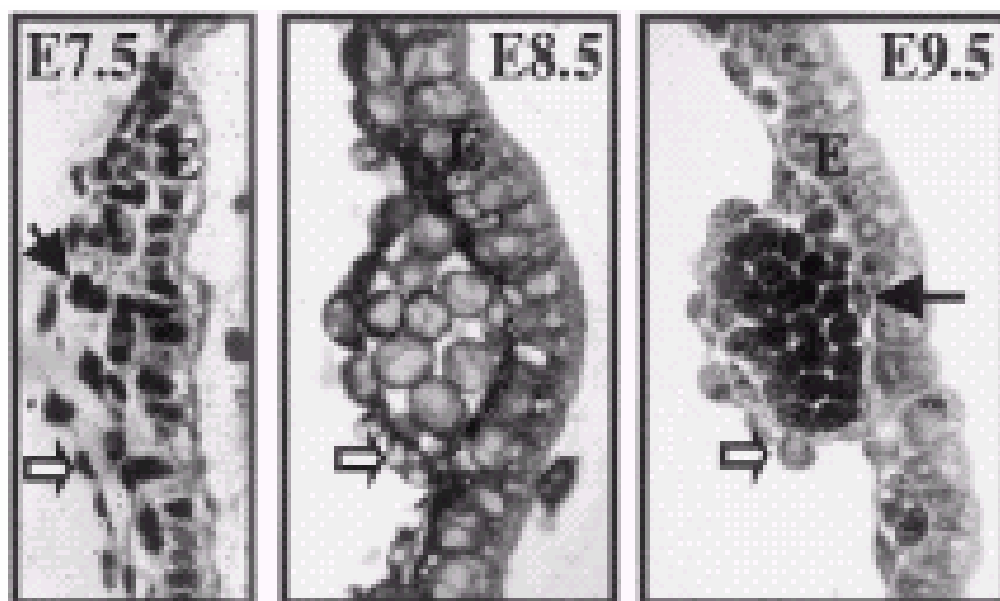


Figura 1: Formação das Ilhotas sangüíneas no saco vitelino nos 7,5, 8,5 e 9,5 dias *post coitum*. As células hematopoéticas se desenvolvem a partir das células mesodermis indiferenciadas (E7.5 – seta preta) dando origem a massa interna de células circundada por uma membrana endotelial (E9.5 – seta preta) (PALIS e YODER, 2001).

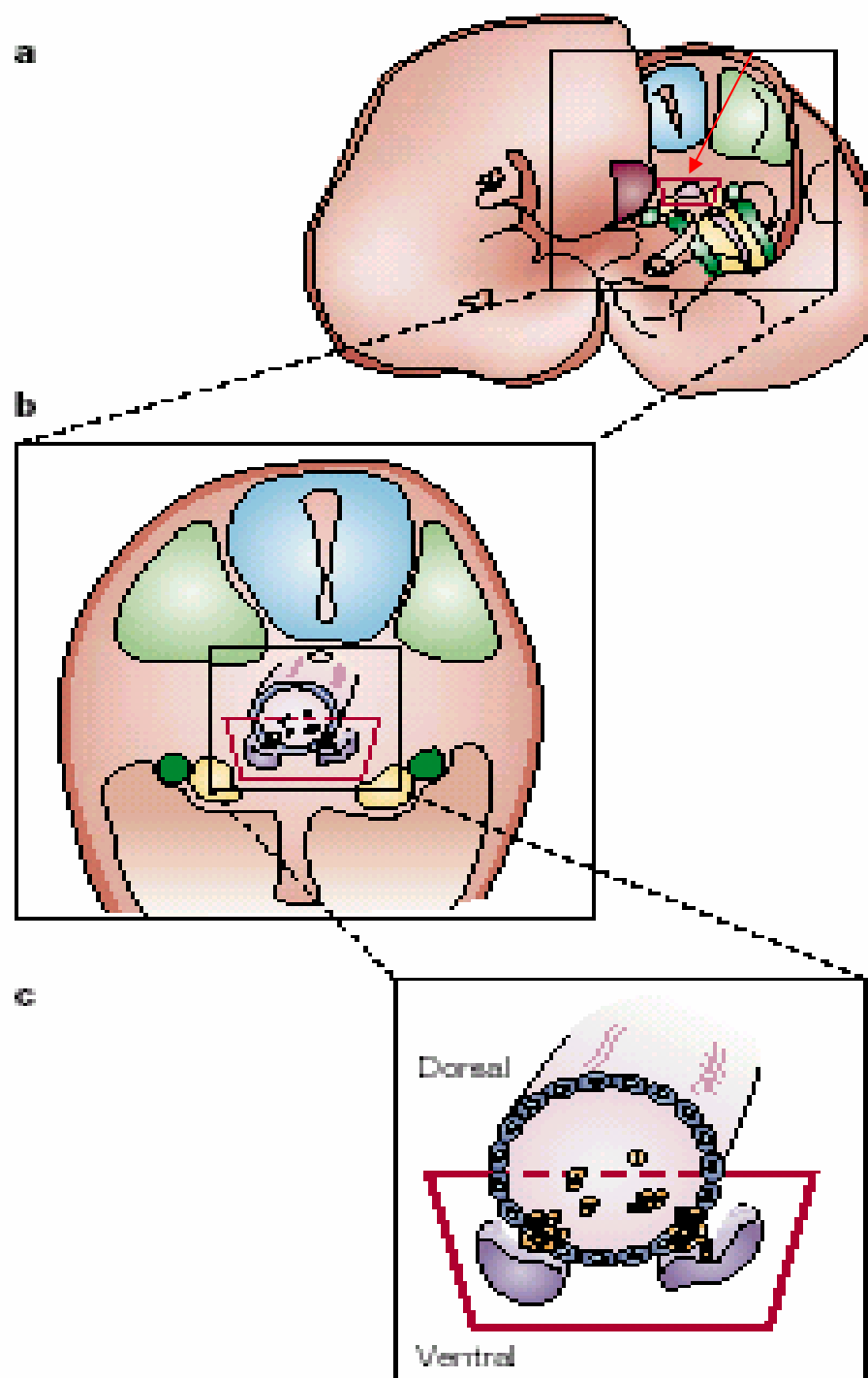


Figura 2: Localização intraembrionária das células-tronco hematopoéticas. **(A)** Visão geral do embrião no 10,5-11 dia embrionário mostrando a área de atividade homogênea (seta vermelha). **(B)** Seção transversal do embrião demonstrando a estrutura interna da região AGM. **(C)** Visão amplificada da região do sítio homogêneo (delimitação em vermelho) (GODIN e CUMANO, 2002).

1.2 Hematopoese medular

Na fase adulta, o sistema hematopoético é estabelecido na medula óssea. A hematopoese adulta é extremamente hierarquizada (figura 3). As células obedecem a uma classificação de acordo com a capacidade de formação de diferentes linhagens hematopoéticas, de reconstituição do sistema e de auto-renovação. Este processo de produção celular é extremamente refinado, onde os eventos de proliferação, diferenciação, quiescência e apoptose são controlados por diversos fatores, dentre eles, citocinas, elementos de matriz extracelular, moléculas de adesão, além da estreita associação com as células estromais (WHETTON e SPOONCER, 1998).

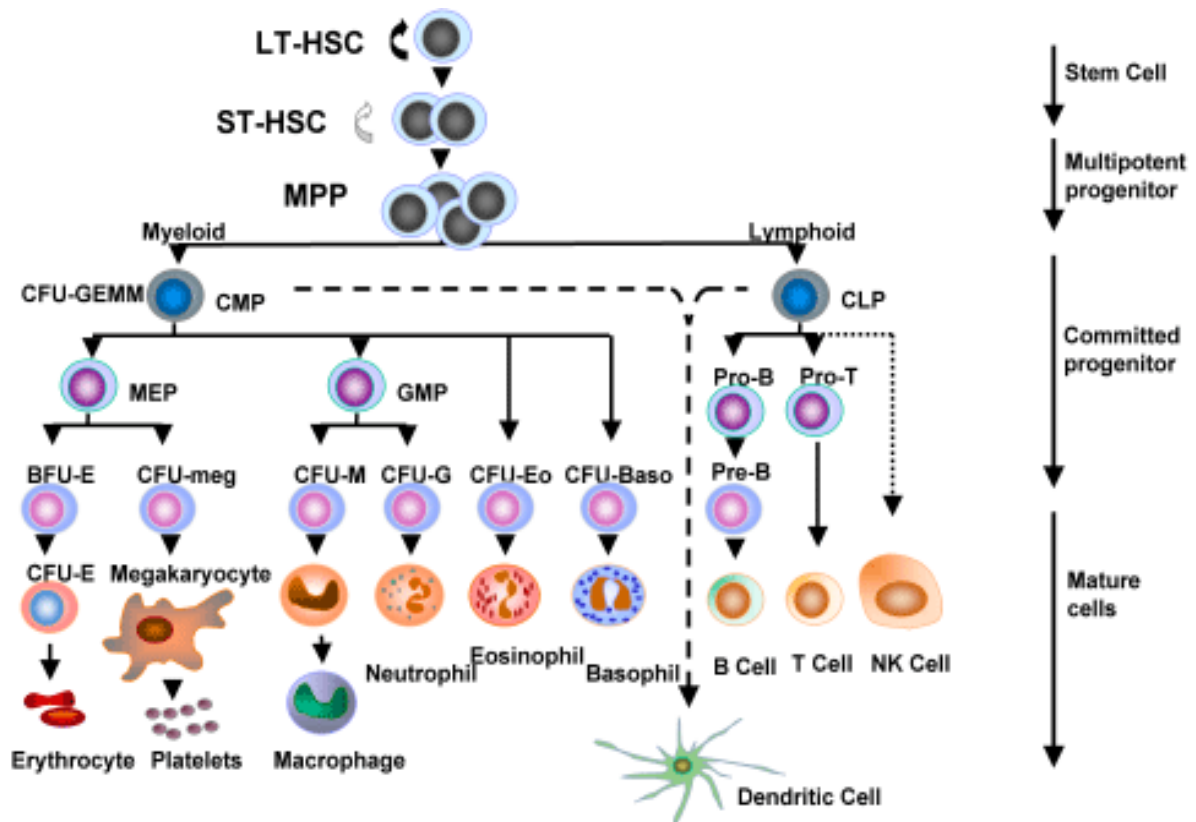


Figura 3: Representação esquemática da divisão hierárquica das células que compõem o sistema hematopoético de um indivíduo adulto. Adaptado de Karlsson S. Disponível em: <http://www.molmed.lu.se/hematopoiesis_p00.htm>. Acesso em: 09 nov. 2005.

Em humanos adultos, a medula óssea está ativa principalmente nos ossos chatos da bacia, no esterno e na clavícula. Já em camundongos, ela está ativa nos ossos longos, como tíbia e fêmur. A hematopoese ocorre nos espaços extravasculares entre a superfície óssea e os sinus medulares (figura 4). Além disso, a distribuição das células hematopoéticas (tanto de acordo com a linhagem quanto ao grau de maturação) dentro da cavidade medular não é aleatória, existem microambientes histologicamente definidos, sendo subdivididos em 4 regiões: endosteal, subendosteal, central e peri-sinusoidal (LAMBERTSEN e WEISS, 1984; BALDUÍNO *et al.*, 2005). Diante disso, cada tipo celular é localizado em nichos específicos da medula óssea. Assim sendo, sabe-se que as células da linhagem granulocítica e macrofágica são encontradas em todas as regiões da medula óssea, enquanto as células da linhagem eritróide proliferam preferencialmente na região central. Por outro lado, as células hematopoéticas mais primitivas localizam-se na região subendosteal. Em contrapartida, a distribuição das células da linhagem linfóide é mais complexa. Os precursores de linfócitos B encontram-se na região subendosteal, diminuindo gradualmente em direção a região central, enquanto as células B maduras encontram-se espalhadas por toda a medula óssea (NILSSON *et al.*, 2001).

Como dito anteriormente, o fenômeno hematopoético é regulado por diversos fatores, dentre eles, as citocinas, que exercem um grande efeito sobre as células-tronco hematopoéticas, células em diferenciação e também sobre células maduras. Estas moléculas podem estar associadas a células e/ou à matriz extracelular do microambiente medular. Cerca de trinta fatores de crescimento ou citocinas que atuam no sistema hematopoético foram clonados e caracterizados (VERFAILLIE, 1998).

Na mielopoese, a eritropoetina é fundamental para a diferenciação de eritrócitos, enquanto que M-CSF atua na maturação de monócitos e G-CSF é importante na diferenciação de granulócitos. Além disso, existem fatores de crescimento essenciais para a auto-renovação das células-tronco

hematopoéticas, como IL-1, IL-3 e SCF. Fato interessante, é que algumas citocinas sozinhas, não induzem respostas, tendo efeito somente quando em sinergia com outras citocinas. Por outro lado, verifica-se também, a existência de reguladores negativos, que atuam na supressão da proliferação das células hematopoéticas, como TGF- β (DORSHKIND, 1990) e AcSDKP (ABALI *et al.*, 2002).

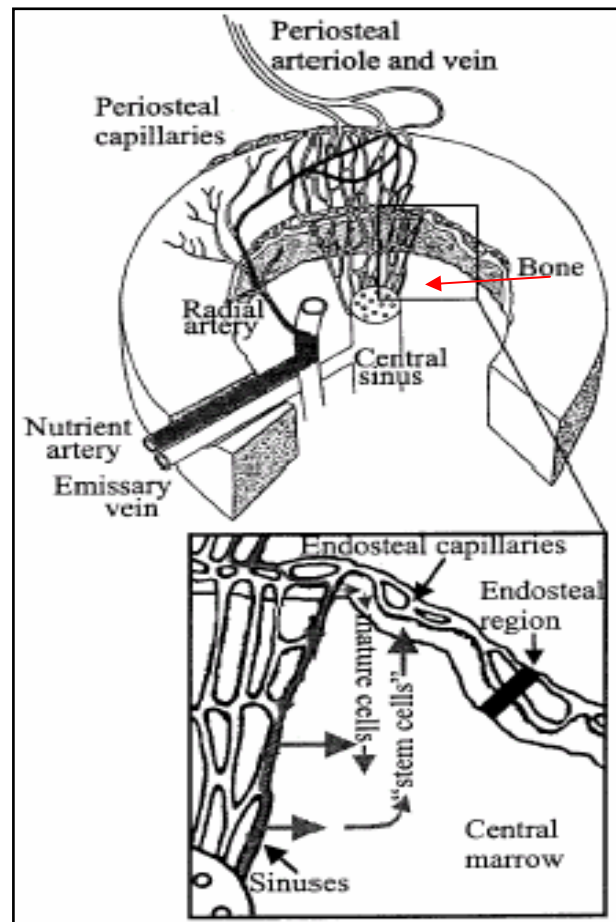


Figura 4: Modelo esquemático de corte transversal de um osso longo demonstrando o local de hematopoese (seta vermelha) e o fluxo das células hematopoéticas na cavidade medular (NILSSON *et al.*, 2001).

Não só a produção de citocinas e fatores de crescimento são importantes para a manutenção da hematopoese. Por muito tempo, acreditava-se que a matriz extracelular era um elemento inerte, responsável apenas pela organização tridimensional do arcabouço tecidual da cavidade medular. No entanto, sua composição inclui vários tipos de proteínas e açúcares que são secretados localmente pelas células estromais, como colágeno tipo I, III, IV e V, laminina, fibronectina e proteoglicanos. Estas moléculas participam de fenômenos que envolvem desde a simples adesão até os complexos mecanismos de proliferação e diferenciação celular (TAICHMAN *et al.*, 2000). Gupta *et al.* (1998) demonstraram que os fatores de crescimento interagem preferencialmente com proteoglicanos compostos por heparam sulfato, sendo estes capazes de modular a manutenção e proliferação das células hematopoéticas via estímulo justácrino.

Aliado a isto, existem grandes evidências de que as interações adesivas entre as células hematopéticas e as células estromais são essenciais para o processo hematopoético. Desta forma, as moléculas de adesão presentes nas células hematopoéticas e seus ligantes nas células estromais ou em componentes de matriz extracelular exercem um papel crucial nestas interações, que são realizadas, principalmente através de integrinas presentes nas células-tronco hematopoéticas, como VLA-4 e VLA-5, e que se ligam a VCAM-1 em células estromais, ou a componentes de matriz extracelular como fibronectina (COULOMBEL *et al.*, 1997). As interações adesivas são também responsáveis pela retenção das células hematopoéticas na medula óssea. Kikuta *et al.* (2000), sugeriram que as integrinas $\beta 1$ seriam responsáveis por este processo. Além disso, juntamente com as moléculas de adesão, as quimiocinas possuem grande participação no processo de manutenção das células na cavidade medular, uma vez que foi demonstrado que na ausência do receptor para SDF-1 α , os precursores de linfócitos B e mielóides migram para periferia (HIDALGO *et al.*, 2001).

Além disso, atualmente, sabe-se que o processo de maturação das células hematopoéticas na medula óssea são regulados por fatores de transcrição. Existe um “evento ordenado” de expressão gênica durante cada estágio de diferenciação. Na linfopoese B, a expressão de Pax-5 é considerada como um fator irreversível na cascata de diferenciação. Rolink *et al.* (2001), demonstraram que em animais Pax-5^{-/-} a diferenciação de linfócitos B fica bloqueada no estágio Pró-B. Quanto a mielopoese, esta é controlada por uma série de fatores de transcrição, sendo os principais Notch1 e PU.1, todavia não são considerados fatores de comprometimento (SCHROEDER, 2003).

Como fora descrito, a hematopoese no indivíduo adulto ocorre na medula óssea, contudo a hematopoese extramedular pode ser induzida em modelos experimentais ou pode estar associada a situações patológicas. Geralmente a hematopoese extramedular ocorre no fígado e baço, que foram órgãos hematopoéticos durante a vida fetal do indivíduo (DZIERZAK *et al.*, 1998). Portanto, mediante alterações no microambiente medular como a mielofibrose e neoplasias medulares, a hematopoese pode ser deslocada para periferia (MCCARTHY, 1985).

Em contrapartida, a produção de células mielóides e linfóides na medula óssea está intimamente associada ao microambiente hematopoético, em especial as células do tecido conjuntivo. A seguir, esclareceremos como estas células podem contribuir para a hematopoese.

1.3 O Microambiente hematopoético

O estroma hematopoético compreende vários tipos celulares, e de uma forma geral é representado por células de tecido conjuntivo, as quais são responsáveis por fornecer suporte estrutural e molecular ao sistema hematopoético. Desta forma, o termo célula estromal é um termo genérico, que se refere às células teciduais que formam o chamado microambiente hematopoético (DORSHKIND, 1990). Nesta população celular heterogênea, encontram-se as células endoteliais, fibroblastos, adipócitos, células reticulares e células-tronco mesenquimais. Apesar de pertencerem à linhagem hematopoética, os macrófagos também possuem “papel estromal”, uma vez que estas células produzem fatores importantes para o controle da manutenção e diferenciação de outras células hematopoéticas (WILKINS, 1992).

As células endoteliais revestem os vasos que atravessam a medula óssea, elas exercem efeitos sobre as células hematopoéticas através da secreção de fatores de crescimento, como G-CSF e GM-CSF, além de interagir com as células hematopoéticas através do contato célula-célula (HASTHORPE *et al.*, 1992). Por sua vez, as células reticulares, caracterizadas por sua grande extensão citoplasmática, mantêm contato muito próximo com as células hematopoéticas, e desta forma são capazes de fornecer citocinas e interações adesivas capazes de sustentar a proliferação e diferenciação das células hematopoéticas. Os fibroblastos secretam componentes de matriz extracelular, como colágeno, e assim contribuem com a manutenção do microambiente hematopoético (DORSHKIND, 1990). Por outro lado, na medula óssea são observadas histologicamente regiões de tecido adiposo. Estima-se que as células adiposas podem estar associadas a patologias do sistema hematopoético. Gordon *et al.* (1994), verificaram em pacientes portadores de leucemia mielóide crônica, poucas células acumuladoras de lipídeos. Além

disso, existem os macrófagos residentes, que estão intimamente associados com a linhagem eritróide. Acredita-se que esta interação seja necessária, uma vez que os macrófagos seriam fonte de ferro para a formação do complexo heme (WILKINS, 1992). É importante ressaltar que a medula óssea é innervada, e desta forma é submetida ao controle do sistema nervoso.

Como é possível verificar (figura 5), a interação entre as células estromais e as células hematopoéticas é muito estreita, uma vez que as células estromais serão a principal fonte de fatores que controlarão a manutenção do sistema por toda vida. As células estromais são fontes de citocinas, glicoproteínas e glicosaminoglicanos, dentre outros fatores, os quais, de acordo com a combinação proposta pelas próprias células estromais, formarão diferentes microambientes para as diferentes células hematopoéticas (BALDUÍNO *et al.*, 2005).

O fenômeno hematopoético *in vivo*, é um evento dinâmico. A expansão dos precursores hematopoéticos é acompanhada da liberação de células maduras para o sangue periférico, ao mesmo tempo em que o estroma está sendo informado do *status quo* do organismo, atendendo as sinalizações periféricas, desde pequenas alterações hormonais até processos patológicos.

Por outro lado, os modelos de estudos *in vitro* são simplificados e não reproduzem toda a complexidade de interações que ocorrem na medula óssea, mas são bons modelos para a compreensão de alguns aspectos das interações celulares (DORSHKIND, 1990). Diante disso, foram estabelecidos modelos de estudo da mielopoese e da linfopoese B *in vitro*, nos sistemas de Dexter e Whitlock & Wite, respectivamente, onde são estabelecidas culturas de longa duração de estromas de medula óssea, que reproduzem em parte os dois ramos da hematopoese. No modelo de cultura de Dexter, é possível manter as células progenitoras mielóides por várias semanas (SPOONCE *et al.*, 1994). Além destes modelos, os ensaios clonogênicos em meio semi-sólido, também são valiosos na avaliação do potencial proliferativo de células hematopoéticas (METCALF, 1984).

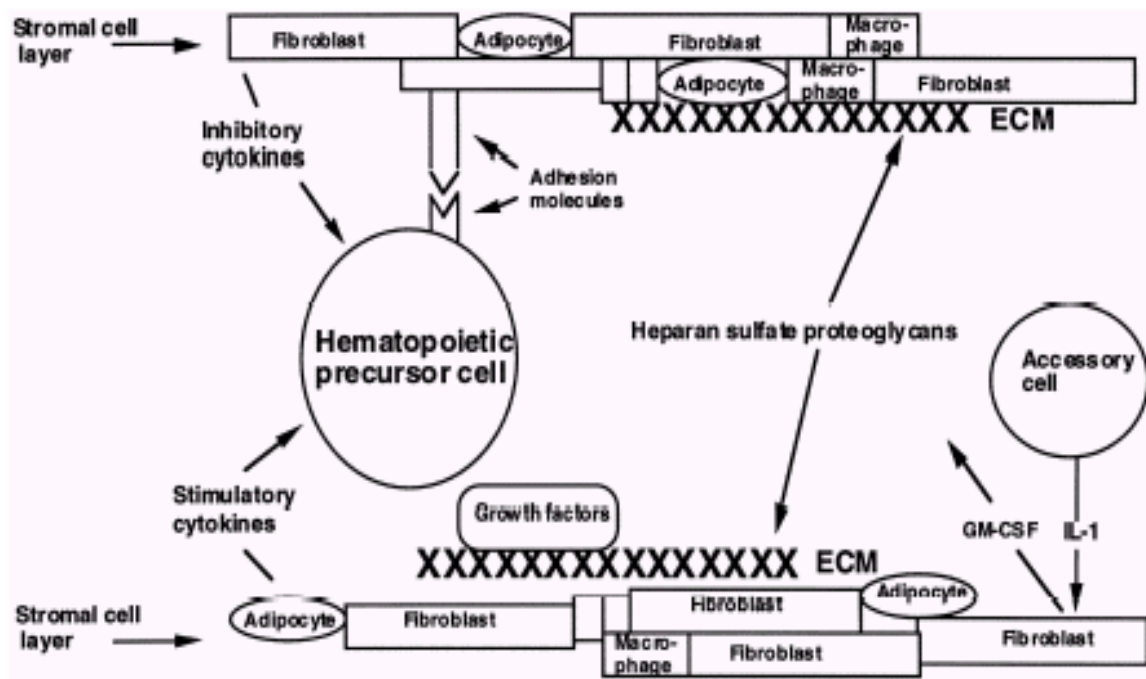


Figura 5: Modelo simplificado do microambiente hematopoético, demonstrando a interação das células estromais com os precursores hematopoéticos (GUEST e UETRECHT, 2000).

1.4 Sistema renina-angiotensina x medula óssea

É bem notável que o processo hematopoético é complexo. Em consonância a esta realidade, vários trabalhos têm demonstrado a possível participação do sistema renina-angiotensina (SRA) neste fenômeno. Resumidamente, este sistema está associado ao sistema circulante endócrino, envolvido principalmente na liberação de aldosterona e produção de angiotensina-II. Com a redução da pressão arterial, estímulo simpático, diminuição do aporte de sódio e aumento da concentração deste no túbulo renal distal, leva a liberação de renina pelo córtex. A renina atua sobre o angiotensinogênio, clivando-o, gerando assim, angiotensina-I, que em seguida

é convertido pela enzima conversora de angiotensina-I em angiotensina-II, que por sua vez é convertida em angiotensina III na glândula supra-renal (DE GASPARO *et al.*, 2000).

Em 1996, o grupo de Ibrahim Haznedaroglu, propôs o possível envolvimento do SRA nos eventos de proliferação, diferenciação e quiescência das células hematopoéticas na medula óssea. Neste trabalho, foi demonstrado através de reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa, a presença de RNA mensageiro para renina, angiotensinogênio e enzima conversora de angiotensina-I na medula óssea de pacientes portadores de leucemia e em pacientes normais, fornecendo assim, as primeiras evidências da possível participação do SRA na medula óssea.

Reforçando a hipótese da relação do sistema renina-angiotensina com a hematopoese, Rodgers *et al.* (2000) demonstraram que a angiotensina-II aumentou a proliferação de precursores eritróides, mielóides e de células hematopoéticas CD34⁺ *in vitro*, levando a ativação de receptores AT1 presentes nas células progenitoras. Em seguida verificou-se que este efeito proliferativo foi bloqueado por losartan, o antagonista do receptor AT1.

Em 1997, Mrug *et al.* observaram aumento do número de células progenitoras eritróides (BFU-E) na presença de angiotensina-II, e aliado a isto, mostraram que este octapeptídeo aumenta o rendimento de eritropoetina e de outros fatores de crescimento relacionados a eritropoese.

Por outro lado, trabalhos baseados em bioquímica, demonstraram aumento da concentração de enzima conversora de angiotensina-I e renina em aspirado da medula óssea de pacientes leucêmicos, mostrando desta forma, que o SRA pode estar associado a neoplasias (ABALI *et al.* 2002). Estes achados corroboram com os trabalhos do grupo de Wulf *et al.* (1998), que isolaram renina de células blásticas da medula óssea de pacientes portadores de leucemia mielóide aguda.

Além disso, Casares *et al.* (2002) avaliaram a expressão de renina em linhagens leucêmicas estabelecidas e em pacientes portadores de leucemias.

Neste trabalho verificou-se que a transcrição de renina desapareceu após remissão da doença, sugerindo que este peptídeo pode ser usado como marcador em leucemias, similar ao WT1, utilizado para avaliar o status de remissão de alguns tipos de neoplasias medulares (MENSSEN *et al.*, 1995).

Em contrapartida, é importante ressaltar que as vias de transdução de sinais são importantes na regulação da diferenciação das células hematopoéticas. Na via de sinalização JAK-STAT, estão envolvidos componentes das famílias de proteínas chamadas de Janus Kinases (JAKs) e os *Signal transducers and activators of transcription* (STATs). Foi demonstrado que esta via de sinalização é utilizada por fatores de crescimento, como G-CSF, GM-CSF, eritropoetina, trombopoetina e outras citocinas, via receptor AT1, presente nas células hematopoéticas. Além disso, a interação de angiotensina-II e o receptor AT1, leva a ativação de JAKs, que por sua vez são responsáveis por fosforilar as STATs, que são fatores de transcrição latentes no citoplasma, e quando ativados, migram para o núcleo onde mediam a transcrição de genes específicos, modificando assim, a resposta celular. Estes achados demonstram que esta via de sinalização pode estar em estreita associação com o sistema renina-angiotensina no microambiente medular (HAZNEDAROGLU *et al.*, 2000).

Aliado as evidências que apontam a participação do sistema renina-angiotensina na medula óssea, Goker *et al.* (2005) demonstraram através da PCR em tempo real, a expressão de renina, angiotensinogênio e enzima conversora de angiotensina-I em células-tronco de cordão umbilical humano. Estes achados estabeleceram uma nova fronteira de investigações na biologia das células-tronco de cordão umbilical, e a possível participação do SRA nos eventos relacionados à plasticidade destas células.

De fato, foram lançadas questões importantes sobre a ação do sistema renina-angiotensina sobre a hematopoese, e que até os dias de hoje não foram completamente esclarecidos, como por exemplo, o papel da enzima conversora de angiotensina-I nas leucemias mielóides e na diferenciação de linfócitos B.

No entanto, alguns autores têm se dedicado a este assunto, diante disso, Haznedaroglu e Öztürk (2003), em um simples e belo trabalho, pela primeira vez propuseram um modelo de interação do sistema renina-angiotensina com o microambiente hematopoético (figura 6).

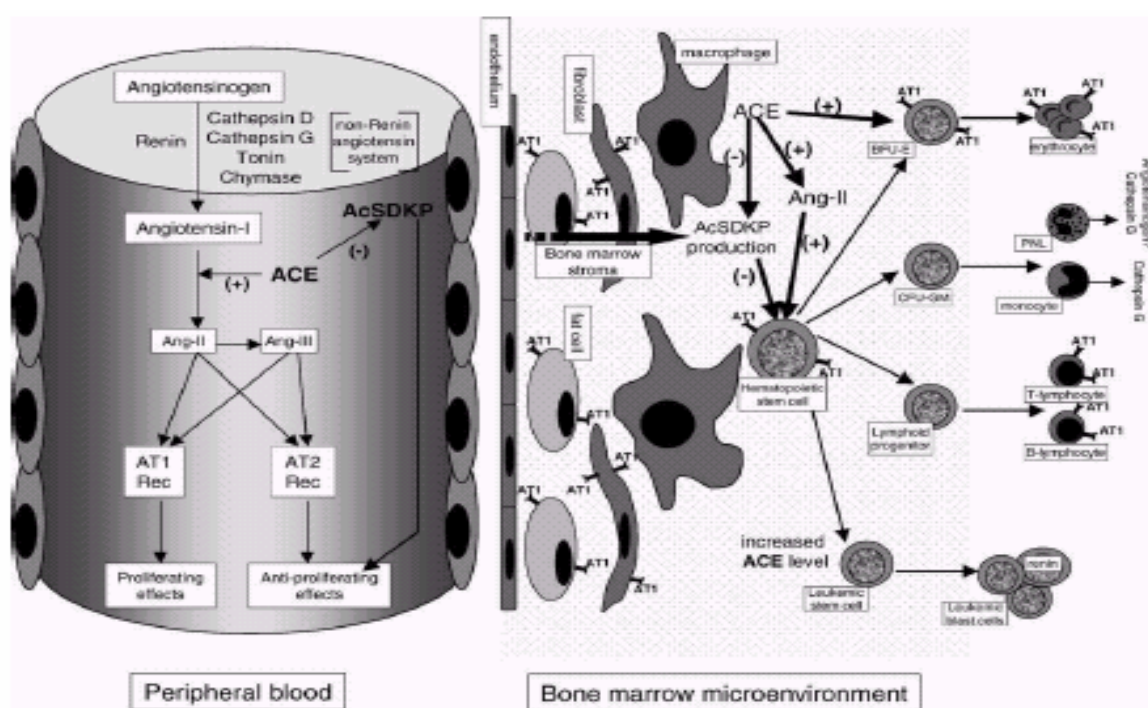


Figura 6: Representação esquemática do “hipotético” local do sistema renina-angiotensina na medula óssea proposto por Haznedaroglu e Öztürk (2003).

1.5 Enzima conversora de angiotensina-I x hematopoese

A enzima conversora de angiotensina-I é o componente-chave do sistema renina-angiotensina e possui papel importante na regulação da pressão sangüínea e controle de eletrólitos. No entanto, sua função fisiológica não está limitada somente ao sistema circulante endócrino. Estudos sugerem o envolvimento da ECA nos processos de proliferação e diferenciação das células hematopoéticas na medula óssea, tanto em situações normais quanto patológicas, via degradação de um de seus substratos endógenos, o tetrapeptídeo Acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro (AcSDKP), um regulador negativo da hematopoese (HAZNEDAROGLU e ÖZTÜRK, 2003).

A ECA é uma zinco-dipeptidil carboxipeptidase, que converte angiotensina-I em angiotensina-II, e pode clivar outros peptídeos, como a bradiginina e AcSDKP (CHARRIER *et al.*, 2004). Esta enzima apresenta dois domínios catalíticos, C e N terminal, onde apresentam alto grau de homologia. Fato interessante, e que foi muito bem demonstrado pelo grupo de Rousseau *et al.* (1995), que o AcSDKP é hidrolizado 50 vezes mais rápido pelo sítio ativo do domínio N quando comparado ao domínio C da ECA.

O AcSDKP, também chamado de goralatídeo, pertence à família de reguladores negativos da hematopoese, e foi pela primeira vez identificado em extratos de medula óssea de bezerros (LENFANT *et al.*, 1989). Em humanos, este peptídeo pode ser localizado em diferentes tecidos, como baço, intestino, timo e medula óssea (ROUSSEAU *et al.*, 1996). Por outro lado, os dados na literatura são controversos com relação à produção deste peptídeo no microambiente hematopoético. Estudos sugerem que o AcSDKP seria produzido por macrófagos e degradados pela ECA na membrana das células estromais (LI *et al.*, 1997). Outros autores, propõem que o goralatídeo seria

produzido a partir do polipeptídeo timosina $\beta 4$, uma vez que o AcSDKP representa a seqüência N-terminal desta timosina (GRILLON *et al.*, 1990).

As funções biológicas deste peptídeo tem sido amplamente exploradas, ora sobre a angiogênese (LIU *et al.*, 2003), ora sobre a regulação da diferenciação das células hematopoéticas. Portanto, como este peptídeo apresenta uma regulação negativa sobre a hematopoese, impedindo que as células pluripotentes entrem para a fase S do ciclo celular, sua aplicação como hematoprotetor juntamente com drogas citostáticas, no intuito de diminuir a mielotoxicidade, tem sido proposto por alguns autores (BOGDEN *et al.*, 1991; MASSÉ *et al.*, 1998; COMTE *et al.*, 1998). Aliado a isto, pelo fato da inibição da ECA na medula óssea resultar em aumento da concentração endógena deste peptídeo, trabalhos sugerem a utilização de drogas inibidoras da ECA como adjuvantes em neoplasias medulares (CHISI *et al.* 1999, 2000; ABALI *et al.* 2002a, 2002b).

Contudo, diante das evidências da possível participação da ECA na regulação da hematopoese. Em 1997, Comte *et al.* verificaram aumento progressivo no número de células progenitoras mixtas (CFU-mix) e diminuição no número de células progenitoras CFU-GM e BFU-E, em pacientes tratados com enalapril por quinze dias. Estes autores sugerem que esta discrepância pode estar associada à capacidade do tetrapeptídeo AcSDKP em modificar o estado de adesão das células progenitoras sobre o microambiente estromal, induzindo este estroma a alterar o destino destas células.

Em 1999, o grupo de Chisi utilizou a cultura de medula óssea de longa duração (DEXTER *et al.*, 1977) para avaliar a ação do captopril neste modelo experimental, e através de ensaios clonogênicos por soft-ágar obtidos semanalmente deste sistema de cultivo, observou-se diminuição da proliferação de células formadoras de colônias para granulócitos e macrófagos (CFU-GM). Estes achados sugerem que a inibição da ECA no microambiente da medula óssea resulta em aumento dos níveis de AcSDKP, impedindo assim, que tanto as células-tronco hematopoéticas quanto as células progenitoras entrem para a

fase S do ciclo celular, mantendo-as no estágio G0/G1, bloqueando a síntese de DNA. Em 2000, este mesmo grupo, demonstrou que, ao administrar captopril tanto em animais submetidos a radiações gama quanto aqueles tratados com citosina arabinosídeo (Ara-C), observou-se redução do potencial de proliferação de colônias de células-tronco hematopoéticas (HPP-CFC), protegendo assim, as células hematopoéticas primitivas dos efeitos tóxicos da quimioterapia. Estes dados são em parte, corroborados com a análise de Charrier *et al.* (2004), que demonstraram que a inibição da ECA por perindopril, induziu radioproteção, aumentou a sobrevida e acelerou a recuperação do microambiente hematopoético em animais letalmente irradiados.

Por outro lado, trabalhos baseados em imunocitoquímica, demonstraram a presença da ECA em células eritróides de medula óssea humana e aumento de sua expressão em pacientes portadores de síndrome mielodisplásica (MARUSIC-VRSALOVIC *et al.*, 2003).

1.6 Ontogenia dos complexos ciclopaladados

Inicialmente, acreditava-se que a classe dos complexos ciclopaladados (BPC) descritos por Caires *et al.* (1999) atuassem de forma específica sobre células tumorais. Na verdade, nesta nova classe de compostos recém sintetizados, o complexo paladaciclo ferroceno 1:2 demonstrou comportamento pleiotrópico, apresentando um variado leque de efeitos biológicos, e agindo em diferentes células e tecidos.

Foi demonstrado pelo nosso grupo, que este composto apresenta atividade antileucêmica em modelos de linhagens celulares estabelecidas, como HL60 (leucemia pró-mielocítica humana) e Jurkat (leucemia linfóide) através da indução de morte celular programada (BINCOLETTTO *et al.*, 2004). Diante desse

quadro, dados na literatura sugerem a participação de enzimas lisossomais na indução de apoptose em linhagens de células tumorais (FOGHSGAARD *et al.*, 2001). Por isso, avaliamos o efeito deste paladaciclo sobre a linhagem K562 (BINCOLETTO *et al.*, 2005), onde observamos por microscopia confocal, que este composto se acumula nos lisossomas, permeabilizando suas membranas, com conseqüente liberação de catepsina B para o citosol, onde ativam proteínas envolvidas no processo apoptótico. Em face da propriedade lisossomotrófica do paladaciclo ferroceno 1:2, quando administrado a 6 μ M, nós sugerimos que este composto induz apoptose em células K562 de forma independente da modulação da expressão de membros da família Bcl-2 (BARBOSA *et al.*-no prelo).

Reforçando a hipótese da atividade antineoplásica destes compostos, Bincoletto *et al.* (2005) demonstraram o potencial antitumoral do paladaciclo ferroceno 1:1 em animais portadores de tumor de Walker, e verificou-se aumento de sobrevida associado à diminuição da massa tumoral. E aliado a isto, através de biópsia do fígado, rins e baço, observou-se baixa toxicidade sistêmica nestes animais. Estes achados sugerem que este composto pode estar relacionado à atividade inibitória sobre a catepsina B, uma vez que esta enzima está diretamente associada à degradação de componentes de matriz extracelular em processos metastáticos.

Diante desse quadro, Rodrigues *et al.* (2003) avaliaram a aplicação dos complexos ciclopaladados contendo ligantes bifosfínicos dppe. Neste elegante trabalho, foi demonstrado efeito inibitório destes compostos sobre a proliferação celular em linhagem estabelecida de melanoma murino (B16F10) *in vitro*, e estas (B16F10-Nex2) quando transplantadas em camundongos e tratados com paladaciclo, verificou-se aumento de sobrevida e diminuição da massa tumoral no período de estudo.

Por outro lado, trabalhos de Bincoletto *et al.* (2003) e Caires *et al.* (2004), utilizando modelo de cultura de células hematopoéticas de longa duração de medula óssea (Sistema de Dexter), demonstraram que o complexo paladaciclo

ferroceno 1:2 possui propriedade inibitória sobre a enzima conversora de angiotensina-I (ECA) em concentrações mínimas (1 μM). Foi observado aumento significativo da população estromal e diminuição gradativa no número de CFU-GM, obtidos deste sistema de cultivo. Estes resultados são corroborados com os trabalhos do grupo de John Chisi (1999), que avaliaram a ação do captopril neste mesmo modelo de estudo. Estes achados estabeleceram uma nova era acerca dos estudos envolvendo o papel do paladaciclo ferroceno 1:2 sobre a hematopoese.

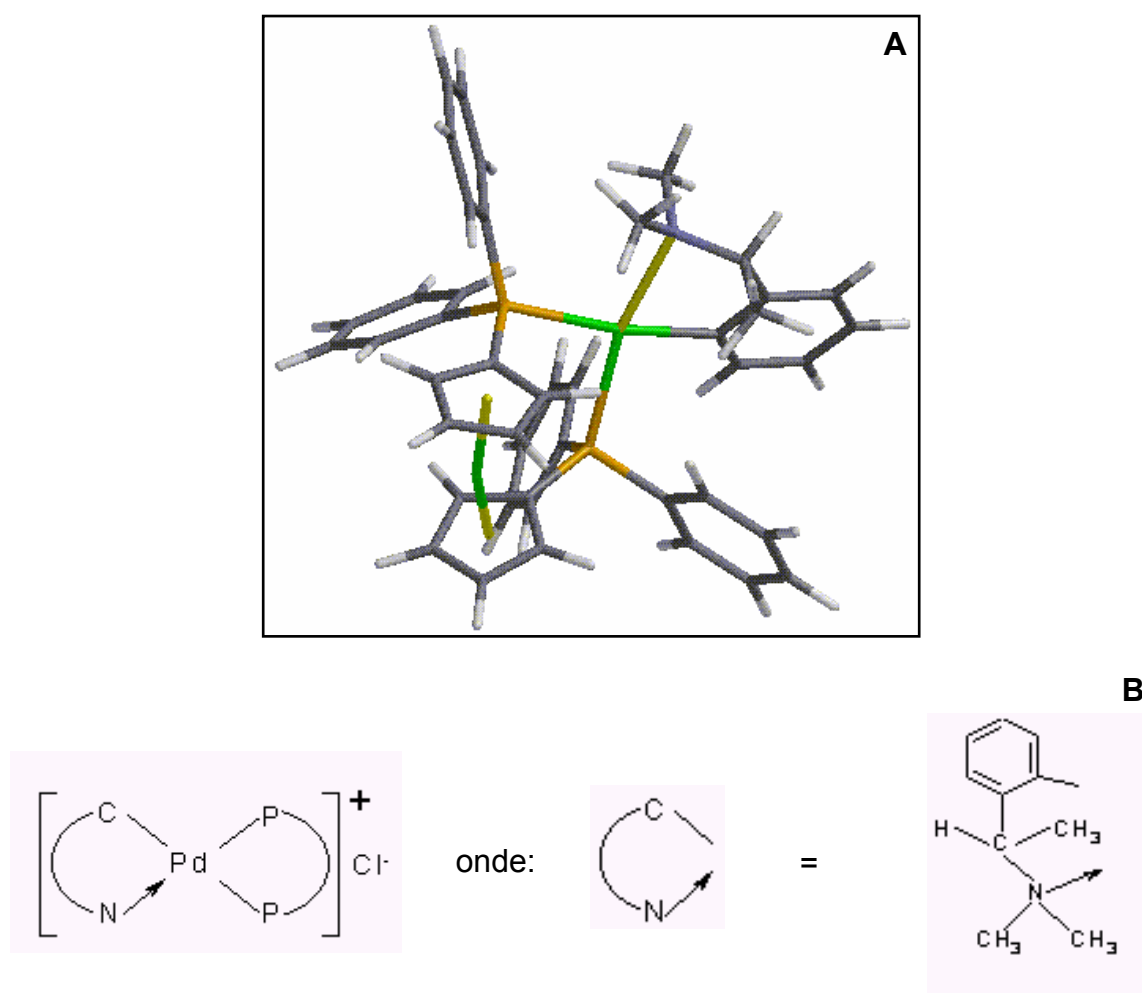


Figura 7: (A) Modelo tridimensional da estrutura do complexo paladaciclo ferroceno 1:2. **(B)** Estrutura molecular do complexo paladaciclo ferroceno 1:2 - $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N}-(\text{S}^-) \text{dmpa})(\text{dppf})] \text{Cl}$.

Como fora descrito anteriormente, verifica-se que a ECA possui participação na hematopoese medular. Sabendo-se que o complexo paladaciclo ferroceno 1:2 apresenta comportamento inibitório sobre a enzima conversora de angiotensina-I, e ao fato desta enzima estar associada aos eventos de quiescência, proliferação e diferenciação das células hematopoéticas na medula óssea. O trabalho em questão buscou ampliar o conhecimento acerca do efeito inibitório do complexo paladaciclo ferroceno 1:2 sobre a ECA, e o papel deste sobre a proliferação de progenitores mielopoéticos e fibroblastóides da medula óssea.

Para tal finalidade, utilizamos o sistema de co-cultivo de células hematopoéticas não-aderentes da medula óssea de animais normais sobre a linhagem celular estromal S-17, e a partir deste modelo experimental, quantificamos através de ensaios clonogênicos em soft-ágar os progenitores mielóides no 3º, 7º e 10º dia de co-cultura. Além disso, quantificamos as células hematopoéticas totais neste curso temporal, e aliado a isto, avaliamos o papel do paladaciclo ferroceno 1:2 em cultura primária de células progenitoras fibroblastóides de medula óssea (CFU-F). Nestes ensaios utilizamos captopril como parâmetro de referência.

Em paralelo, investigamos os efeitos citotóxicos do complexo paladaciclo ferroceno 1:2 sobre as células estromais S-17. Para isto, utilizamos o teste de redução do MTT a formazan e o método de exclusão por azul de trypan. Avaliamos também, por espectrofluorimetria, a atividade da ECA nas células S-17, e em seguida verificamos por RT-PCR a expressão de RNA mensageiro para ECA neste estroma.

1.7 OBJETIVOS

1.7.1 Geral

Até o momento, a literatura descreve de forma abrangente, a possível participação da ECA na regulação da hematopoese. Diante destas evidências, e de poucos estudos explorando este tema, o objetivo do nosso trabalho foi investigar os efeitos tóxico-farmacológicos do complexo paladaciclo ferroceno 1:2 sobre a hematopoese medular, utilizando sistema de cultivo bidimensional *in vitro*, buscando ampliar o conhecimento sobre as interações entre as células estromais e os progenitores hematopoéticos na presença deste composto, com especial atenção ao seu papel inibitório sobre a ECA.

1.7.2 Específicos

- Caracterizar os efeitos citotóxicos do complexo paladaciclo ferroceno 1:2 sobre as células estromais S-17 através da técnica de exclusão com o corante Azul de Trypan e o teste de redução do MTT a formazan;
- Avaliar a atividade da ECA nas células S-17, por espectrofluorimetria;
- Avaliar o papel funcional da linhagem permanente S-17 quanto à capacidade de sustentação e diferenciação da mielopoese *in vitro* na presença do complexo paladaciclo ferroceno 1:2, através de ensaios de co-cultura;

- Quantificar os precursores mielóides para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) obtidos dos ensaios de co-cultivo, através de ensaios clonogênicos em soft-ágar;
- Quantificar os progenitores mesenquimais da medula óssea de camundongo adulto normal na presença do complexo paladaciclo ferroceno 1:2, através de cultura primária de células progenitoras fibroblastóides (CFU-F);
- Avaliar por RT-PCR, a expressão de RNA mensageiro para ECA nas células estromais S-17.

2 MÉTODO

2.1 Paladaciclo ferroceno 1:2

O complexo paladaciclo ferroceno 1:2 foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Antonio Carlos Fávero Caires do Centro Interdisciplinar de Investigação Bioquímica (CIIB) da Universidade de Mogi das Cruzes (Brazilian Patent – PI 0204160). Para execução dos experimentos, utilizamos DMSO como solvente, cuja concentração final não ultrapassou 0,1%.

2.2 Captopril, AcSDKP e Abz-YRK(Dnp)P-OH

O composto captopril (D-3-mercapto-2-methylpropionyl-L-proline) e o tetrapeptídeo AcSDKP (N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline) foram obtidos do fabricante Sigma Chemical Co, e o peptídeo fluorogênico Abz-YRK(Dnp)P-OH (ALVES *et al.*, 2005) foi gentilmente cedido pela Prof. Dr^a Adriana K. Carmona do Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP/EPM).

2.3 Animais

Foram utilizados camundongos da cepa Balb/c, com 6 a 10 semanas de idade, provenientes do biotério da UMC. Os animais foram mantidos em sala climatizada sob ciclo claro-escuro de 12 horas e submetidos a regime alimentar com ração comercial padrão. O parecer do Comitê de Ética encontra-se em anexo.

2.4 Linhagem celular S-17 (Estroma de Medula Óssea)

Linhagem derivada de estroma hematopoético medular murino, com competência linfóide e mielopoética (Collins & Dorshkind, 1987), obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ – HUCFF, UFRJ). Estas células foram mantidas em meio DMEM (Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO) em estufa úmida a 37°C e 5% CO₂, e foram utilizadas neste trabalho com autorização expressa de Dr. Kenneth Dorshkind (Universidade da Califórnia).

2.5 Avaliação da citotoxicidade pela metodologia do MTT

A determinação da citotoxicidade foi realizada em placas de 96 poços a partir de uma adaptação da metodologia descrita por Mosmann *et al.* (1983).

As células S-17 foram cultivadas em garrafas de 25-cm² (Corning) (DMEM+10%SFB) até a obtenção da monocamada, e submetidas à dissociação enzimática pela tripsina/EDTA em CMF.BSS por um período não superior a 3 minutos. Em seguida preparamos uma suspensão celular de forma a plaquear 3x10³ células por poço. Após este procedimento, adicionamos em cada poço concentrações seriadas do composto paladaciclo ferroceno 1:2 (0,5 µM, 1,2 µM; 2,3 µM; 3,5 µM; 4,7 µM; 6,0 µM; 8,8 µM; 11,8 µM), todas em triplicata, e procedeu-se à incubação das placas de cultura por 72 horas em estufa a 37°C e 5% CO₂. Foram realizados 3 experimentos independentes. Avaliamos também, o efeito do captopril nestas células nas mesmas condições descritas acima.

Decorrido 72 horas, foram adicionados a cada poço das placas de cultura, 10 µL de uma solução de 5mg/mL de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-1)-2,5 difenil brometo de tetrazólio (MTT) (Sigma) em BSS. Após 4 horas de incubação a 37°C, a reação foi interrompida e os cristais de formazan foram dissolvidos com adição de uma solução a 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS) em HCl 0,01N, seguindo-se uma incubação por 12 horas.

O resultado final foi avaliado por espectrofotometria a 540 nm em um leitor ELX 800® (Bio-Tek Instruments, INC).

2.6 Viabilidade celular através do método de exclusão com o corante Azul de Trypan

A viabilidade celular foi realizada como descrito por Boschert *et al.* (2002), previamente modificado.

As células S-17 foram mantidas em garrafas de 75-cm² (Corning) (DMEM+10%SFB) até atingirem 70-100% de confluência, e depois a monocamada foi dissociada em solução de tripsina/EDTA. Em seguida, preparamos uma suspensão celular de forma a plaquear 1x10⁵ células por garrafa de 25-cm² (Corning). Após este procedimento, adicionamos em cada frasco as concentrações de 0,5 µM; 1,2 µM e 3,5 µM do composto paladaciclo ferroceno 1:2, todas em triplicata. Incubamos em estufa a 37°C e 5% CO₂ por 72 horas.

Após este tempo, as culturas foram interrompidas e as células submetidas ao processo de tripsinização. Lavamos as células com PBS e fizemos uma suspensão final de 1 mL. Diluímos (1:2) no corante Azul de Trypan e contamos em câmara hemocitométrica.

2.7 Dosagem de atividade da enzima conversora de angiotensina-I (ECA) nas células estromais S-17

As células S-17 foram cultivadas em garrafa de 75-cm² (DMEM+10%SFB), até atingirem confluência. Neste ponto, renovamos o meio de cultura e cultivamos as células por mais 48 horas. Após este tempo, lavamos a monocamada 3 vezes com solução salina balanceada (BSS) e, em seguida, tratamos com tampão de lise Tris-HCl 50 mM 0,1% Triton X, pH=7,5. O material foi recolhido, homogeneizado exaustivamente e centrifugado por 10 min. a 10.000 rpm.

A atividade enzimática da ECA nas células S-17 foi determinada por espectrofluorimetria (Fluorescence Spectrophotometer, HITACHI F-2000), utilizando-se o substrato fluorogênico Abz-YRK(Dnp)P-OH (ALVES *et al.*, 2005).

Resumidamente, cerca de 200 μ L da suspensão de células (lisado) foram incubados, a 37°C, com 1 μ M do substrato Abz-YRK(Dnp)P-OH no tampão TrisHCl 100 mM, pH=8,0, contendo 300 mM NaCl e 50 μ M ZnSO₄, na presença ou não de 1 μ M do inibidor específico da ECA, captopril. A dosagem da ECA na presença do paladaciclo ferroceno 1:2 foi avaliada nas mesmas condições descritas acima. A fluorescência liberada decorrente da hidrólise do substrato foi monitorada em tempo real, e a dosagem protéica foi determinada pelo método de Bradford (1976), tanto no sobrenadante quanto no extrato celular.

2.8 Co-cultura de células não aderentes da medula óssea sobre as células estromais S-17

As co-culturas de células não aderentes da medula óssea foram preparadas como descrito por Borojevic *et al.* (1993).

Com auxílio de pinças e tesouras, os fêmures dos camundongos foram retirados, todo tecido conjuntivo não-ósseo foi removido e a cavidade medular foi aberta e, com auxílio de seringa, agulha e meio de cultura, retirou-se a medula óssea (“*flushing*”). As células foram homogeneizadas com auxílio de pipeta Pasteur, em meio DMEM (Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO) e antibióticos. A suspensão foi transferida para placas de Petri de 60 mm e mantidas em estufa úmida de CO₂, a 37°C, por 1 hora, para retirada das células aderentes. Após a adesão, as células não-aderentes foram homogeneizadas, transferidas para tubos de 15 mL, centrifugadas por 10 min. a 1200 rpm. e ressuspensas em solução de ACK por 5 min., seguido de lavagem com BSS suplementado com 3% de soro fetal bovino (GIBCO) por 2 vezes e por fim contadas.

Em placas de 6 poços, cultivamos as células S-17 em meio DMEM (Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO) e antibióticos, até a obtenção da monocamada. Neste ponto, o meio foi retirado e 4 mL da suspensão de células hematopoéticas (1×10^5 células/well) foram adicionados em cada poço. Em seguida, adicionamos em cada poço as concentrações de 0,5 μ M; 1,2 μ M e 3,5 μ M do composto paladaciclo ferroceno 1:2. Os ensaios foram feitos em comparação ao composto captopril (Sigma), nas mesmas condições descritas acima. Também co-cultivamos células hematopoéticas na presença do tetrapeptídeo AcSDKP (10^{-9} M) (Sigma).

Após 3, 7, e 10 dias de co-cultura, as células foram avaliadas. Para isto, as culturas foram dissociadas mecanicamente, homogeneizadas, seguindo passagem em membrana de *nylon* para retirada dos grumos de células estromais, e em seguida contadas em câmara de Newbauer.

2.9 Ensaio clonogênico de precursores hematopoéticos por soft-ágar (CFU-GM)

Neste ensaio, quantificamos os precursores hematopoéticos para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) obtidos dos ensaios de co-cultivo, como previamente descrito por Aizawa *et al.* (1998).

A obtenção das células não-aderentes da medula óssea foi realizada conforme descrito no item 3.8. Após a adesão, as células não-aderentes foram homogeneizadas, transferidas para tubos de 15 mL, centrifugadas por 10 min. a 1200 rpm. e ressuspensas em solução de ACK por 5 min., seguido de lavagem com BSS suplementado com 3% de soro fetal bovino (GIBCO) por 2 vezes e por fim contadas.

Em garrafas de 25-cm² (Corning), cultivamos as células S-17 em meio DMEM (Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO) e antibióticos, até atingirem 70% de confluência. Neste estágio, o meio foi removido, a monocamada lavada 3x com BSS e 6 mL da suspensão de células hematopoéticas (1×10^6 células/frasco) foram adicionados em cada garrafa. Em seguida, adicionamos por frasco, as concentrações de 0,5 μ M; 1,2 μ M e 3,5 μ M dos compostos paladacilo ferroceno 1:2 e captopril, além do controle positivo com peptídeo AcSDKP (10^{-9} M) (Sigma).

Para 3, 7, e 10 dias de co-cultura, o sobrenadante foi recolhido e a monocamada foi lavada exaustivamente com CMF.BSS suplementado com EDTA, depois filtrado em membrana de *nylon*. As amostras foram centrifugadas por 10 min. a 1200 rpm., ressuspensas em meio DMEM 1x e contadas em câmara de Newbauer.

Em seguida, preparamos o meio semi-sólido com os seguintes componentes por placa de 35 mm: 50% de ágar (Difco), 30% de meio DMEM 2x (Sigma), 20% de soro fetal bovino (Gibco), 1ng de rGM-CSF (Sigma) e suspensão de células (1×10^5). Adicionamos 2 mL por placa, todas em triplicata, e após gelificação, incubamos por 7 dias em estufa úmida de CO₂, a 37°C, e procedemos a contagem das colônias em microscópio óptico de inversão.

2.10 Cultura primária de células progenitoras fibroblastóides da medula óssea (CFU-F)

O ensaio clonogênico de progenitores fibroblastóides foi realizado segundo a metodologia descrita por Van Den Heuvel *et al.* (2001).

Com auxílio de pinças e tesouras, os fêmures dos camundongos foram retirados, todo tecido conjuntivo não-ósseo foi removido e a cavidade medular foi aberta e, com auxílio de seringa, agulha e meio de cultura, retirou-se a medula óssea (*flushing*). As células foram homogeneizadas com auxílio de pipeta Pasteur, em meio α -MEM (Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO), 10% de soro eqüino (GIBCO), 2 mM de L-glutamina e antibióticos. Em seguida, plaqueamos 3×10^6 células totais da medula óssea em garrafas de 25-cm². Adicionamos as concentrações de 0,5 μ M; 1,2 μ M e 3,5 μ M dos compostos paladacilo ferroceno 1:2 e captopril, todas em triplicata, e mantemos em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ por 10 dias. Em intervalos de 4 dias, renovamos 50% do meio de cultura e adicionamos as concentrações dos compostos descritos anteriormente. No 10º dia foi realizada contagem global das colônias em microscópio de inversão.

2.11 Reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (RT-PCR)

Em garrafas de 75-cm² (Corning), cultivamos as células S-17 em meio DMEM suplementado com 10% SFB, a 37°C e 5% CO₂, por 72 horas. De forma análoga, cultivamos células S-17 na presença do complexo paladacilo ferroceno 1:2 nas concentrações de 0,5 μ M; 1,2 μ M e 3,5 μ M. Decorrido o tempo, as culturas foram lavadas 2 vezes com CMF.BSS, e depois a monocamada dissociada em solução de tripsina/EDTA. As suspensões celulares foram centrifugadas por 10 min. a 1200 rpm. e os pellets ressuspensos em meio DMEM com 10% SFB, seguido de lavagem com BSS por 3 vezes e por fim ressuspensos em 1 mL de Trizol[®] Reagent (GIBCO).

2.11.1 Purificação de RNA

Em seguida, adicionamos 200 μ L de clorofórmio, agitamos vigorosamente por 15 segundos, seguido de repouso por 2-3 minutos para separar a fase aquosa que contém o RNA. Em seguida, centrifugamos por 15 min. a 14000 g, recolhemos a fase aquosa, transferimos para outro tubo, adicionamos 500 μ L de álcool isopropílico e deixamos em repouso por 10 minutos para precipitação do RNA, e após este tempo, centrifugamos por 10 min. a 14000 g, descartamos o sobrenadante e lavamos o pellet em 1 mL de etanol 75%. Por fim, centrifugamos por 10 min. a 14000 g, descartamos o sobrenadante, deixamos secar bem o pellet e, finalmente ressuspendemos em água DEPC. Por espectrofotometria, a 260 nm, quantificamos o RNA total.

2.11.2 Síntese de c-DNA

Os c-DNAs foram preparados a partir da metodologia descrita por Ehlers e Smith (1991) e, para tal finalidade, utilizamos 1 μ g de RNA total. Resumidamente, realizamos a reação em tampão Tris-HCl (50 mM; pH 8,3), 40 mM KCl, 6 mM MgCl₂, 1 mM dNTP, 60 μ g random primer, 40U inibidor de RNase, 200U de MLV (transcriptase reversa) (Invitrogen) e água DEPC. O anelamento com o *primer* foi feito a 65°C por 10 minutos e, a síntese propriamente dita, aconteceu a 37°C por 60 minutos. Ao final, elevamos a temperatura até 95°C, por 5 minutos. As amostras foram armazenadas a -20°C.

2.11.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação de amplificação de fragmentos específicos de c-DNA foi feita pela metodologia do PCR. Foram utilizados primers murinos para β -actina e enzima conversora de angiotensina-I (tabela 1). Em suma, para cada reação de amplificação, utilizamos tampão de PCR 10x, 1,5 mM $MgCl_2$, 200 μ M dNTP, 200nM mix de primers, 2,5 μ L da amostra de c-DNA e 1U Taq DNA polimerase (Invitrogen). Cada ciclo de amplificação do PCR consistiu de desnaturação (94°C por 1 minuto), anelamento (60°C por 1 minuto) e extensão (72°C por 1 minuto). Foram feitos 33-40 ciclos de amplificação, finalizados com uma etapa a 72°C por 7 minutos. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em TBE 0,5x. Após a eletroforese, o gel foi incubado em solução de brometo de etídeo por 10 minutos, em seguida, colocado em água corrente por 5 minutos para remover o excesso do brometo e finalmente analisado por transluminação (ultravioleta).

Tabela 1: Lista dos primers utilizados na reação de PCR.

Primers		Seqüência	pb	Referência		
β -actina	senso	5' GTGGGCCGCTCTAGGCACCA 3'	540	Alonso	et	al., 1986
	anti-senso	5' CTCTTTGATGTCACGCACGATTTC 3'				
ECA	senso	5' CCACTACACCAGTGTGAC 3'	574	Rocha	et	al., 2005
	anti-senso	5' TTGCCAGCTGGCCTCTGC 3'				

2.12 Ensaio de adesão de células hematopoéticas mononucleares sobre as células S-17

Com auxílio de pinças e tesouras, os fêmures dos camundongos foram retirados, todo tecido conjuntivo não-ósseo foi removido e a cavidade medular foi aberta e, com auxílio de seringa, agulha e meio de cultura, retirou-se a medula óssea (*flushing*). As células foram homogeneizadas com auxílio de pipeta Pasteur, em meio DMEM (Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO) e antibióticos. Em seguida, as células foram separadas por densidade, utilizando Ficoll-Histopaque na densidade de $1,077\text{g/cm}^3$, centrifugando a 1500 rpm, por 25 minutos, a 20°C . As células presentes na interface do meio de cultura com Ficoll foram recolhidas, lavadas 3 vezes em BSS e contadas.

Em placas de 6 poços, cultivamos as células S-17 até a obtenção da monocamada. Neste ponto, retiramos o meio velho e adicionamos 1 mL de meio fresco, contendo 5×10^5 células hematopoéticas mononucleares de baixa densidade. Em seguida, adicionamos em cada poço os compostos captopril e paladaciclo ferroceno 1:2 na concentração de $1,2\ \mu\text{M}$, além do tetrapeptídeo AcSDKP a 1 nM, todos em triplicata. Incubamos em estufa de CO_2 , a 37°C , por 4 horas. Após este tempo, recolhemos o sobrenadante e lavamos a monocamada exaustivamente, com salina sem cálcio e magnésio suplementada com EDTA. Filtramos em malha de *nylon*, lavamos as células com PBS, preparamos uma suspensão final de 1 mL e contamos em câmara de Newbauer.

2.13 Análises estatísticas

As avaliações estatísticas foram feitas através de análise de variância (ANOVA) e, quando observado diferenças significativas entre os grupos, utilizou-se o teste de Tukey-Kramer.

3 RESULTADOS

3.1 Morfologia das Células S-17

A linhagem estabelecida S-17, derivada de estroma hematopoético medular murino, apresenta morfologia fibroblastóide, com padrão de proliferação em monocamada e exibe inibição da proliferação pelo contato célula-célula durante a confluência (figura 8).

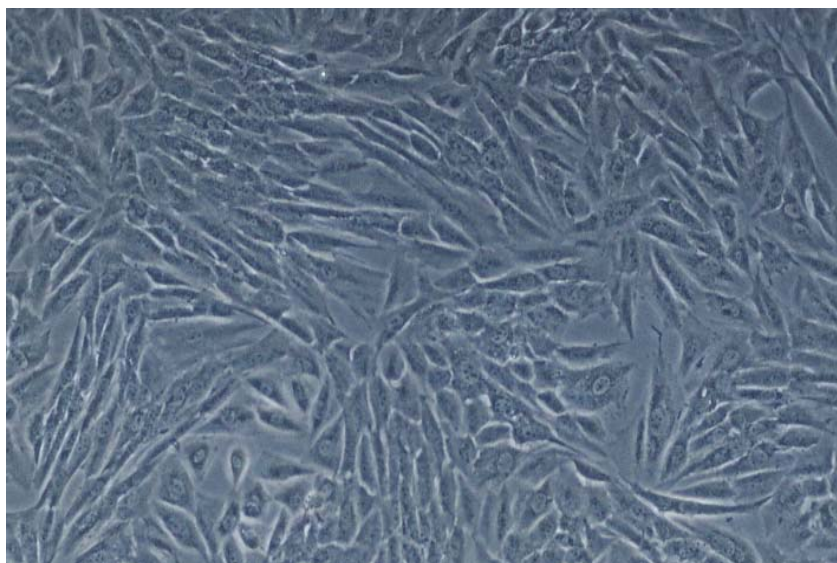


Figura 8: Morfologia das células S-17 ao microscópio óptico invertido. Monocamada confluyente. Microscopia de contraste de fase, aumento de 125x.

3.2 Teste de redução do MTT

O teste de redução do MTT nos permitiu avaliar a proliferação das células S-17 frente ao complexo paladaciclo ferroceno 1:2 na presença de 8 concentrações (0,5 μ M-11,8 μ M). Resumidamente, neste ensaio avaliou-se a capacidade da enzima succinato desidrogenase em reduzir o MTT à cristais de formazan, que em seguida, foram quantificados por ensaio colorimétrico. Pela análise da figura 9, podemos observar que este composto apresenta uma concentração inibitória 50% igual a 3,7 μ M. Por outro lado, o composto captopril não apresentou citotoxicidade neste estroma.

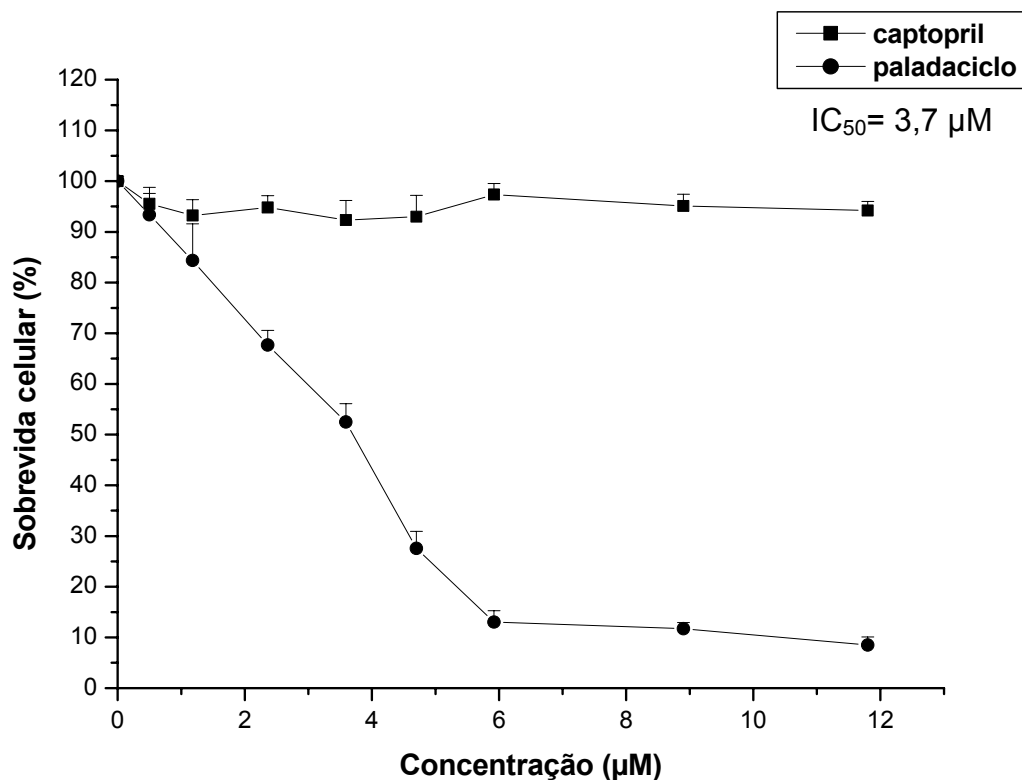


Figura 9: Sobrevida celular referente à linhagem estabelecida S-17 na presença de 8 concentrações (0,5 μ M-11,8 μ M) do complexo paladaciclo ferroceno 1:2 e captopril, à 37°C, por 72h. Os resultados estão expressos em porcentagem em relação ao controle, $p < 0,05$, ANOVA, Tukey-Kramer.

3.3 Viabilidade celular por Azul de Trypan

Tendo como base o *screening* inicial de concentrações analisadas pelo ensaio do MTT (0,5 μ M-11,8 μ M), selecionamos 3 destas para dar continuidade ao trabalho.

Pelo método de exclusão com o corante Azul de Trypan, verificamos a viabilidade celular da linhagem permanente S-17 na presença de 3 concentrações (0,5 μ M; 1,2 μ M e 3,5 μ M) do complexo paladaciclo ferroceno 1:2. Esta técnica permitiu avaliarmos a permeabilidade da membrana plasmática, uma vez que este corante atravessa a membrana de células em estado apoptótico ou necrótico. A figura 10 demonstra que o número de células viáveis foi dose-dependente, apresentando IC₅₀ igual a 2,0 μ M.

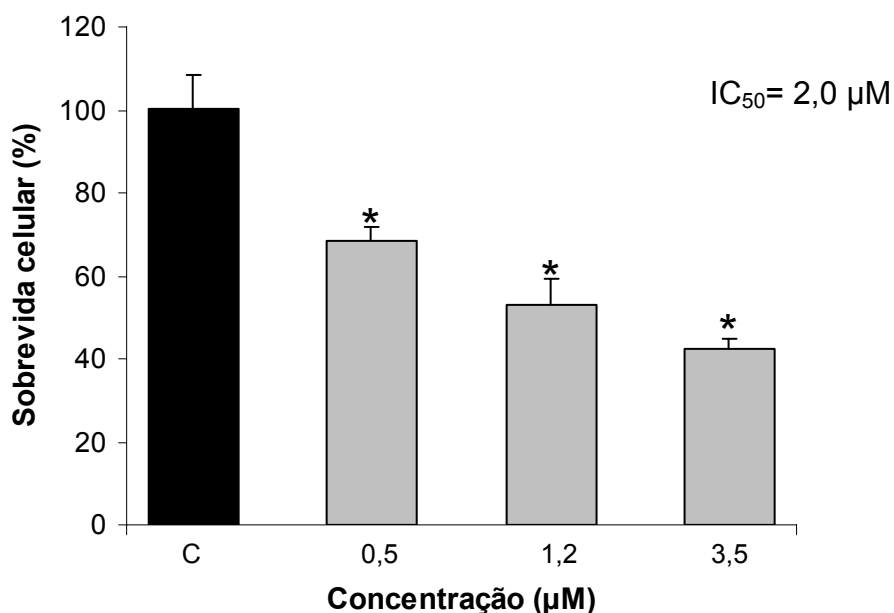


Figura 10: Viabilidade celular das células S-17 na presença das concentrações 0,5 μ M; 1,2 μ M e 3,5 μ M do complexo paladaciclo ferroceno 1:2, à 37°C, por 72h. Diferenças significativas apresentam $p < 0,005$ (*), ANOVA, Tukey-Kramer.

3.4 Análise da atividade da ECA nas células S-17

Neste ensaio, avaliamos por espectrofluorimetria a atividade da enzima conversora de angiotensina-I nas células S-17. Analisamos tanto o extrato celular quanto o sobrenadante, na presença de captopril e paladacilo ferroceno 1:2. Nossos resultados demonstraram baixa atividade da ECA no extrato celular mesmo na ausência de ambos os compostos (figura 11A). No entanto, verificamos maior atividade da ECA no sobrenadante, e posteriormente observamos diminuição desta atividade na presença dos compostos captopril e paladacilo ferroceno 1:2, mostrando assim, a presença desta enzima neste modelo celular. Aliado a isto, nossos dados demonstraram que o captopril apresentou um potencial inibitório sobre a ECA 2 vezes maior quando comparado ao paladacilo ferroceno 1:2 (figura 11B).

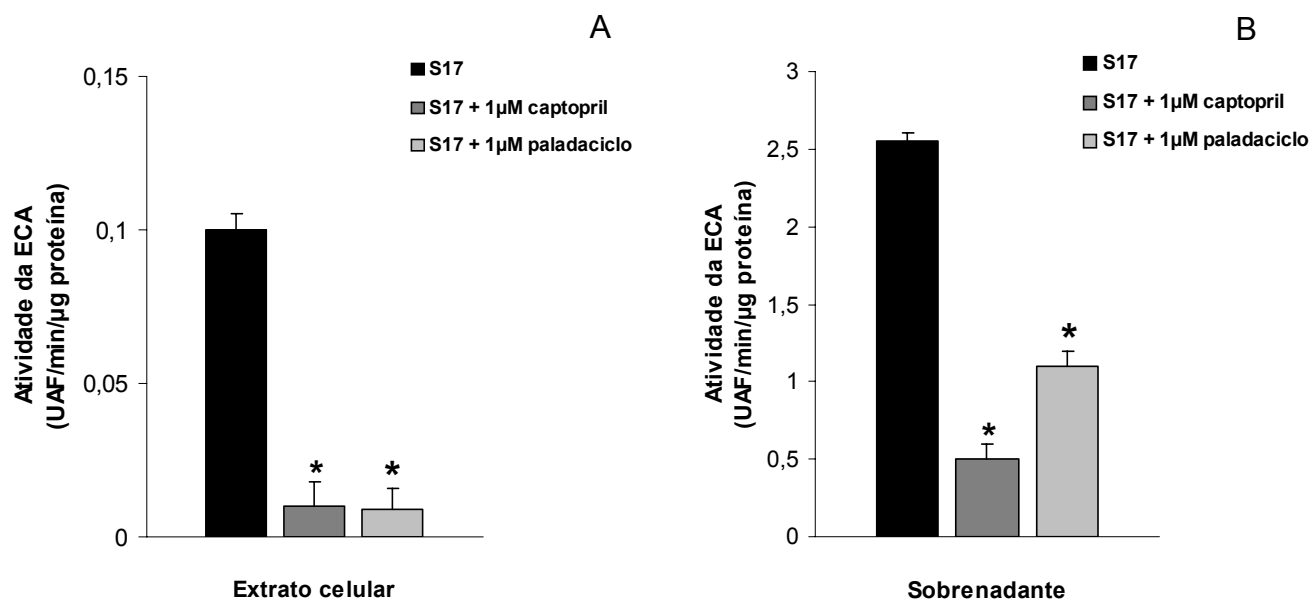


Figura 11: Atividade enzimática da enzima conversora de angiotensina-I em células de estroma hematopoético S-17. A atividade enzimática da ECA nas células S-17 foi determinada espectrofluorimetricamente utilizando o substrato fluorogênico Abz-YRK(Dnp)P-OH. **(A)** Atividade da ECA no extrato celular. **(B)** Atividade da ECA no sobrenadante, *p<0,05.

3.5 Co-cultura de células não aderentes da medula óssea sobre as células S-17

Para avaliar o comportamento inibitório do complexo paladaciclo ferroceno 1:2 sobre a ECA na hematopoese medular, realizamos ensaios de co-cultura, nos quais cultivamos células hematopoéticas não aderentes da medula óssea de animais normais sobre as células S-17 em semi-confluência na presença de 3 concentrações (0,5 μ M; 1,2 μ M e 3,5 μ M). Utilizamos captopril como parâmetro de referência nas mesmas concentrações descritas acima, além do controle positivo com o tetrapeptídeo AcSDKP à 1 nM. As avaliações foram feitas com 3, 7 e 10 dias de cultura.

Nossos resultados demonstraram que o tetrapeptídeo AcSDKP diminui a proliferação de células hematopoéticas em aproximadamente 50%, em relação ao controle sem tratamento, durante o tempo de estudo (3, 7 e 10 dias) (figura 12).

No terceiro dia de co-cultura, verificamos que a concentração de 0,5 μ M do complexo paladaciclo não induziu nenhuma alteração sobre a proliferação de células hematopoéticas, pois os resultados foram similares ao controle. Porém, no sétimo e décimo dias, observamos diminuição na celularidade total de 50 e 35%, respectivamente, em relação ao controle. No entanto, ao estudarmos a concentração de 1,2 μ M, verificamos redução de aproximadamente 50-55% sobre a proliferação de células hematopoéticas, em relação ao grupo não tratado, nos três períodos de avaliação. Em contrapartida, nas culturas onde adicionamos o complexo paladaciclo a 3,5 μ M, verificou-se redução na celularidade total de aproximadamente 80% em relação ao grupo controle nos dias 7 e 10, enquanto que, no 3º dia, a cultura permaneceu estável (figura 12).

Por outro lado, nas culturas onde houve adição de captopril a 0,5 μM , não verificamos oscilações na celularidade total durante o 3º dia de co-cultivo, quando comparados ao controle, corroborando com os dados obtidos com o paladaciclo. Porém, nos dias 7 e 10, observamos diminuição na proliferação de células hematopoéticas de aproximadamente 35-40%. No entanto, nas culturas tratadas com captopril a 1,2 μM , não houve proliferação de células hematopoéticas ao longo de 3 dias e, para os dias 7 e 10, observamos diminuição na celularidade total de aproximadamente 70% em relação ao grupo não tratado. Este padrão de resposta também foi observado nas condições de 3,5 μM (figura 12).

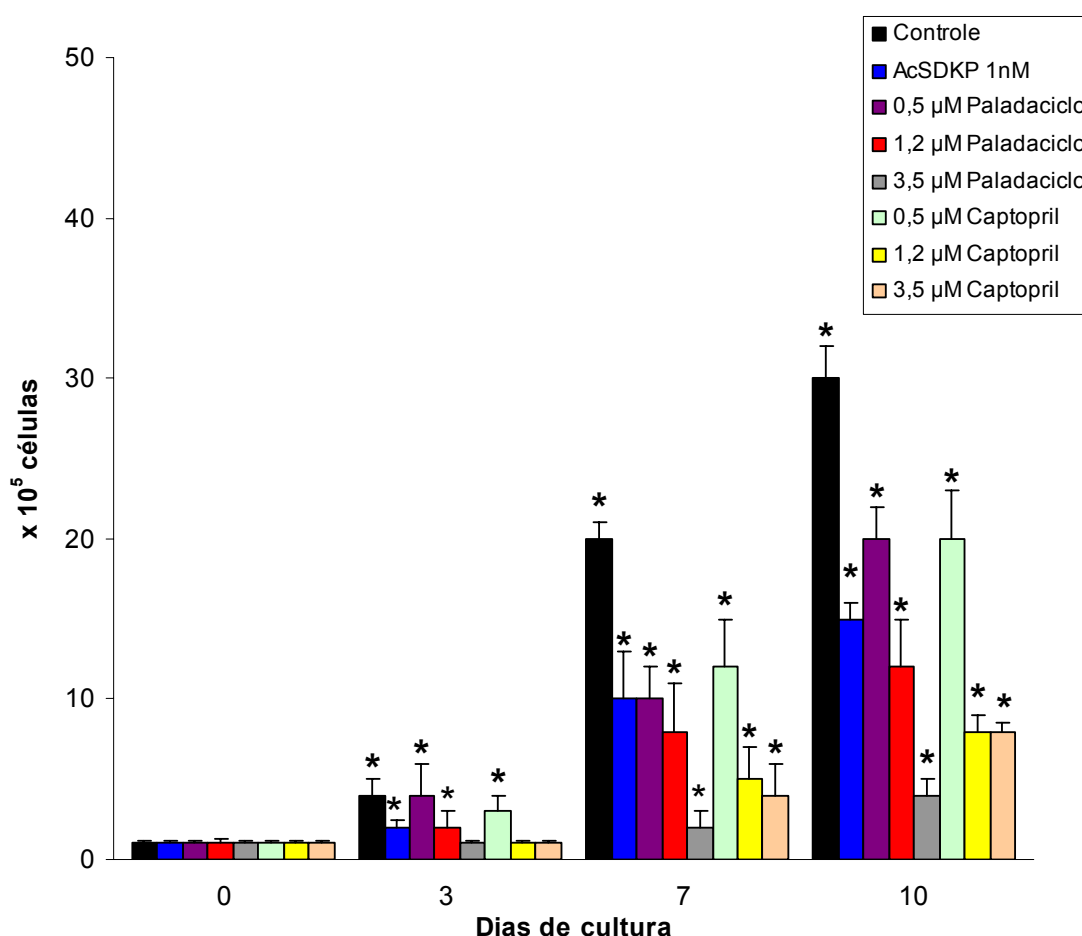


Figura 12: Contagem do número de células hematopoéticas cocultivadas sobre as células S-17, em meio DMEM suplementado com 10% de SFB. As células foram contadas em câmara de Neubauer, no 3º, 7º e 10º de cultura. n=5 e $p < 0,05$ (*) significativo em relação ao controle do tempo zero, ANOVA, Tukey-Kramer.

Nas co-culturas realizadas na presença de captopril e paladaciclo a 1,2 μ M, e às submetidas a AcSDKP, a 1 nM, notamos que grande parte das células hematopoéticas migravam para debaixo da monocamada de células estromais, dando origem às estruturas denominadas *cobblestones*. Esta observação foi feita por microscopia de contraste de fase, com base na capacidade de refringência das células. No início, o padrão das co-culturas foram semelhantes, sendo que até o quarto dia, os focos proliferativos eram pequenos. A proliferação sobre o estroma S-17 só foi observada em grande intensidade a partir do sétimo dia de co-cultivo (figura 13).

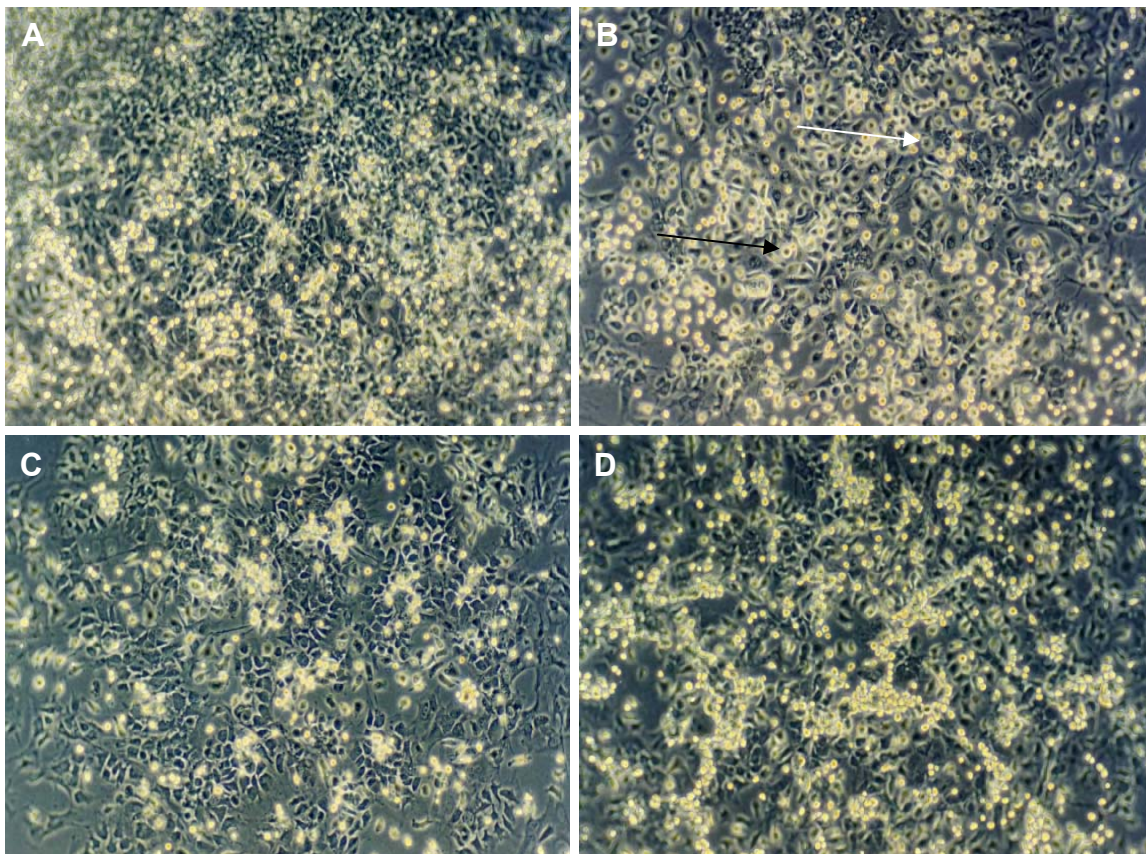


Figura 13: Microscopia de contraste de fase das co-culturas de células hematopoéticas não aderentes de medula óssea sobre as células S-17 no 7º dia de cultivo. **(A)** controle, **(B)** AcSDKP - 1 nM, **(C)** captopril - 1,2 μ M e **(D)** paladaciclo - 1,2 μ M. Seta branca indica célula hematopoética não-refringente (sob o estroma). A seta preta indica célula refringente (sobre o estroma). Aumento de 100x.

3.6 Ensaio clonogênico de precursores hematopoéticos por soft-ágar (CFU-GM)

A partir do ensaio de co-cultura de células de medula óssea sobre as células S-17, foi feito ensaio clonogênico de quantificação de precursores hematopoéticos no sistema de soft-ágar para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) nos dias 3, 7 e 10 de co-cultura, no intuito de avaliar o papel do complexo paladaciclo ferroceno 1:2 sobre as células progenitoras neste modelo de estudo, uma vez que neste curso temporal observamos focos proliferativos e áreas de *cobblestone*.

Foi quantificado o número total de colônias para células recolhidas das co-culturas de 3, 7 e 10 dias nas situações descritas no material e métodos, ou seja, na presença do paladaciclo ferroceno 1:2 e captopril (0,5 μM ; 1,2 μM e 3,5 μM), além de AcSDKP (10^{-9}M).

Nossos resultados demonstraram que nas culturas não submetidas a tratamento, houve um pico máximo do número de CFU-GM (60 colônias) referentes ao sétimo dia de co-cultura, sendo reduzido pela metade no décimo dia, provavelmente devido à falta de auto-renovação das células hematopoéticas mais primitivas após 10 dias de cultura neste modelo experimental. Além disso, resultados interessantes foram observados no número de CFU-GM referentes às culturas tratadas com o paladaciclo ferroceno 1:2 na concentração de 1,2 μM , uma vez que durante os três dias de avaliação (3, 7 e 10), o número de colônias referentes a cada curso temporal foram iguais às culturas submetidas a ação de 1nM do tetrapeptídeo AcSDKP. No entanto, as culturas tratadas com captopril, também a 1,2 μM , tiveram queda gradativa no número de CFU-GM durante o período de análise, corroborando com os trabalhos publicados pelo grupo de John Chisi (1999). Aliado a isto, os mesmos resultados foram encontrados na presença de 3,5 μM . Por outro lado, nas

culturas onde adicionamos 0,5 μ M tanto de paladaciclo ferroceno 1:2 quanto captopril, o número de CFU-GM, durante o período de análise foram bastante similares. Contudo, quando adicionamos 3,5 μ M do paladaciclo ferroceno 1:2 às culturas, não verificamos formação de colônias no 10º dia de estudo (figura 14).

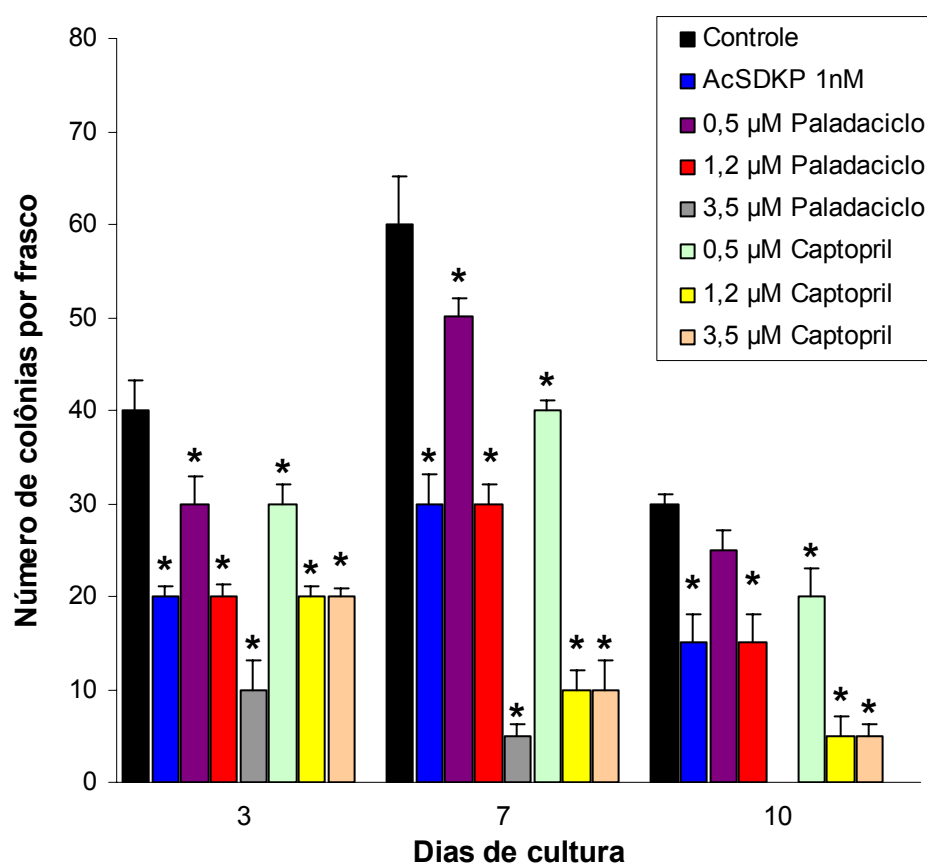


Figura 14: Ensaio clonogênico em meio semi-sólido (CFU-GM) a partir de 3, 7 e 10 dias de co-cultura de células não aderentes de medula óssea sobre as células S-17. Os resultados correspondem a média de 3 experimentos independentes. $p < 0,05$ (*), ANOVA, Tukey-Kramer.

3.7 Cultura de células progenitoras fibroblastóides da medula óssea (CFU-F)

A figura 15 demonstra a contagem global de colônias referentes aos ensaios clonogênicos de progenitores mesenquimais da medula óssea (CFU-F) frente ao complexo paladaciclo ferroceno 1:2 nas concentrações 0,5 μM ; 1,2 μM ; 3,5 μM . Neste ensaio também utilizamos captopril como controle positivo nas mesmas condições descritas anteriormente. Os resultados estão expressos em percentagem em relação ao controle e em relação às concentrações de captopril e paladaciclo. Com relação à análise quantitativa, nossos resultados demonstraram que ambos os compostos apresentam comportamento inibitório sobre a formação das colônias mesenquimais nas concentrações em estudo, no entanto o captopril mostrou-se mais potente, o que nos leva a especular que a ECA possui ação sobre a proliferação de progenitores não-hematopoéticos da medula óssea. Além disso, observamos por microscopia de contraste de fase, focos proliferativos de células hematopoéticas sobre o estroma (seta preta), em culturas tratadas com o paladaciclo ferroceno 1:2 a 1,2 μM no décimo dia de cultura (figura 16D). Estes achados podem estar relacionados ao fato deste composto não ser o inibidor específico para ECA, como captopril, fazendo com que, mesmo que ocorra efeito inibitório indireto deste paladaciclo sobre as células hematopoéticas, o estroma promove um mecanismo alternativo para que as células hematopoéticas continuem a proliferar, provavelmente através de sinais regulatórios via moléculas de adesão, proteoglicanos e fatores de crescimento. Por outro lado, verificamos diminuição na proliferação destas células na presença do composto captopril no dia 10 (figura 16F).

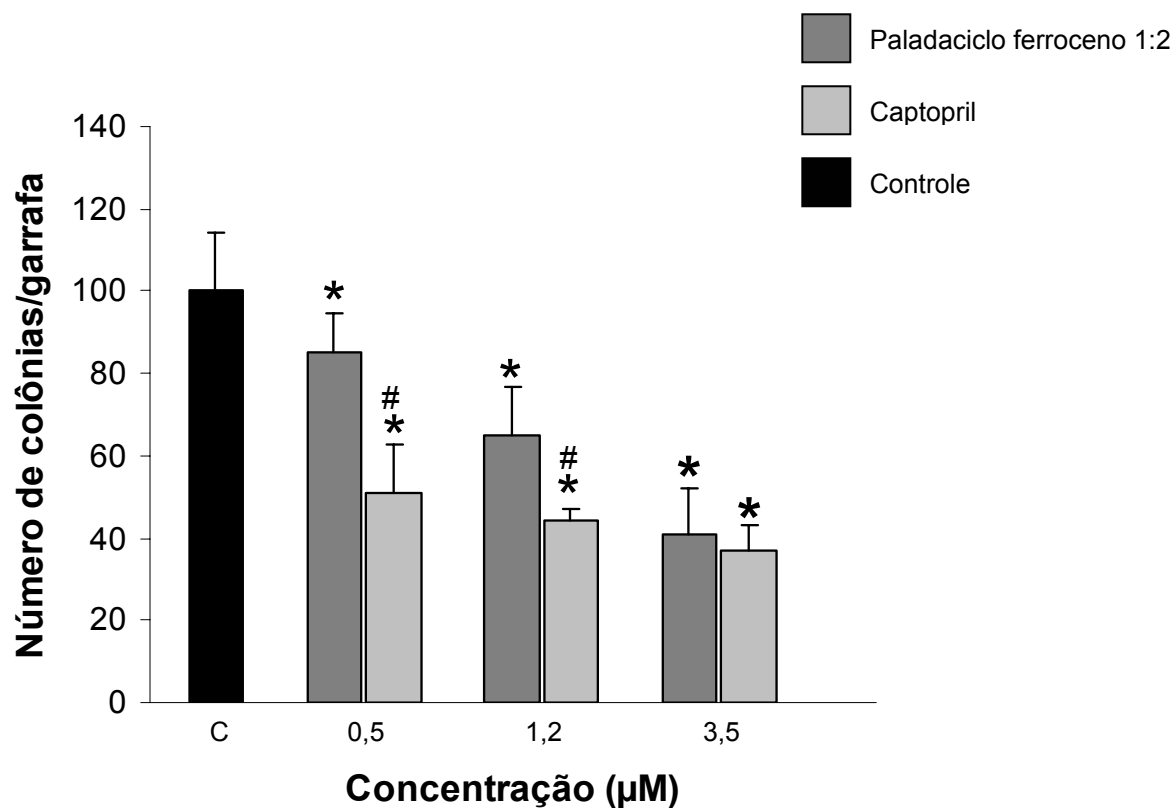


Figura 15: Contagem global das colônias aderentes no 10º dia de cultura na presença dos compostos paladaciclo ferroceno 1:2 e captopril. (*) Diferenças significativas em relação ao controle ($p < 0,005$). (#) Diferenças significativas entre as concentrações de captopril e paladaciclo ferroceno 1:2 ($p < 0,005$), ANOVA, Tukey-Kramer.

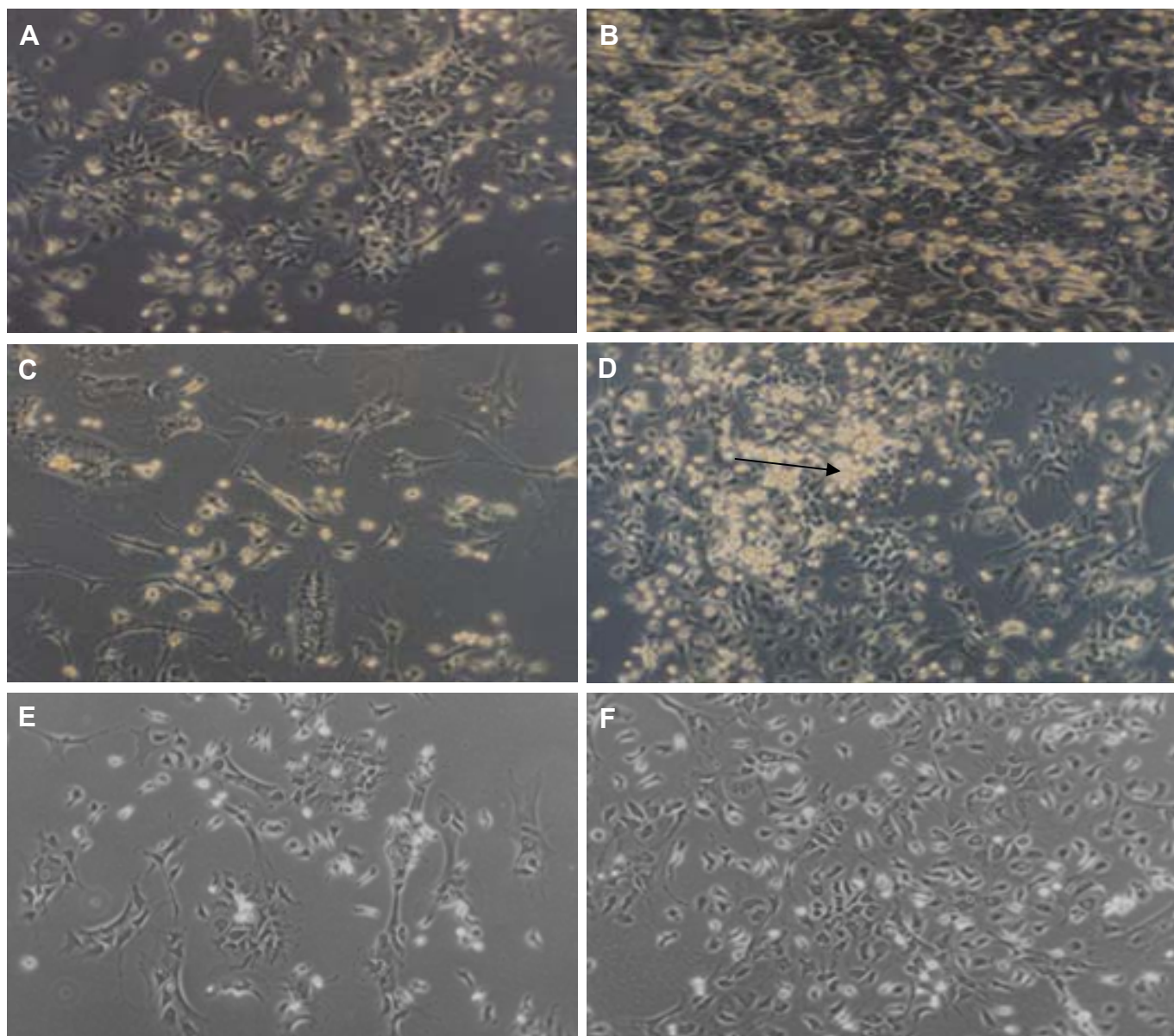


Figura 16: Aspecto morfológico das colônias de células progenitoras fibroblastóides da medula óssea observada ao microscópio invertido de contraste de fase. **(A)** controle (4º dia), **(B)** controle (10º dia), **(C)** paladaciclo (4º dia), **(D)** paladaciclo (10º dia), **(E)** captopril (4º dia) e **(F)** captopril (10º dia) nas concentrações de 1,2 μ M. Aumento de 125X.

3.8 RT-PCR

Utilizando a técnica de RT-PCR, avaliamos a linhagem estabelecida S-17 quanto ao perfil de expressão de RNA mensageiro para enzima conversora de angiotensina-I na presença do complexo paladaciclo ferroceno 1:2 nas concentrações de 0,5 μ M; 1,2 μ M e 3,5 μ M.

Na figura 17A, podemos observar os fragmentos de c-DNA amplificados por PCR quando analisados por eletroforese em gel de agarose. Nossos resultados demonstraram expressão de RNA mensageiro para ECA em todas as amostras, além disso, todos os c-DNAs analisados apresentaram seqüências para expressão de β -actina, o controle positivo para avaliação da síntese do c-DNA.

3.9 Ensaio de adesão

No sistema hematopoético, as interações via moléculas de adesão são importantes reguladoras de vias de transdução de sinais importantes para a sobrevivência, proliferação e diferenciação celular, ou pela modulação da resposta aos fatores de crescimento (VERFAILLIE, 1998). Por isso, avaliamos o estado de adesão de células mononucleares da medula óssea sobre as células S-17 na presença de ambos os compostos a 1,2 μ M e do peptídeo AcSDKP (10^{-9} M). Pela análise da figura 18, verifica-se que não há diferença significativa nas situações em estudo, onde observamos que aproximadamente 65-70% das células permaneceram aderidas ao estroma.

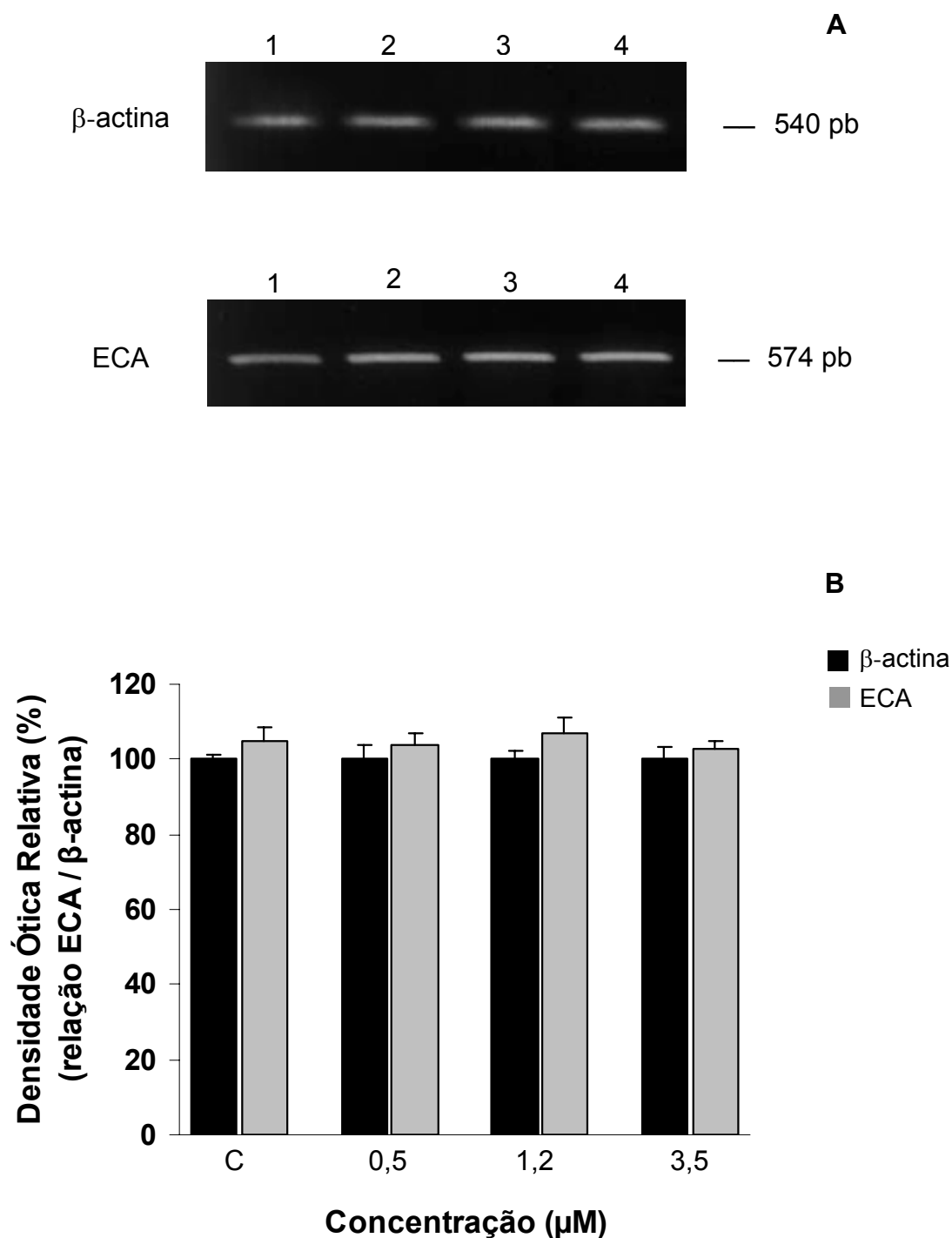


Figura 17: (A) Análise de RT-PCR para expressão da ECA. O RNA foi isolado de culturas tratadas com paladaciclo ferroceno 1:2 e controle. Foram realizados 33 ciclos para β -actina e 40 ciclos para ECA. As amostras foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 1,5% em TBE, coradas com brometo de etídeo e analisadas por transiluminação (UV): **(1)** controle, **(2)** 0,5 μ M, **(3)** 1,2 μ M e **(4)** 3,5 μ M. **(B)** O gráfico demonstra a densidade ótica relativa das bandas, entre a ECA e β -actina e, estão expressos em porcentagem. Os resultados de *relative OD* foram obtidos do *software LABWORKS*.

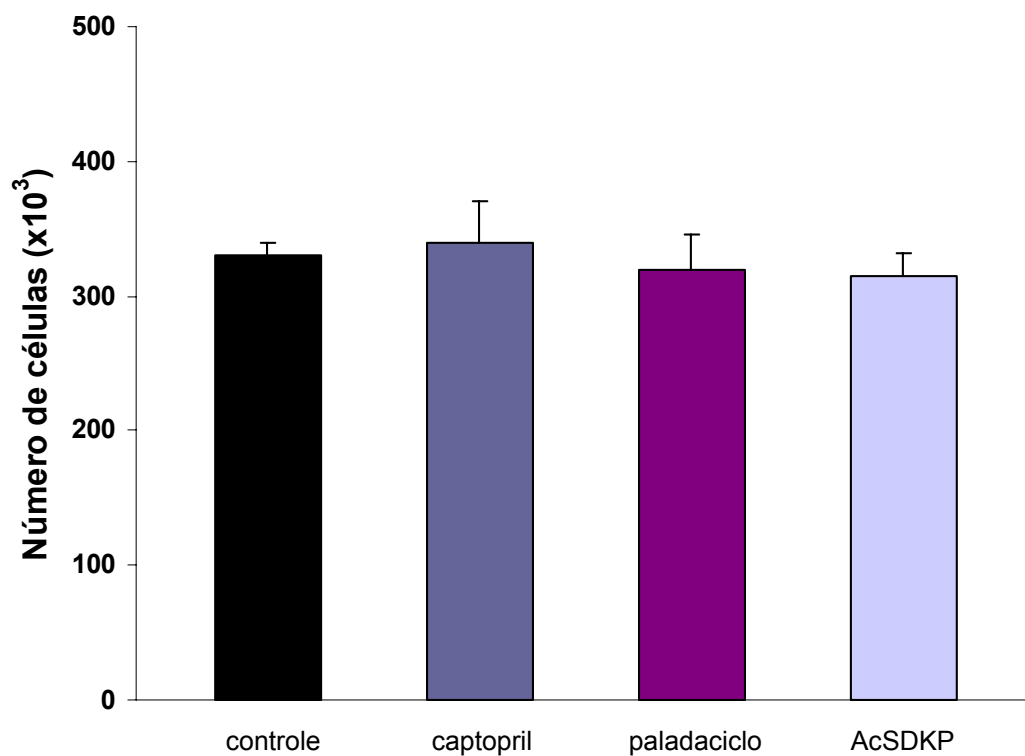


Figura 18: Contagem total do número de células hematopoéticas aderidas ao estroma S-17, em estufa úmida, a 37°C, por 4 horas. As células foram contadas em câmara de Newbauer. Não verificamos diferença significativa.

4 DISCUSSÃO

Na medula óssea, a hematopoese é associada ao estroma medular, o qual é capaz de sustentar a manutenção, proliferação e diferenciação de células hematopoéticas, uma vez que neste microambiente encontram-se mediadores que controlarão o sistema por toda vida (BOROJEVIC *et al.*, 2003). Contudo, evidências sugerem a possível participação do sistema renina-angiotensina neste fenômeno, e conseqüentemente o envolvimento de seus componentes nos eventos de diferenciação celular, dentre eles, a enzima conversora de angiotensina-I (ECA) (STRAWN *et al.*, 2004).

Recentemente, estudos têm demonstrado que as drogas inibidoras da ECA são capazes de proteger o microambiente hematopoético dos efeitos tóxicos da radioterapia, uma vez que, a inibição desta enzima na medula óssea, leva ao aumento da concentração endógena do tetrapeptídeo AcSDKP, um dos reguladores negativos da hematopoese, mantendo as células hematopoéticas mais primitivas em estágio quiescente, impedindo-as de entrarem na fase S do ciclo celular (CHARRIER *et al.*, 2004).

Tendo como base os trabalhos de Van Brummelen *et al.* (1980), Cooper (1983) e Casato *et al.* (1995), que demonstraram alterações na hematopoese medular, como agranulocitose, neutropenia e granulocitopenia, respectivamente, em pacientes submetidos à terapia em longo prazo com drogas inibidoras da ECA, e os trabalhos de Comte *et al.* (1997), que verificaram oscilações na proliferação de células progenitoras CFU-mix, CFU-GM e BFU-E em pacientes tratados com enalapril, além dos trabalhos de Chisi *et al.* (1999, 2000), demonstrando que a inibição da ECA na medula óssea, diminui o número de células progenitoras para granulócitos e macrófagos, e aumenta a recuperação do microambiente medular em animais submetidos a tratamento quimioterápico, nos levaram a estudar o papel desta enzima sobre a

hematopoese medular em associação ao complexo paladaciclo ferroceno 1:2, tendo em vista o seu comportamento inibitório sobre a ECA (BINCOLETTTO *et al.*, 2003; CAIRES *et al.*, 2004).

O primeiro passo do trabalho foi escolher um modelo experimental responsável por fornecer suporte estrutural e molecular ao sistema hematopoético, além de apresentar mensagem para a enzima conversora de angiotensina-I. Por isso, utilizamos a população celular S-17, linhagem derivada de estroma hematopoético medular murino, que conforme descrito nos resultados, até então inéditos, apresentou padrão de expressão para ECA (BARBOSA *et al.*, 2005).

Em seguida, avaliamos os efeitos citotóxicos do complexo paladaciclo ferroceno 1:2 neste estroma através da metodologia do MTT e o teste de exclusão por azul de trypan. Nossos resultados demonstraram uma concentração inibitória de 50% (IC₅₀) de 3,7 μ M e 2,0 μ M, respectivamente. Esta discrepância nos valores obtidos pode estar associada ao princípio dos métodos, que são distintos. No teste de redução do MTT, verifica-se a capacidade da enzima succinato desidrogenase em reduzir o substrato MTT a cristais de formazan na mitocôndria da célula. Por outro lado, o teste de exclusão por azul de trypan, avalia a permeabilidade da membrana plasmática. Portanto, estes resultados sugerem que mesmo a membrana plasmática sendo lisada pelo complexo paladaciclo ferroceno 1:2, algumas organelas citoplasmáticas podem estar cumprindo o seu papel fisiológico, como é o caso da mitocôndria, local das reações de oxi-redução (MOSMANN, 1983).

Como descrito anteriormente, o estroma hematopoético S-17 expressa enzima conversora de angiotensina-I. Pelo método de espectrofluorimetria, obtivemos a primeira resposta quanto ao teor protéico da ECA neste estroma. Após lise das células, avaliamos o sobrenadante e o extrato celular na presença e na ausência de captopril e paladaciclo ferroceno 1:2. Nossos resultados demonstraram que a ECA mostrou-se ativa no sobrenadante do lisado, o que não foi significativo no extrato celular, mesmo na ausência de ambos os

compostos. Estes achados sugerem que esta maior atividade encontrada no sobrenadante pode estar associada ao mecanismo de despreendimento desta enzima da membrana plasmática, fenômeno que ocorre *in vivo*, amplamente conhecido como *shedding*, uma vez que a ECA é uma ectoproteína, e assim sendo, é submetida à ação de secretases responsáveis por sua clivagem e posterior secreção (PARKIN *et al.*, 2003). Além disso, verificamos que o captopril apresentou um potencial inibitório sobre a ECA aproximadamente 2 vezes maior quando comparado ao paladaciclo, o que nos leva a crer, que o contexto de inibição da ECA por este complexo pode ser reversível.

Sabendo-se que o captopril é o inibidor clássico da ECA, e que o complexo paladaciclo ferroceno 1:2 trata-se de um composto recém sintetizado, levanta-se a hipótese destes compostos apresentarem efeitos de inibição distintos quando adicionados em sistemas de cultivo bidimensional. Diante disso, a utilização do sistema de co-cultivo de células não aderentes da medula óssea sobre as células S-17 nos permitiu analisar o comportamento inibitório do complexo paladaciclo ferroceno 1:2 sobre a ECA, e conseqüentemente sobre a regulação da hematopoese *in vitro*, analisando a proliferação das células hematopoéticas totais em diferentes pontos ao longo de 10 dias. E a partir deste modelo, avaliamos o papel destes compostos diretamente sobre a proliferação de células progenitoras através de ensaios clonogênicos em sistema de soft-ágar.

Durante os dez dias de cultivo, observamos que a concentração de 0,5µM de ambas as drogas apresentaram potencial de inibição muito similares, além de apresentar celularidade total relativamente próximas ao controle, com exceção do 7º dia de cultivo. No entanto, a proliferação das colônias de CFU-GM referentes às culturas tratadas com esta concentração nos três cursos temporais (3, 7 e 10), inclusive no sétimo dia, foram próximas ao grupo não-tratado, demonstrando que mesmo havendo uma diminuição significativa das células totais no sétimo dia de cultura, não houve ação direta de ambos os compostos sobre as células mais primitivas, sugerindo que apesar do baixo

número de células totais no dia 7 de cultura, verifica-se um grande número de células em estágio mais primitivo, o que foi comprovado pela alta taxa proliferativa de células progenitoras em meio semi-sólido.

Como descrito nos resultados, no terceiro dia de co-cultura não verificamos proliferação das células hematopoéticas na presença de captopril a 1,2 μ M e 3,5 μ M, mostrando a especificidade deste composto sobre a ECA, favorecendo a manutenção das células em estágio primitivo. Apesar disso, observamos que no sétimo e décimo dia de co-cultivo houve proliferação das células, porém com baixa expansão. Aliado a isto, os ensaios clonogênicos em soft-água provenientes dos ensaios de co-cultivo, demonstraram uma diminuição gradativa no número de colônias no tempo de estudo. Estes achados corroboram com os trabalhos de John Chisi (1999), que observaram diminuição do número de CFU-GM provenientes da cultura de Dexter tratadas com captopril a 1 μ M. Outro ponto importante, é que nas duas concentrações, os efeitos foram similares, sugerindo que a concentração de 1,2 μ M é suficiente para inibir a ECA em sistemas de cultura *in vitro*.

Cabe a discussão de dois pontos importantes: o primeiro diz respeito a pleiotropia do complexo paladaciclo ferroceno 1:2. Nos ensaios de co-cultivo, foi demonstrado que na concentração de 3,5 μ M, não houve proliferação de células hematopoéticas no 3º dia, além disso, ao final do curso temporal, observamos que as células hematopoéticas proliferaram cerca de 4 vezes em relação ao dia zero. Aliado a isto, nos ensaios clonogênicos em soft-água, verificamos baixo número de colônias provenientes das co-culturas no 3º e 7º dia, além de não verificarmos o crescimento de CFU-GM no 10º dia de cultura. Estes resultados sugerem que nesta concentração, este composto deixa de apresentar propriedade inibitória sobre a ECA e conseqüentemente sobre a hematopoese, tornando-se tóxico neste modelo de estudo, provocando interferência nos sinais regulatórios das células estromais para as células hematopoéticas, afetando todo processo de proliferação e diferenciação celular. Levantamos esta hipótese, uma vez que não verificamos este efeito com captopril a 3,5 μ M,

principalmente por este não ter apresentado citotoxicidade sobre o estroma S-17, o que foi confirmado pela metodologia do MTT.

O segundo ponto da discussão, e talvez o mais interessante, refere-se ao complexo paladaciclo ferroceno 1:2 quando administrado a $1,2\mu\text{M}$. Nossos resultados demonstraram o mesmo padrão de resposta na proliferação de progenitores hematopoéticos em soft-ágar nos três tempos de estudo, quando comparado ao tetrapeptídeo AcSDKP a 1nM . Estes achados são de fundamental importância, uma vez que este peptídeo tem sido utilizado em associação com agentes quimioterápicos mielotóxicos (BOGDEN *et al.*, 1991; JUNOT *et al.*, 2001) com o intuito de proteger o microambiente hematopoético dos efeitos tóxicos da quimioterapia. Massé *et al.* (1998) demonstraram aumento de sobrevivência em animais submetidos a tratamento com doxorrubicina em associação a AcSDKP, quando comparados aqueles tratados apenas com o quimioterápico. Além disso, dados na literatura sugerem a utilização deste peptídeo na concentração de 1nM , sendo esta, a concentração ótima envolvendo estudos acerca da proliferação de células hematopoéticas (GAUDRON *et al.* 1999).

Diante destes resultados, mesmo se tratando de um composto recém sintetizado, e inúmeros estudos deverão elucidar melhor este papel inibitório sobre a ECA, principalmente *in vivo*, podemos levantar a hipótese de sua possível aplicação hematoprotetora na concentração de $1,2\mu\text{M}$ em neoplasias medulares, uma vez que alguns autores propõem a utilização de drogas inibidoras da ECA como adjuvantes em tratamento de disfunções envolvendo o microambiente hematopoético (COMTE *et al.* 1997; CHISI *et al.* 1999, 2000; ABALI *et al.*, 2002a, 2002b; CHARRIER *et al.* 2004).

Para avaliar o papel da ECA em sistema de cultura primária, que difere dos ensaios de co-cultura, utilizamos a cultura de células progenitoras fibroblastóides da medula óssea (CFU-F), descrita por Alexander Friedenstein na década de 70. Neste ensaio cultivamos células hematopoéticas totais da medula óssea de animais normais na presença do complexo paladaciclo

ferroceno 1:2 e captopril por 10 dias, e ao final deste curso temporal, realizamos contagem global das colônias. Com relação à análise quantitativa, nossos resultados demonstraram que ambos os compostos apresentam comportamento inibitório sobre a formação de colônias mesenquimais nas concentrações em estudo conforme descrito nos resultados. No entanto, o captopril mostrou-se mais ativo. Podemos supor que esta redução na formação de colônias aderentes, pode estar associada à atividade da ECA, uma vez que foi demonstrado pelo nosso grupo neste modelo de cultura, por espectrofluorimetria, diminuição gradativa de atividade da ECA a medida que a concentração de ambos os compostos aumentava (BARBOSA *et al.*, 2005). Diante disso, podemos sugerir o envolvimento da ECA, também na proliferação de progenitores mesenquimais da medula óssea, células que possuem capacidade de auto-renovação limitante, mas apresentam alto potencial de plasticidade, podendo diferenciar-se em células óssea, cartilaginosa e nervosa (BIANCO *et al.*, 2001).

Por microscopia de contraste de fase, observamos pequenos focos proliferativos de células hematopoéticas sobre as colônias de “estroma primitivo”, em culturas tratadas com o paladacilo ferroceno 1:2 a $1,2\mu\text{M}$ no último dia de cultivo. Estes resultados sugerem que, apesar do efeito inibitório deste paladacilo sobre as células hematopoéticas neste tipo de cultura, o estroma através de sua estreita associação com estas células, permite que elas continuem a proliferar, provavelmente via estímulo justácrino, e principalmente pelo fato desta cultura apresentar células estromais com fenótipos distintos. Por outro lado, nas culturas sob a ação de captopril, verificamos baixa proliferação destas células no décimo dia de cultura.

Mesmo sabendo que as células estromais são fonte de fatores necessários para o controle da hematopoese, é evidente que a produção destes não é constitutiva. Ao contrário, elas expressam receptores e moléculas de adesão, permitindo-as responder aos sinais do microambiente, alterando a concentração e o tipo de fatores de crescimento produzidos (DORSHKIND,

1990). Por isso, avaliamos o estado de adesão de células mononucleares da medula óssea sobre o estroma S-17 na presença de ambos os compostos e do peptídeo AcSDKP. Com este ensaio, observamos que não há diferença significativa entre os grupos sobre a capacidade de adesão sobre o estroma. Estes achados são relevantes, pois o processo de interação célula-célula, via mecanismos de adesão, é primordial para o processo de diferenciação das células hematopoéticas. Portanto, posteriormente, nosso intuito seria avaliar, por citometria de fluxo, a expressão de moléculas de adesão importantes no controle da interação das células estromais S-17 com as células hematopoéticas, como CD44, CD54 e CD62L, com o objetivo de avaliar se há diferença no padrão de expressão destas moléculas na presença deste paladaciclo.

Os ensaios de RT-PCR nos permitiram determinar o padrão de mensagem para a ECA frente ao complexo paladaciclo ferroceno 1:2 nas concentrações descritas no material e métodos. Nossos resultados demonstraram RNA mensageiro para ECA em todas as amostras. Diante disso, esperávamos uma diminuição do padrão de expressão da ECA na presença do composto em estudo, principalmente na concentração de 1,2 μ M. Mas, devemos levar em consideração que a técnica de RT-PCR apesar de precisa e específica, é uma técnica semi-quantitativa, que permite a avaliação qualitativa e indireta da expressão de proteínas.

A partir dos resultados obtidos até o momento, pode-se dizer que a enzima conversora de angiotensina-I participa dos eventos de proliferação das células hematopéticas na medula óssea no modelo experimental proposto neste trabalho, além disso, a concentração de 1,2 μ M do complexo paladaciclo ferroceno 1:2 mostrou-se eficiente no contexto de inibição desta enzima. Contudo são necessários estudos adicionais para caracterizar as populações celulares produzidas neste modelo, e pela técnica de citometria de fluxo, através do uso de marcadores de superfície, poderíamos avaliar de forma precisa o fenótipo das células no curso temporal de 10 dias.

Analisando por outro prisma, no microambiente hematopoético, a sinalização celular acontece segundo um mecanismo de compartimentalização seletiva de fatores de crescimento. Os fatores são produzidos e armazenados localmente, associados ao estroma, permitindo um controle estreito na regulação da hematopoese. Como citado anteriormente, Massé *et al.* (1998) demonstraram que animais tratados com doxorrubicina em associação a AcSDKP e submetidos a aplicação de G-CSF após o tratamento, apresentaram regeneração da medula óssea em tempo menor, sugerindo diante deste contexto, a aplicação não só de reguladores negativos e adjuvantes, mas também de reguladores positivos na prevenção dos efeitos tóxicos da quimioterapia sobre a hematopoese. Diante da complexidade do fenômeno hematopoético, podemos levantar a hipótese de que o papel da ECA na regulação da resposta hematopoética estaria associada com outros fatores do microambiente medular. Diferentes combinações entre os fatores solúveis, moléculas de matriz extracelular e moléculas transmembranares vão decidir o destino destas células.

5 CONCLUSÕES

O presente trabalho sobre os efeitos tóxico-farmacológico e inibitório do complexo paladaciclo ferroceno 1:2 sobre a enzima conversora de angiotensina-I na hematopoese medular, nos permitiu concluir que:

- O estroma composto pela linhagem S-17 apresenta RNA mensageiro para a enzima conversora de angiotensina-I, o componente chave do SRA. Diante disso, pelo fato das células estromais fornecerem suporte estrutural e molecular ao sistema hematopoiético, nossa proposta é sugerir a utilização desta linhagem estabelecida como um novo modelo de estudos *in vitro* envolvendo o SRA na medula óssea;
- Os ensaios clonogênicos em soft-água (CFU-GM) obtidos das culturas tratadas com paladaciclo ferroceno 1:2 a 1,2 μ M e AcSDKP a 1 nM foram iguais durante o período de estudo, o que nos permite especular, a possível aplicação deste composto como adjuvante em disfunções envolvendo o microambiente hematopoético;
- A enzima conversora de angiotensina-I também participa dos eventos de proliferação de progenitores mesenquimais da medula óssea;
- Os ensaios fluorimétricos nos permitem sugerir, que o efeito inibitório do paladaciclo ferroceno 1:2 sobre a ECA pode ser reversível;
- A expressão da ECA em todas as amostras de c-DNA amplificadas, pode estar associada ao *turnover* da proteína;
- Nas co-culturas onde houve adição do paladaciclo ferroceno 1:2 a 3,5 μ M, verificamos baixa proliferação celular ao longo de 10 dias. Logo, neste modelo de estudo, esta concentração mostrou-se tóxica, provocando mudança de comportamento do estroma S-17, não permitindo a modulação da resposta hematopoética.

6 SUGESTÕES

- Foi estabelecido um modelo de estudo *in vitro*, da modulação do microambiente hematopoético pela enzima conversora de angiotensina-I, uma vez que o estroma S-17 expressa constitutivamente a ECA. Logo, propomos que esta regulação esteja sujeita ao controle da própria ECA, como de outros fatores.
- Por isso, seria interessante avaliar os componentes de matriz extracelular e proteoglicanos expressos nos ensaios de co-cultivo na presença do paladaciclo ferroceno 1:2 a 1 μM , e aliado a isto, caracterizar por imunofenotipagem, a expressão de moléculas de adesão, como CD44, CD54 e CD62L, relacionando com o contexto de inibição da ECA neste microambiente.
- Além disso, poderíamos avaliar por citometria de fluxo, a expressão do marcador de células primitivas *c-kit*, em ensaios de co-cultura, na presença do paladaciclo ferroceno 1:2 a 1 μM .
- Seria relevante o desenvolvimento de estudos *in vivo*, onde os animais seriam submetidos a tratamentos com agentes mielotóxicos, como 5-Fluorouracil e Ciclofosfamida, em associação ao paladaciclo ferroceno 1:2 a 1 μM , com intuito de avaliar o possível efeito hematoprotetor deste composto.

7 REFERÊNCIAS

ABALI, H.; HAZNEDAROGLU, I.C.; GOKER, H.; CELIK, I.; OZATLI, D.; KORAY, Z.; CAGLAR, M. Circulating and local bone marrow renin-angiotensin system in leukemic hematopoiesis: preliminary evidences. **Hematology**, v.7, p. 75-82, 2002a.

ABALI, H.; GULLU, I.H.; ENGIN, H.; HAZNEDAROGLU, I.C.; ERMAN, M.; TEKUZMAN, G. Old antihypertensive as novel antineoplastics: angiotensin-I converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor antagonists. **Medical Hypotheses**, v. 59, p. 344-348, 2002b.

AIZAWA, S.; HIRAMOTO, M.; ARAKI, S.; NEGISHI, S.; KIMURA, Y.; HOSHI, H.; KOJIMA, S.; WAKASUGI, K. Stimulatory effects of neopterin on hematopoiesis in vitro are mediated by activation of stromal cell function. **Hematological Oncology**, v. 16, p. 57-67, 1998.

ALONSO, S.; MINTY, A.; BOURLET, Y.; BUCKINGHAM, M. Comparison of three actin coding sequences in the mouse: evolutionary relationships between the actin gene of warm blooded vertebrates. **Journal of Molecular Evolution**, v. 23, p. 11-22, 1986.

ALVES, M.F.; ARAÚJO, M.C.; JULIANO, M.A.; OLIVEIRA, E.M.; KRIEGER, J.E.; CASARINI, D.E.; Juliano, L.; Carmona, A.K. A continuous fluorescent assay for the determination of plasma and tissue angiotensin I-converting enzyme activity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 861-868, 2005.

BALDUÍNO, A.; HURTADO, S.P.; FRAZÃO, P.; TAKIYA, C.M.; ALVES, L.M.; NASCIUTTI, L.E.; EL-CHEIKH, M.C.; BOROJEVIC, R. Bone marrow subendosteal microenvironment harbours functionally distinct haemosupportive stromal cell populations. **Cell and Tissue Research**, v. 319, p. 255-266, 2005.

BARBOSA, C.M.V.; ROCHA, C.O.; NASCIMENTO, F.D.; SMITH, M.C.M.; FAUSTO, D.M.; SOUFEN, M.A.; SENA, E.; ARAÚJO, R.C.; TERSARIOL, I.L.S.; CAIRES, A.C.F.; BINCOLETTTO, C. Biphosphinic palladacycle complex mediates lysosomal membrane permeabilization and cell death in K562 leukemia cells. **European Journal of Pharmacology**, no prelo.

BARBOSA, C.M.V.; ROCHA, C.O.; CARMONA, A.K.; NASCIMENTO, F.D.; TERSARIOL, I.L.S.; BINCOLETTTO, C. Angiotensin-I converting enzyme is expressed by bone marrow stromal cells S-17. In: **XXX Meeting of the Brazilian Society of Immunology**, São Pedro, SP, livro de resumos, 2005.

BARBOSA, C.M.V.; ROCHA, C.O.; CARMONA, A.K.; TERSARIOL, I.L.S.; CAIRES, A.C.F.; BINCOLETTTO, C. Influência do paladacilo ferroceno 1:2 sobre a atividade da enzima conversora de angiotensina-I em cultura primária de medula óssea. In: **Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FESBE**, Águas de Lindóia, SP, livro de resumos, 2005.

BIANCO, P.; RIMINUCCI, M.; GRONTHOS, S.; ROBEY, P.G. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology and potential applications. **Stem Cells**, v. 19, p. 180-192, 2001.

BINCOLETTTO, C.; OLIVEIRA, C.; SMITH, M.; HERMELY, J.; JULIANO, M.; CAIRES, A. Cyclopalladated complex inhibits the ACE activity in vitro and progenitor cells proliferation in murine bone marrow cultures. **Experimental Hematology**, v. 31, p. 201, 2003.

BINCOLETTTO, C.; SMITH, M.C.M.; ROCHA, C.O.; JUSTO, G.Z.; MATSUMOTO, C.K.; ARAÚJO, R.C.; CAIRES, A.C.F. Biphosphinic palladacycle complex derived from N,N-dimethyl-1-phenethylamine and the ligand 1,1 'bis(diphenylphosphine)ferrocene induces apoptosis in HL60 and Jurkat cell lines in the presence of normal bcl-2 expression. **The Hematology Journal**, v. 5, p. 181, 2004.

BINCOLETTTO, C.; TERSARIOL, I.L.S.; OLIVEIRA, C.R.; DREHER, S.; FAUSTO, D.M.; SOUFEN, M.A.; NASCIMENTO, F.D.; CAIRES, A.C.F. Chiral cyclopalladated complexes derived from N,N-dimethyl-1-phenethylamine with bridging bis(diphenylphosphine)ferrocene ligand as inhibitors of the cathepsin B activity and as antitumoral agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v.13, p. 3047-3055, 2005.

BINCOLETTTO, C.; **BARBOSA, C.M.V.**; OLIVEIRA, C.R.; SMITH, M.C.M.; TERSARIOL, I.L.S.; NASCIMENTO, F.D.; ARAÚJO, R.C.; CAIRES, A.C.F. Palladacycle complex induces lethal effects in the positive bcr-abl K562 leukemia cells: relation with lysosomal membrane destabilization, caspases activation and bcl-2/bax expression. In: **XXX Meeting of the Brazilian Society of Immunology**, São Pedro, SP, livro de resumos, 2005.

BOGDEN, A.E.; CARDE, P.; DE PAILLETTE, E.D.; MOREAU, J.P.; TUBIANA, M.; FRINDEL, E. Amelioration of chemotherapy-induced toxicity by cotreatment with AcSDKP, a tetrapeptide inhibitor of hematopoietic stem cell proliferation. **Annals of the New York Academy Sciences**, v. 628, p.126-39, 1991.

BOROJEVIC, R.; EL-CHEIKH, M.C.; ALVAREZ-SILVA, M.; ALMEIDA, K.G.; DUTRA, H.S. Hepatic myelopoiesis associated with inflammation: liver connective tissue cells from a myelopoietic stroma. In: Cells of the Hepatic Sinusoid, 4 D.L. Knook, E. Wisse (eds), The Kupffer Cell Foundation, Leiden: 130-33, 1993.

BOROJEVIC, R.; CARVALHO, M.A.; CORRÊA-JÚNIOR, J.D.; ARCANJO, K.; GOMES, L.; JOAZEIRO, P.P.; BALDUÍNO, A.; WETTREICH, A.; COELHO-SAMPAIO, T. Stroma-mediated granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) control of myelopoiesis: spatial organisation of intercellular interactions. **Cell and Tissue Research**, v. 313, p. 55-62, 2003.

BOSCHERT, M.T.; BECKERT, B.W.; PUCKETT, C.L.; CONCANNON, M.J. Analysis of lipocyte viability after liposuction. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 109, p. 761-765, 2002.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive methods for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CAIRES, A.C.F.; ALMEIDA, E.T.; MAURO, A.E. Síntese e atividade citotóxica de alguns azido-ciclopalladados estabilizados com ligantes bifosfínicos. **Química Nova**, v. 322, p. 29, 1999.

CAIRES, A.C.F.; BINCOLETTTO, C.; TERSARIOL, I.L.S. Brazilian Patent – PI 0204160. *Industrial Property Magazine RPI*, 1666, December, 2002.

CAIRES, A.C.; OLIVEIRA, C.R.; SMITH, M.C.; HEMERLY, J.P.; JULIANO, M.A.; BINCOLETTTO, C. Effects of palladacycle complex on hematopoietic progenitor cells proliferation in vivo and in vitro and its relation with the inhibitory properties of this compound on the angiotensin-I converting enzyme activity. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 26, p. 487-500, 2004.

CASARES, M.T.G.; IGLESIA, S.; PEREIRA, M.; LEMES, A.; CAMPO, C.; MIGUEL, J.D.G.S.; BOSCH, J.M. et al. Renin expression in hematological malignancies and its role in the regulation of hematopoiesis. **Leukemia & Lymphoma**, v. 43, p. 2377-2381, 2002.

CASATO, M.; PUCILLO, L.P.; LEONI, M.; DI LULLO, L.; GABRIELLI, A.; SANSONNO, D. et al. Granulocytopenia after combined therapy with interferon and angiotensin-converting enzyme inhibitors: evidence for a synergistic hematologic toxicity. **The American Journal of Medicine**, v. 99, p.386-391, 1995.

CHARRIER, S.; MICHAUD, A.; BADAOU, S.; GIROUX, S.; EZAN, E.; SAINTENY, F.; CORVOL, P.; VAINCHENKER, W. Inhibition of angiotensin I-converting enzyme induces radioprotection by preserving murine hematopoietic short-term reconstituting cells. **Blood**, v. 104, p. 978-985, 2004.

CHISI, J.E.; WDZIECZAK-BAKALA, J.; THIERRY, J.; BRISCOE, C.V.; RICHES, A.C. Captopril inhibits the proliferation of hematopoietic stem and progenitor cells in murine long-term bone marrow cultures. **Stem Cells**, v. 17, p. 339-344, 1999.

CHISI, J.E.; BRISCOE, C.V.; EZAN, E.; GENET, R.; RICHES, A.C.; WDZIECZAK-BAKALA, J. Captopril inhibits in vitro and in vivo the proliferation of primitive haematopoietic cells induced into cell cycle by cytotoxic drug administration or irradiation but has no effect on myeloid leukaemia cell proliferation. **British Journal of Haematology**, v. 109, p. 563-570, 2000.

COLLINS, L.S.; DORSHKIND, K. A stromal cell line from myeloid long-term bone marrow culture can support myelopoiesis and B lymphopoiesis. **Journal of Immunology**, v. 138, p. 1082-1087, 1987.

COMTE, L.; LORGEOT, V.; VOLKOV, L.; ALLEGRAUD, J.; ALDIGIER, C.; PRALORAN, V. Effects of the angiotensin-converting enzyme inhibitor enalapril on blood haematopoietic progenitors and Acetyl-N-Ser-Asp-Lys-Pro concentrations. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 27, p.788-790, 1997.

COMTE, L.; LORGEOT, V.; BIGNON, J.; VOLKOV, L.; DUPUIS, F.; WDZIECZAK-BAKALA, J.; PRALORAN, V. In vivo modifications of AcSDKP metabolism and haematopoiesis in mice treated with 5-fluorouracil and goralatide. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 28, p. 856-863, 1998.

COOPER, R.A. Captopril associated neutropenia. Who is at risk? **Archives of Internal Medicine**, v. 143, p. 659, 1983.

COULOMBEL, L.; AUFFRAY, I.; GAUGLER, M.; ROSEMBLATT, M. Expression and function of integrins on hematopoietic progenitor cells. **Acta Haematologica**, v. 97, p. 13-21, 1997.

CUMANO, A.; DIETERLEN-LIÈVRE, F.; GODIN, I. Lymphoid potencial, probed before circulation in mouse, is restricted to caudal intraembryonic splanchnopleura. **Cell**, v. 86, p. 907-916, 1996.

CUMANO, A.; FERRAZ, J.C.; KLAINE, M.; DI SANTO, J.P.; GODIN, I. Intraembryonic, but not yolk sac hematopoietic precursors, isolated before circulation, provide long-term multilineage reconstitution. **Immunity**, v. 15, p. 477-485, 2001.

DE GASPARO, M.; CATT, K.J.; INAGAMI, T.; WRIGHT, J.W.; UNGER, T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 52, p. 415-472, 2000, *Review*.

DEXTER, T.M.; ALLEN, T.D.; LAJTHA, L.G. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. **Journal of Cellular Physiology**, v. 91, p. 335-344, 1977.

DIETERLEN-LIÈVRE, F. On the origin of haemopoietic stem cells in the avian embryo: an experimental approach. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, v. 33, p. 607-619, 1975.

DORSHKIND, K. Regulation of hemopoiesis by bone marrow stromal cells and their products. **Annual Review of Immunology**, v. 8, p. 111-137, 1990.

DZIERZAK, E.; MEDVINSKY, A.; DE BRUIJN, M. Qualitative and quantitative aspects of haematopoietic cell development in the mammalian embryo. **Immunology Today**, v. 19, p. 228-236, 1998.

EHLERS, S.; SMITH, K.A. Differentiation of T cell lymphokine gene expression: the in vitro acquisition of T cell memory. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 173, p. 25-36, 1991.

FOGHSGAARD, L.; WISSING, D.; MAUCH, D.; LADEMANN, U.; BASTHOLM, L.; BOES, M.; ELLING, F.; LEIST, M.; JAATTELA, M. Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. **The Journal of Cell Biology**, v. 153, p. 999-1010, 2001.

GAUDRON, S.; GRILLON, C.; THIERRY, J.; RICHES, A.; WIERENGA, P.K.; WDZIECZAK-BAKALA, J. In vitro effect of Acetyl-N-Ser-Asp-Lys-Pro (AcSDKP) analogs resistant to angiotensin I-converting enzyme on hematopoietic stem cell and progenitor cell proliferation. **Stem Cells**, v. 17, p. 100-106, 1999.

GODIN, I.; DIETERLEN-LIÈVRE, F.; CUMANO, A. Emergence of multipotent hemopoietic cells in the yolk sac and paraaortic splanchnopleura in mouse embryos, beginning at 8.5 days postcoitus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, p. 773-777, 1995.

GODIN, I.; CUMANO, A. The rare and the tortoise: an embryonic haematopoietic race. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, p. 593-604, 2002.

GUPTA, P.; OEGEMA, T.R.; BRAZIL, J.J.; DUDEK, A.Z.; SLUNGAARD, A.; VERFAILLIE, C.M. Structurally specific heparin sulfates support primitive human hematopoiesis by formation of a multimolecular stem cell niche. **Blood**, v. 92, p. 4641-4651, 1998.

GOKER, H.; HAZNEDAROGLU, I.C.; BEYAZIT, Y.; AKSU, S.; TUNCER, S.; MISIRLIOGLU, M.; BAYRAMOGLU, F.; KEKILLI, M. et al. Local umbilical cord blood renin-angiotensin system. **Annals of Hematology**, v. 84, p. 277-281, 2005.

GORDON, M.A. Physiology and function of the haematopoietic microenvironment. **British Journal of Haematology**, v. 86, p. 241-43, 1994.

GUEST, I.; UETRECHT, J. Drugs toxic to the bone marrow that target the stromal cells. **Immunopharmacology**, v. 46, p. 103-112, 2000, *Review*.

GRILLON, C.; RIEGER, K.; WDZIECZAK-BAKALA, J.; SCHOTT, D.; MORGAT, J.L.; HANNAPPEL, E.; VOELTER, W.; LENFANT, M. Involvement of thymosin β 4 and endoprotease Asp-N in the biosynthesis of the tetrapeptide Acetyl-N-Ser-Asp-Lys-Pro a regulator of the hematopoietic system. **FEBS Letters**, v. 274, p. 30-34, 1990.

HASTHORPE, S.; BOGDANOVSKI, M.; ROGERSON, J.; RADLEY, J.M. Characterization of endothelial cells in murine long-term marrow culture. Implication for hemopoietic regulation. **Experimental Hematology**, v. 20, p. 476-481, 1992.

HAZNEDAROGLU, I.C.; TUNCER, S.; GÜRSOY, M. A local renin-angiotensin system in the bone marrow. **Medical Hypotheses**, v. 46, p. 507-510, 1996.

HAZNEDAROGLU, I.C.; ARICI, M.; BUYUKASIK, Y. A unifying hypothesis for the rennin-angiotensin system and hematopoiesis: sticking the pieces together with the JAK-STAT pathway. **Medical Hypotheses**, v. 54, p. 80-83, 2000.

HAZNEDAROGLU, I.C.; OZTURK, M.A. Towards the understanding of the local hematopoietic bone marrow rennin-angiotensin system. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 35, p. 867-880, 2003, *Review*.

HIDALGO, A.; SANZ-RODRIGUEZ, F.; RODRIGUEZ-FERNANDEZ, J.L.; ALBELLA, B.; BLAYA, C.; WRIGHT, N.; CABANAS, C.; PROSPER, F.; GUTIERREZ-RAMOS, J.C.; TEIXIDO, J. Chemokine stromal cell-derived factor-1 α modulates VLA-4 integrin-dependent adhesion to fibronectin and VCAM-1 on bone marrow hematopoietic progenitor cells. **Experimental Hematology**, v. 29, p. 345-355, 2001.

JUNOT, C.; THEODORO, F.; THIERRY, J.; CLEMENT, G.; WDZIECZAK-BAKALA, J.; EZAN, E. Development of an enzyme immunoassay for a stable amidated analog of the hemoregulatory peptide acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro. **Journal of Immunoassay & Immunochemistry**, v. 22, p. 15-31, 2001.

KIKUTA, T.; SHIMAZAKI, C.; ASHIHARA, E.; SUDO, Y.; HIRAI, H.; SUMIKUMA, T.; YAMAGATA, N.; INABA, T.; FUJITA, N.; KINA, T.; NAKAGAWA, M. Mobilization of hematopoietic primitive and committed progenitor cells into blood in mice by anti-vascular adhesion molecule-1 antibody alone or in combination with granulocyte colony-stimulating factor. **Experimental Hematology**, v. 28, p.11-17, 2000.

LAMBERTSEN, R.H; WEISS, L. A model of intramedullary hematopoietic microenvironments based on stereologic study of the distribution of endocloned marrow colonies. **Blood**, v. 63, p. 287-297, 1984.

LENFANT, M.; WDZIECZAK-BAKALA, J.; GUITTET, E.; PROMÉ, J.C.; SOTTY, D.; FRINDEL, E. Inhibitor of hematopoietic pluripotent stem cell proliferation: purification and determination of its structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, p. 779-782, 1989.

LI, J.; VOLKOV, L.; COMTE, L.; HERVÉ, P.; PRALORAN, V.; CHARBORD, P. Production and consumption of the tetrapeptide AcSDKP, a negative regulator of hematopoietic stem cells, by hematopoietic microenvironmental cells. **Experimental Hematology**, v. 25, p. 140-146, 1997.

LIU, J.M.; LAWRENCE, F.; KOVACEVIC, M.; BIGNON, J.; PAPADIMITRIOU, E.; LALLEMAND, J.Y. et al. The tetrapeptide AcSDKP, an inhibitor of primitive hematopoietic cell proliferation, induces angiogenesis in vitro and in vivo. **Blood**, v. 101, p. 3014-3020, 2003.

MARUSIC-VRSALOVIC, M.; DOMINIS, M.; JAKSIC, B.; KUSEC, R. Angiotensin I-converting enzyme is expressed by erythropoietic cells of normal and myeloproliferative bone marrow. **British Journal of Haematology**, v. 123, p. 539-541, 2003.

MASSÉ, A.; RAMIREZ, L.H. ; BINDOULA, G.; GRILLON, C.; WDZIECZAK-BAKALA, J.; RADDASSI, K. et al. The tetrapeptide Acetyl-N-Ser-Asp-Lys-Pro (Goralatide) protects from doxorubicin-induced toxicity: Improvement in mice survival and protection of bone marrow stem cells and progenitors. **Blood**, v. 91, p. 441-449, 1998.

MCCARTHY, D.M. Fibrosis of the bone marrow: content and causes. **British Journal of Haematology**, v. 59, p. 1-7, 1985.

MENSSEN, H.D.; RENKL, H.J.; RODECK, U.; MAURER, J.; NOTTER, M.; SCHWARTZ, S.; REINHARDT, R.; THIEL, E. Presence of Wilms tumor gene (WT1) transcripts and the WT1 nuclear protein in the majority of human acute leukemias. **Leukemia**, v. 9, p. 1060-1067, 1995.

METCALF, D. The bioassay of colony stimulating factors. In: The hemopoietic colony stimulating factors. Elsevier Amsterdam, 187-212, 1984.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for celular growth and survival: application to proliferation and citotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MRUG, M.; STOPKA, T.; JULIAN, B.A.; PRCHAL, J.F. Angiotensin II stimulates proliferation of normal early erythroid progenitors. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 100, p. 2310-2314, 1997.

NILSSON, S.K.; JOHNSTON, H.M.; COVERDALE, J.A. Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. **Blood**, v. 97, p. 2293-2299, 2001.

OGAWA, M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. **Blood**, v. 81, p. 2844-2853, 1993.

PALIS, J.; YODER, M.C. Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man. **Experimental Hematology**, v. 29, p. 927-936, 2001, *Review*.

PARKIN, E.T.; TAN, F.; SKIDGEL, R.A.; TURNER, A.J.; HOOPER, N.M. The ectodomain shedding of angiotensin-converting enzyme is independent of its localisation in lipid rafts. **Journal of Cell Science**, v. 116, p. 3079-3087, 2003.

ROCHA, C.O.; **BARBOSA, C.M.V.**; CARMONA, A.K.; ARAÚJO, R.C.; TERSARIOL, I.L.S.; BINCOLETTI, C. Angiotensin-I converting enzyme activity in murine long-term bone marrow cultures. In: **XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBQ**, Águas de Lindóia, SP, livro de resumos, 2005.

RODGERS, K.E.; XIONG, S.; STEER, R.; DIZEREGA, G.S. Effect of Angiotensin II on hematopoietic progenitor cell proliferation. **Stem Cells**, v. 18, p. 287-294, 2000.

RODRIGUES, E.G.; SILVA, L.S.; FAUSTO, D.M.; HAYASHI, M.S.; DREHER, S.; SANTOS, E.L.; PESQUERO, J.B.; TRAVASSOS, L.R.; CAIRES, A.C.F. Ciclopalladated compounds as chemotherapeutic agents: antitumor activity against a murine melanoma cell line. **International Journal of Cancer**, v. 107, p. 498-504, 2003.

ROLINK, A.G.; SCHANIEL, C.; ANDERSSON, J.; MELCHERS, F. Selection events operating at various stages in B cell development. **Current Opinion in Immunology**, v. 13, p. 202-207, 2001.

ROUSSEAU, A.; MICHAUD, A.; CHAUVET, M.T.; LENFANT, M.; CORVOL, P. The hemoregulatory peptide N-acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro is a natural and specific substrate of the N-terminal active site of human angiotensin-I converting enzyme. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 3656-3661, 1995.

ROUSSEAU, A.; LENFANT, M.; POTIER, P. Catabolism of the hemoregulatory peptide N-acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro: a new insight into the physiological role of the angiotensin-I converting enzyme N-active site. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 4, p. 1113-1119, 1996.

SCHROEDER, T.; KOHLOHOF, H.; RIEBER, N.; JUST, U. Notch signaling induces multilineage myeloid differentiation and up-regulates PU.1 expression. **Journal of Immunology**, v. 170, p. 5538-5548, 2003.

SPOONCER, E.; DEXTER, M.; ALLEN, T. Long-term mouse myeloid bone marrow cultures. In: Freshney, R.I., Pragnell, I.B., Freshney, M.G., editors. Culture of hematopoietic cells. New York. Wiley-Liss, 163-179, 1994.

STRAWN, W.B.; RICHMOND, R.S.; ANN TALLANT, E.; GALLAGHER, P.E.; FERRARIO, C.M. Renin-angiotensin system expression in rat bone marrow haematopoietic and stromal cells. **British Journal of Haematology**, v. 126, p. 120-126, 2004.

TAICHMAN, R.S.; REILLY, M.J.; MATTHEWS, L.S. Human osteoblast-like cells and osteosarcoma cell lines synthesize macrophage inhibitory protein 1alpha in response to interleukin 1beta and tumour necrosis factor alpha stimulation in vitro. **British Journal of Haematology**, v. 108, p. 275-283, 2000.

TURPEN, J.B.; KNUDSON, C.M.; HOEFEN, P.S. The early ontogeny of hematopoietic cells studied by grafting cytogenetically labeled tissue anlagen: localization of a prospective stem cell compartment. **Developmental Biology**, v. 85, p. 99-112, 1981.

VAN BRUMMELEN, P.; WILLEMZE, R.; TAN, W.D.; THOMPSON, J. Captopril associated agranulocytosis. **Lancet**, v. 1, p. 150, 1980.

VAN DEN HEUVEL, R.L.; LEPPENS, H.; SCHOETERS, G.E.R. Use of in vitro assays to assess hematotoxic effects of environmental compounds. **Cell Biology and Toxicology**, v. 17, p. 107-116, 2001.

VERFAILLIE, C.M. Adhesion receptors as regulators of the hematopoietic process. **Blood**, v. 92, p. 2609-2612, 1998.

WHETTON, A.D.; SPOONCER, E. Role of cytokines and extracellular matrix in the regulation of haemopoietic stem cells. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 10, p. 721-726, 1998.

WILKINS, B.S. Histology of normal haemopoiesis: bone marrow histology. **Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 645-649, 1992.

WULF, G.C.; STREUBEL, G.J.; NOBILING, R.; STRUTZ, F.; HEMMERLEIN, B.; HIDDERMANN, W.; WÖRMANN, B. Renin in acute myeloid leukaemia blasts. **British Journal of Haematology**, v. 100, p. 335-337, 1998.

ANEXO I

Representação da celularidade sob forma de tabelas

Tabela 2: Número de células hematopoéticas totais cultivadas sobre as células S-17 em placas de 6 poços ao longo de 3 dias. *p>0,05

	Número de células hematopoéticas (x 10 ⁵)					Média	Desv/padrão
	Poço 1	Poço 2	Poço 3	Poço 4	Poço 5		
Controle	4,0	3,0	3,5	5,0	4,5	4,0	0,790
AcSDKP	2,3	1,7	2,0	1,8	2,2	2,0	0,254
Paladaciclo 0,5 µM	4,5	3,5	4,0	5,0	3,0	4,0	0,790
Paladaciclo 1,2 µM	1,5	2,0	2,0	2,0	2,5	2,0	0,353
Paladaciclo 3,5 µM*	1,0	0,8	1,2	1,1	0,9	1,0	0,158
Captopril 0,5 µM	3,0	3,1	2,7	3,0	3,2	3,0	0,187
Captopril 1,2 µM*	1,2	1,0	0,9	0,9	1,0	1,0	0,122
Captopril 3,5 µM*	1,0	1,0	0,9	1,3	0,8	1,0	0,187

Tabela 3: Número de células hematopoéticas totais cultivadas sobre as células S-17 em placas de 6 poços ao longo de 7 dias.

	Número de células hematopoéticas (x 10 ⁵)					Média	Desv/padrão
	Poço 1	Poço 2	Poço 3	Poço 4	Poço 5		
Controle	20,0	21,0	19,0	17,0	23,0	20,0	2,236
AcSDKP	9,2	10,0	10,3	10,8	9,7	10,0	0,604
Paladaciclo 0,5 µM	11,0	9,5	10,0	9,5	10,0	10,0	0,612
Paladaciclo 1,2 µM	8,0	7,5	8,5	8,0	8,0	8,0	0,353
Paladaciclo 3,5 µM	2,1	1,9	2,0	1,7	2,3	2,0	0,223
Captopril 0,5 µM	13,0	12,0	11,5	11,5	12,0	12,0	0,612
Captopril 1,2 µM	5,2	5,0	5,0	5,0	4,8	5,0	0,141
Captopril 3,5 µM	3,8	4,0	4,1	4,1	4,0	4,0	0,122

Tabela 4: Número de células hematopoéticas totais cultivadas sobre as células S-17 em placas de 6 poços ao longo de 10 dias.

	Número de células hematopoéticas (x 10 ⁵)					Média	Desv/padrão
	Poço 1	Poço 2	Poço 3	Poço 4	Poço 5		
Controle	28,0	29,0	30,0	31,0	32,0	30,0	1,581
AcSDKP	14,0	14,0	15,0	17,0	15,0	15,0	1,224
Paladaciclo 0,5 µM	18,0	20,0	21,0	19,0	22,0	20,0	1,581
Paladaciclo 1,2 µM	11,5	11,0	13,0	12,5	12,0	12,0	0,790
Paladaciclo 3,5 µM	4,0	4,4	3,8	4,2	3,6	4,0	0,316
Captopril 0,5 µM	20,0	19,0	22,0	18,0	21,0	20,0	1,581
Captopril 1,2 µM	7,9	8,0	8,0	8,2	7,9	8,0	0,122
Captopril 3,5 µM	8,0	8,3	7,7	8,0	8,0	8,0	0,212

Tabela 5: Número de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) obtidas do 3º dia de co-culturas de células não aderentes de medula óssea sobre as células S-17.

	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	%	Desv/padrão
Controle	37	43	40	40	100,0	3,00
AcSDKP	18	25	17	20	50,0	4,35
Paladaciclo 0,5 µM	34	28	28	30	75,0	3,46
Paladaciclo 1,2 µM	18	19	23	20	50,0	2,64
Paladaciclo 3,5 µM	8	12	10	10	25,0	2,00
Captopril 0,5 µM	30	32	28	30	75,0	2,00
Captopril 1,2 µM	15	23	22	20	50,0	4,35
Captopril 3,5 µM	17	19	24	20	50,0	3,60

Tabela 6: Número de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) obtidas do 7º dia de co-culturas de células não aderentes de medula óssea sobre as células S-17.

	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	%	Desv/padrão
Controle	58	65	57	60	100,0	4,350
AcSDKP	29	28	33	30	50,0	2,640
Paladaciclo 0,5 µM	48	53	49	50	83,3	2,630
Paladaciclo 1,2 µM	32	27	31	30	50,0	2,640
Paladaciclo 3,5 µM	6	4	5	5	08,3	1,000
Captopril 0,5 µM	39	43	38	40	66,7	2,640
Captopril 1,2 µM	8	13	9	10	16,7	2,640
Captopril 3,5 µM	10	11	9	10	16,7	1,000

Tabela 7: Número de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) obtidas do 10º dia de co-culturas de células não aderentes de medula óssea sobre as células S-17. *p>0,05

	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	%	Desv/padrão
Controle	28	37	25	30	100,0	6,240
AcSDKP	18	14	13	15	50,0	2,640
Paladaciclo 0,5 µM*	22	25	28	25	83,3	3,000
Paladaciclo 1,2 µM	13	15	17	15	50,0	2,000
Paladaciclo 3,5 µM	0	0	0	0	0	-
Captopril 0,5 µM	19	23	18	20	66,7	2,640
Captopril 1,2 µM	5	7	3	5	16,7	2,000
Captopril 3,5 µM	5	4	6	5	16,7	1,000

Tabela 8: Número de colônias mesenquimais (CFU-F) obtidas ao final de 10 dias de cultivo.

	Frasco 1	Frasco 2	Frasco 3	Média	%	Desv/padrão
Controle	226	200	182	206	100,0	17,776
Paladaciclo 0,5 μ M	174	190	167	177	85,0	11,790
Paladaciclo 1,2 μ M	122	146	134	134	65,0	12,000
Paladaciclo 3,5 μ M	72	94	86	84	41,0	11,136
Captopril 0,5 μ M	118	95	102	105	51,0	11,790
Captopril 1,2 μ M	87	93	90	90	44,0	3,000
Captopril 3,5 μ M	70	82	78	77	37,0	6,110

ANEXO II

Termo de Aprovação do Comitê de Ética

**COMISSÃO DE ÉTICA EM MANIPULAÇÃO E EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
CEMEA/UMC**

Ao Mestrando
CHRISTIANO MARCELLO VAZ BARBOSA

PARECER

O trabalho intitulado: "ESTUDO IN VITRO DO EFEITO INIBITÓRIO DO COMPLEXO PALADACICLO FERROCENO 1:2 SOBRE A ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA-I NA HEMATOPOESE MEDULAR" de autoria do mestrando CHRISTIANO MARCELLO VAZ BARBOSA, sob orientação do Profa. Dra. CLÁUDIA BINCHOLETTO TRINDADE, foi considerado APROVADO por esta comissão. Consideramos a seleção, alojamento, manipulação e número de sujeitos experimentais adequados aos princípios bioéticos da utilização de animais em experimentação.

Sem mais no momento, despedimo-nos.

Mogi das Cruzes, 10 de março de 2006.



MAURÍCIO MARQUES DE OLIVEIRA
PRESIDENTE DA CEMEA/UMC