



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

Thalles Ramos Almeida

**EFEITOS DO TRANSPLANTE DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE
MEDULA ÓSSEA NA HIPERTENSÃO ESPONTÂNEA EM RATOS**

Uberaba/MG

2012

Thalles Ramos Almeida

**EFEITOS DO TRANSPLANTE DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE
MEDULA ÓSSEA NA HIPERTENSÃO ESPONTÂNEA EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas. Área de Concentração I: Bioquímica, Fisiologia e Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva

Uberaba/MG

2012

THALLES RAMOS ALMEIDA

**EFEITOS DO TRANSPLANTE DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA
ÓSSEA NA HIPERTENSÃO ESPONTÂNEA EM RATOS**

Esta dissertação foi submetida ao processo de avaliação da Banca Examinadora para a obtenção do Título de:

MESTRE EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

e aprovada na sua versão final em 01 de agosto de 2012, atendendo às normas da legislação vigente da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Curso de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Área de Concentração I: Bioquímica, Fisiologia e Farmacologia.

Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva
Coordenador do CPGCF/UFTM

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva
Coordenador do CPGCF/UFTM

Prof.^a Dr.^a Luciola da Silva Barcelos
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. Alexandre de Paula Rogério
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Dedico este trabalho ao meu Deus, à minha mãe, ao meu pai, ao meu irmão, à minha namorada e aos poucos e verdadeiros amigos conquistados ao longo de todos os anos de minha vida. Sem vocês, indubitavelmente, eu não vivenciaria esta conquista ímpar.

AGRADECIMENTOS

Agradecer a quem nos auxiliou e acreditou nessa vitória torna-se uma ação dúbia. É extremamente fácil, já que se fala de pessoas bastante especiais que, além de contribuírem direta ou indiretamente para que o trabalho pudesse ser realizado, incentivaram-me e fizeram com que a minha confiança não fosse abalada por qualquer empecilho ocorrido ao longo desta pós-graduação. Porém, torna-se extremamente difícil, visto ser a gratidão um sentimento bastante imprescindível para ser expresso em poucas linhas e, infelizmente por isso, não ser dirigido diretamente a tantas outras pessoas, não menos importantes. Tentarei, aqui, ser justo e espero que todos se sintam lembrados. “A gratidão é o único tesouro dos humildes.” *William Shakespeare*.

Obrigado, primeiramente, à Santíssima Trindade, que por inúmeras vezes mostrou-me que nem sempre o que a gente traça a nós mesmos é o que nos foi destinado. Eternamente grato serei pela saúde, pela força, pela felicidade, pela proteção, pela alegria, pelo aprendizado diário, pelas amizades e por tudo que Tens me dado, inclusive pelos momentos ruins, nos quais sempre tento extrair ensinamentos a serem levados comigo.

Um agradecimento especial deve ser direcionado à minha mãe, Elenice, ao meu pai, Sieber, e ao meu irmão, Thúllio, pelo amor incondicional, pela estrutura familiar que me orientará até o fim da vida, pelo sacrifício financeiro e emocional, pelos incontáveis momentos difíceis, entretanto superados. A distância é dolorosa, porém a vontade de vencer a sobrepõe. Obrigado por tudo e lembrem-se: “A distância faz ao amor aquilo que o vento faz ao fogo: apaga o pequeno, inflama o grande.” *Roger Bussy-Rabutin*.

Agradeço à Maria Regina por ter vivido comigo, ao longo de alguns, no entanto, intensos anos de namoro, sentimentos inexplicáveis, como amor, cumplicidade, felicidade, dentre outros, e pelos sonhos e projetos desenhados em nossas mentes, os quais nunca deverão ser perdidos ou removidos, visto serem alguns dos principais combustíveis de nossas vidas. Espero poder contar com o seu amor e companheirismo eternamente. Não poderia deixar de me lembrar de sua família, a qual se tornou a minha segunda.

É impossível deixar de fazer um agradecimento a uma pessoa que, além de professor, orientador e “chefe”, é um grande amigo e conselheiro. Sem as suas orientações profissionais e pessoais e os seus ensinamentos diários, Valdo, ter realizado o nosso trabalho

de conclusão de curso de graduação em Biomedicina e ter me tornado, hoje, Mestre em Ciências Fisiológicas, seriam sonhos inatingíveis. Muito obrigado.

Obrigado também à Universidade Federal do Triângulo Mineiro, representada pelo seu corpo docente, corpo discente, técnicos administrativos e outros funcionários. Adquirir conhecimento e ensinamentos, os quais serão minha maior herança, o diploma profissional de biomédico e a titulação de mestrado por esta universidade de extrema qualidade é uma satisfação indecifrável da minha parte. Obrigado a todos que têm feito com que o nome UFTM seja elevado a níveis condizentes com a sua realidade.

Faço um agradecimento cordial aos amigos da XIV turma do curso de Biomedicina, com os quais pude desfrutar momentos relevantes e inenarráveis durante quatro anos de graduação e aos inigualáveis colegas e amigos da disciplina de Fisiologia da UFTM, nos quais se incluem os professores, funcionários e alunos. Desde o início dos meus trabalhos em nosso laboratório, pude perceber que, sem o auxílio, em maior ou menor grau, de cada um de vocês, a caminhada seria muito árdua e provavelmente com insucessos. Orgulho-me de fazer parte dessa família e desejo que essa união perdure por longos anos, independentemente de quem possa vir a acrescentar-nos. Sucesso profissional a todos é o que eu espero.

Agradeço também a CAPES/REUNI pelo auxílio financeiro neste projeto de pesquisa.

Enfim, exponho a minha gratidão aos outros poucos e verdadeiros amigos e aos meus familiares, que foram essenciais em minha formação acadêmica e pessoal e que, apesar das distâncias e compromissos diversos, sei que estavam fortalecendo-me com vibrações positivas, através dos pensamentos e telefonemas.

A todos, a minha eterna gratidão.

“Nas nossas vidas diárias, devemos ver que não é a felicidade que nos faz agradecidos, mas a gratidão é que nos faz felizes.” *Albert Clarke*.

“Nenhum homem é uma ilha.”

(John Donne)

RESUMO

No presente estudo, os efeitos do transplante de células mononucleares (TMN) extraídas de medula óssea de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) adultos (Ad) ou jovens (Jv) isogênicos ou de ratos Wistar-Kyoto (WKY) normotensos alogênicos sobre os níveis de pressão arterial sistêmica de SHRs fêmeas foram avaliados. Células mononucleares de medula óssea foram retiradas de tíbias, fêmurs e úmeros de SHRs doadores machos isogênicos adultos (de 16 semanas de idade, TMN-Ad, n=4) ou jovens (de 4 semanas de idade, TMN-Jv, n=2) ou de ratos WKY normotensos (de 16 semanas de idade, TMN-WKY, n=2) e injetadas (5×10^6 cels./rato, i.v.) em SHRs receptoras fêmeas de 16-20 semanas de idade (grupos TMN-Ad, n=10, TMN-Jv, n=7 e TMN-WKY, n=7). As células mononucleares foram marcadas com o corante fluorescente celltracker CM-DiI, previamente à administração. Ratas SHRs fêmeas, recebendo apenas o veículo, formaram o grupo controle (CON, n=15). Pressão arterial (PA) indireta foi registrada diariamente ou a cada dois dias por meio do método de oclusão da artéria caudal por uma semana antes até duas semanas, após o transplante em todos os grupos experimentais. No final desse período, após prévia canulação (24-48 horas antes), todos os animais foram submetidos ao registro direto da pressão arterial pulsátil por 01 hora, em condições estáveis e de repouso. Em seguida, posteriormente à anestesia com pentobarbital sódico, os animais foram eutanasiados. Concluído o sacrifício, microscopia de fluorescência foi realizada em cortes histológicos teciduais dos órgãos removidos, incluindo rins, baço, pulmões e coração, a fim de se verificar a presença de células de SHR doadores (celltracker CM-DiI⁺). Em ambos os grupos submetidos ao transplante isogênico (TMN-Ad e TMN-Jv), a PA foi reduzida após o terceiro dia, permanecendo baixa até o final do período de observação. Confirmando estes achados, os valores de PA média avaliados por meio de medida direta foram de 137 ± 4 mmHg no grupo TMN-Ad e 136 ± 3 mmHg no grupo TMN-Jv (versus 163 ± 5 mmHg no grupo CON, $p < 0.005$). Em adição, nenhuma diferença nos parâmetros de variabilidade da frequência cardíaca e na sensibilidade barorreflexa espontânea foram observadas entre os grupos, enquanto que a variância, o componente VLF (very low frequency) e o componente LF (low frequency) da variabilidade da pressão arterial foram significativamente reduzidos, em ambos os grupos TMN-Ad e TMN-Jv. Também se observou uma diminuição na hipertrofia cardíaca, provavelmente pela redução da sobrecarga hemodinâmica imposta ao ventrículo esquerdo. Não foram observadas modificações na densidade glomerular nos grupos TMN-Jv e TMN-Ad, comparados ao grupo CON. Pequenas quantidades de células foram encontradas em vários tecidos, incluindo os rins, enquanto um grande número de células estava marcadamente presente no baço dos animais que receberam transplante isogênico. Por outro lado, nas SHRs submetidas ao transplante alogênico com células de ratos WKY (grupo TMN-WKY), ao final do período de observação, nenhuma queda da PA foi observada. Em concordância, a PA média direta medida nos animais TMN-WKY não diferiu dos respectivos animais controles. Nenhuma modificação foi observada na variabilidade cardiovascular, sensibilidade barorreflexa, hipertrofia cardíaca e densidade glomerular dos animais TMN-WKY. No transplante alogênico, células WKY transplantadas foram encontradas apenas no baço, sugerindo rejeição das células. Esses achados sugerem que o transplante de células mononucleares de medula óssea isogênica, em animais imunocompetentes, de diferentes idades é capaz de reduzir a pressão arterial associada à hipertensão arterial sistêmica.

Palavras-Chave: 1. Medula óssea. 2. Transplante de medula óssea. 3. Células da medula óssea. 4. Hipertensão.

ABSTRACT

In the present study, the effects of transplantation of bone marrow-mononuclear cells (MNT) from isogenic adult (Ad) or young (Yo) spontaneously hypertensive rats (SHR) or allogenic normotensive Wistar-Kyoto (WKY) rats on systemic arterial blood pressure levels of receptor SHRs were assessed. Bone marrow-mononuclear cells were extracted from tibiae, femurs and umerus of isogenic male adult (16 weeks-old aged rats, MNT-Ad, n=4) or young (4 weeks-old rats, MNT-Yo, n=2) donor SHRs or allogenic male adult normotensive WKY rats (16 weeks-old aged rats, MNT-WKY, n=2) and injected (5×10^6 cells/rats, i.v.) in 24 female 16-20 weeks-old aged receptor SHRs (respectively, MNT-Ad, n=10, MNT-Yo, n=7 and MNT-WKY, n=7). Mononuclear cells were labeled using fluorescent stain celltracker CM-DiI, before administration in order to track cell destination. Age-matched female SHRs receiving only vehicle formed control groups (CON, n=15). Indirect arterial pressure (AP) were daily or each two days recorded by means of caudal artery occlusion method during one week before and until two weeks after cell transplantation in all experimental groups. At the ending, after previous canulation (performed 24-48 hours before), all animals were submitted to a pulsatile direct AP recording session during one hour in conscious freely moving conditions. Following, all animals were euthanized under supra-dosage of anesthetic sodium thiopental (100mg/Kg, i.p.) and fluorescence microscopy was used on thin sections of several organs including kidneys, spleen, lung and heart in order to track donor CM-DiI⁺ cells. In both groups submitted to isogenic transplantation (MNT-Ad and MNT-Yo), AP was significantly reduced after the third day, remaining lower until the end of observation period. Confirming these findings, the values of mean AP directly measured were 137 ± 4 mmHg in MNT-Ad group and 136 ± 3 mmHg in MNT-Yo group (versus 163 ± 5 mmHg in CON group, $p < 0.005$). In addition, no difference in heart rate variability and spontaneous baroreflex sensitivity parameters were observed while variance, very low frequency and low frequency components of arterial pressure variability were significantly lowers in both MNT-Ad and MNT-Yo groups. A significant reduction in cardiac hypertrophy, probably due to the relief in hemodynamic overload on left ventricle was also observed. No changes were verified in glomerular density in both MNT-Yo and MNT-Ad groups, compared to CON group. Small amounts of CM-DiI⁺ cells were found in several tissues, including the kidneys, while a great amount of labeled transplanted cells were present into the spleen of the animals that received isogenic transplantation. On the other hand, in SHRs submitted to allogenic transplantation with WKY cells (MNT-WKY group), no reduction in AP was observed after eleven day of observation. According to this, direct AP measurements in MNT-WKY animals were not different of control animals. In addition, no changes in cardiovascular variability, baroreflex sensitivity, cardiac hypertrophy and glomerular density were observed in MNT-WKY animals. In this allogenic transplantation, labeled transplanted WKY cells were found only into the spleen, suggesting immune rejection. All these findings indicate that isogenic, in immunocompetent animals, transplantation of bone marrow-mononuclear cells with different ages is able to consistently reduce arterial blood pressure in systemic arterial hypertension.

Keywords: 1. Bone marrow. 2. Bone marrow transplantation. 3. Bone marrow cells. 4. Hypertension.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1: Efeitos do transplante isogênico de células mononucleares de medula óssea. Valores médios das pressões arteriais sistólicas medidas pela artéria caudal a cada dois dias, até o décimo quarto dia de observação, após o transplante isogênico de células mononucleares adultas ou jovens.....53
- Figura 2: Efeitos do transplante isogênico de células mononucleares de medula óssea. Traçados representativos das séries temporais e densidade espectral de potência da variabilidade do intervalo de pulso e da pressão arterial sistólica do grupo controle e do grupo que recebeu células mononucleares de medula óssea adulta.....57
- Figura 3: Efeitos do transplante isogênico de células mononucleares de medula óssea. Valores médios do peso cardíaco relativo (em mg/g) nos animais do grupo TMN-Ad, TMN-Jv e CON.....59
- Figura 4: Efeitos do transplante isogênico de células mononucleares de medula óssea. Cortes histológicos com 5 µm de espessura de rins, corados com picrossirius red, de animais representativos do grupo controle e dos grupos que receberam células mononucleares de medula óssea jovem ou adulta.....61
- Figura 5: Efeitos do transplante isogênico de células mononucleares de medula óssea. Cortes histológicos com 5 µm de espessura de rim de um animal representativo do grupo controle e dos grupos que receberam células mononucleares de medula óssea jovem ou adulta, marcadas com celltracker CM-DiI.....62
- Figura 6: Efeitos do transplante isogênico de células mononucleares de medula óssea. Cortes histológicos com 5 µm de espessura de baço de um animal representativo do grupo que recebeu veículo e dos grupos que receberam células mononucleares de medula óssea jovem ou adulta, marcadas com celltracker CM-DiI.....63
- Figura 7: Efeitos do transplante alogênico de células mononucleares de medula óssea. Valores médios das pressões arteriais sistólicas medidas pela artéria caudal diariamente, até o décimo primeiro dia de observação, após o transplante alogênico de células mononucleares adultas oriundas de ratos WKY normotensos.....64

Figura 8: Efeitos do transplante alogênico de células mononucleares de medula óssea. Valores médios do peso cardíaco relativo (em mg/g) nos animais do grupo CON e TMN-WKY.....	69
Figura 9: Efeitos do transplante alogênico de células mononucleares de medula óssea. Cortes histológicos com 5 µm de espessura de rins, corados com picrosirius red, de animais representativos do grupo controle e do grupo que recebeu células mononucleares de medula óssea de rato WKY normotenso.....	71
Figura 10: Efeitos do transplante alogênico de células mononucleares de medula óssea. Cortes histológicos com 5 µm de espessura de baço de um animal representativo do grupo controle e do grupo que recebeu células mononucleares de medula óssea de rato WKY normotenso marcadas com celltracker CM-DiI.....	72

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Efeitos do transplante isogênico de células mononucleares de medula óssea. Valores médios das pressões arteriais sistólica, média e diastólica, e frequência cardíaca dos grupos controle e tratados com células mononucleares de medula óssea adulta ou jovem.....54
- Tabela 2: Efeitos do transplante isogênico de células mononucleares de medula óssea. Valores médios dos parâmetros temporais e espectrais da variabilidade do intervalo de pulso dos animais do grupo controle e dos animais tratados com transplante de células mononucleares de medula óssea adulta ou jovem.....55
- Tabela 3: Efeitos do transplante isogênico de células mononucleares de medula óssea. Valores médios dos parâmetros temporais e espectrais da variabilidade de pressão arterial sistólica dos animais do grupo controle e dos animais tratados com transplante de células mononucleares de medula óssea adulta ou jovem.....56
- Tabela 4: Efeitos do transplante isogênico de células mononucleares de medula óssea. Valores médios da coerência, do desvio de fase e do alfa-índice estimados a partir da análise espectral cruzada entre as oscilações na faixa LF da variabilidade do intervalo de pulso e da pressão arterial sistólica dos animais do grupo controle e dos animais tratados com transplante de células mononucleares de medula óssea adulta ou jovem.....58
- Tabela 5: Efeitos do transplante isogênico de células mononucleares de medula óssea. Valores médios da densidade glomerular nos animais do grupo controle e nos animais tratados com transplante de células mononucleares de medula óssea adulta ou jovem.....60
- Tabela 6: Efeitos do transplante alogênico de células mononucleares de medula óssea. Valores médios das pressões arteriais sistólica, média e diastólica, e frequência cardíaca, coletados durante um período de registro basal de 01 hora, dos grupos controle e tratados com células mononucleares de medula óssea adulta de ratos WKY normotensos.....65
- Tabela 7: Efeitos do transplante alogênico de células mononucleares de medula óssea. Valores médios dos parâmetros temporais e espectrais da variabilidade do intervalo de pulso, coletados durante um período de registro basal de 01 hora, dos animais do grupo controle e

dos animais tratados com transplante de células mononucleares de medula óssea adulta de ratos WKY normotensos.....66

Tabela 8: Efeitos do transplante alogênico de células mononucleares de medula óssea. Valores médios dos parâmetros temporais e espectrais da variabilidade de pressão arterial sistólica, coletados durante um período de registro basal de 01 hora, dos animais do grupo controle e dos animais tratados com transplante de células mononucleares de medula óssea adulta de ratos WKY normotensos.....67

Tabela 9: Efeitos do transplante alogênico de células mononucleares de medula óssea. Valores médios da coerência, do desvio de fase e do alfa-índice estimados a partir da análise espectral cruzada entre as oscilações na faixa LF da variabilidade do intervalo de pulso e da pressão arterial sistólica, coletadas durante um período de registro basal de 01 hora, dos animais do grupo controle e dos animais tratados com transplante de células mononucleares de medula óssea adulta de ratos WKY normotensos.....68

Tabela 10: Efeitos do transplante alogênico de células mononucleares de medula óssea. Valores médios da densidade glomerular nos animais do grupo controle e nos animais tratados com transplante de células mononucleares de medula óssea adulta de ratos WKY normotensos.....70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ANOVA	Análise de Variância
AT1	Receptor 1 para a angiotensina II
AVC	Acidente Vascular Cerebral
AVE	Acidente Vascular Encefálico
CAD12/36	Conversor analógico-digital de 12-bit de resolução
CD	Grupo de Diferenciação
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CFU-F	Unidades formadoras de colônias de fibroblastos
CM-DiI	Corante fluorescente marcador de células
c-Myc	Proto-oncogene c-Myc
CON	Grupo controle
CSC	Célula tronco cardíaca
DAPI	Contra-coloração nuclear
DC	Débito Cardíaco
DiI-Ac-LDL	Corante cianina de lipoproteína de baixa densidade acetilada
DNA	Ácido desoxirribonucleotídeo
DVP	Doença Vascular Periférica
EG	Célula germinativa embrionária
eNOS	Enzima sintase de óxido nítrico
EPC	Célula progenitora endotelial
EpiSC	Epiblasto pós-implantação
ESC	Célula tronco embrionária
FC	Frequência Cardíaca

G-CSF	Fator estimulador de colônias granulocíticas
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
hESC	Célula tronco embrionária humana
HF	Componente de alta frequência
hiPSC	Célula tronco pluripotente induzida humana
HLA-DR	Antígeno leucocitário humano DR
HSC	Célula tronco hematopoiética
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio
IBM/PC	Computador pessoal
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
ICC	Insuficiência Cardíaca Congestiva
IL-1 β	Interleucina 1 β
IP	Intervalo de Pulso
iPSC	Célula tronco pluripotente induzida
Kit (c-Kit)	Proteína tirosina quinase
Klf4	Fator semelhante a Kruppel 4
LF	Componente de baixa frequência
Lin	Célula hematopoiética linhagem-comprometida
maGSC	Célula tronco germinativa adulta
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos 1
MO	Medula óssea
MSC	Célula estromal mesenquimal multipotente
MT1-MMP	Metaloproteinase de matriz de membrana tipo 1
NIH	Institutos Nacionais de Saúde
NO	Óxido nítrico
Oct4	Fator transcricional ligado ao octâmero - 4

PA	Pressão Arterial
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAM	Pressão Arterial Média
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PBS/EDTA	Solução salina/fosfato com etilenodiaminotetracético
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaqueta
Rho	Proteínas quinases ligantes de GTP
RPT	Resistência Periférica Total
RVLM	Região rostral ventro-lateral do bulbo
SC	Célula tronco
Sca-1	Antígeno de célula tronco 1
SCF	Fator de célula tronco
SDF1- α	Fator derivado de célula estromal 1 alfa
SHR	Rato espontaneamente hipertenso
Sox2	SRY(região determinante do sexo Y)-box 2
SRA	Sistema Renina-Angiotensina
TMN-Ad	Grupo transplante de células mononucleares de medula óssea adulta
TMN-Jv	Grupo transplante de células mononucleares de medula óssea jovem
TMN-WKY	Grupo transplante de células mononucleares de medula óssea adulta de ratos WKY normotensos
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UFTM	Universidade Federal do Triângulo Mineiro
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR-2	Receptor 2 do fator de crescimento vascular endotelial
VLf	Componente de muito baixa frequência
VS	Volume Sistólico

vWF	Fator de Von Willebrand
WHO	Organização Mundial da Saúde
WKY	Rato Wistar-Kyoto

LISTA DE SÍMBOLOS

$\mu\text{M/L}$	Micromolar/litro
π rads	π radianos
μm	Micrometros
bpm	Batimentos por minuto
i.p.	Administração via intraperitoneal
i.v.	Administração via endovenosa
mg/g	Miligrama/grama
mg/kg	Miligrama/quilograma
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mm^2	Milímetros quadrados
mmHg	Milímetros de mercúrio
mmHg^2	Milímetros de mercúrio quadrados
vs.	Versus
u.n.	Unidades normalizadas
pH	Potencial hidrogeniônico
ms	Milissegundos
ms/mmHg	Milissegundos/milímetros de mercúrio
ms^2	Milissegundos quadrados

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVOS	42
2.1	OBJETIVO GERAL.....	43
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
3	MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1	ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	45
3.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	45
3.2.1	Transplante Isogênico	45
3.2.2	Transplante Alogênico	46
3.3	ISOLAMENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA.....	46
3.4	PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	47
3.5	ANÁLISE DOS DADOS.....	49
3.6	PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO.....	50
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
4	RESULTADOS	52
4.1	TRANSPLANTE ISOGÊNICO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA.....	53
4.2	TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA.....	64
5	DISCUSSÃO	73
6	CONCLUSÕES	82
	REFERÊNCIAS	84

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares são as maiores causas de morte no mundo, atualmente. No ano de 2008, mais de 17,3 milhões de pessoas morreram em decorrência de complicações oriundas de doenças cardiovasculares, o que representa aproximadamente um terço de todas as mortes ocorridas, nesse ano, em todo o mundo. Desse número, estipula-se que cerca de três milhões sucederam em pessoas com idade inferior a 60 anos, sendo que, dessas mortes prematuras, 4% ocorreram em países de alta renda e 42% aconteceram em países de baixa renda, demonstrando uma desigualdade na quantidade de casos entre populações (World Heart Organization - WHO, 2011b).

Dentre as doenças cardiovasculares mais importantes, destacam-se o ataque cardíaco, ou infarto agudo do miocárdio (IAM), e o acidente vascular encefálico (AVE), ou acidente vascular cerebral (AVC), que representaram, no ano de 2008, aproximadamente 7,3 milhões e 6,2 milhões, respectivamente, do total de mortes por doenças cardiovasculares no mundo (WHO, 2011a).

Segundo WHO (2011b), ainda neste contexto de doenças cardiovasculares, a aterosclerose torna-se bastante relevante como causa principal, não somente do IAM ou AVE, como também de doenças arteriais, como a aterosclerose aórtica e a doença vascular periférica (DVP). Apesar da expressiva importância da aterosclerose na etiologia das principais doenças relacionadas acima, outras doenças cardiovasculares, exemplificadas pela doença cardíaca congênita (ou cardiopatia congênita), pela doença cardíaca reumática, pelas cardiomiopatias ou pelas arritmias cardíacas, não a têm como causa fundamental, normalmente.

Tendo-se em vista essa relevância etiológica da aterosclerose nas doenças cardiovasculares, uma atenção especial preventiva, frente aos fatores de risco relacionados à formação e ao estabelecimento da placa aterosclerótica, torna-se um alvo importante a ser atingido, para que haja uma diminuição nos dados alarmantes de mortalidade mundial, os quais estão vinculados às principais doenças cardiovasculares.

Fatores de risco podem estar ligados ao aparecimento da aterosclerose e são classificados quanto ao comportamento, metabolismo e/ou outro. Quanto aos fatores de risco relacionados aos hábitos comportamentais, encaixam-se o uso do tabaco, a inatividade física ou sedentarismo, a dieta não saudável (rica em sais, gordura e calorias) e o uso excessivo de álcool. Em relação aos fatores de risco metabólicos, podem ser citados a hipertensão arterial sistêmica (HAS), onde se observa uma elevada pressão sanguínea; o diabetes, com a presença

de elevados níveis glicêmicos; o sobrepeso (ou, até mesmo, a obesidade) e a dislipidemia, constatada por altos níveis sanguíneos de colesterol, principalmente. Além desses fatores de risco altamente importantes na manifestação de ateromas, outros, como a pobreza, a idade avançada, o gênero, a herança genética (hereditariedade), os fatores psicológicos (estresse ou depressão, por exemplo), podem favorecer a sua ocorrência (WHO, 2011b).

De acordo com dados publicados pelo WHO (2009), os fatores de risco comportamentais e metabólicos, juntos, associam-se a 61% das mortes por doenças cardiovasculares e a mais de 75% das doenças cardíacas isquêmicas (ou cardiopatias isquêmicas) em todo o mundo. Reduzindo-se a exposição de organismos a esses fatores de risco comportamentais e metabólicos, aumentar-se-ia a expectativa de vida da população mundial em pelo menos cinco anos.

Dentre esses fatores possivelmente relacionados ao surgimento de placas ateromatosas e, conseqüentemente, de doenças cardiovasculares, a hipertensão arterial sistêmica tem um papel imprescindivelmente importante e, assim sendo, é alvo de muitas pesquisas científicas.

A HAS é uma síndrome clínica na qual a pressão arterial sistêmica encontra-se persistente e cronicamente elevada para valores superiores aos considerados ótimos ou aos fisiologicamente normais, o que a permite ser considerada como o maior fator de risco associado a eventos cardiovasculares e a perdas funcionais em diferentes órgãos (Sanchez *et al*, 2009).

O íntegro funcionamento do sistema circulatório, o qual condiz com uma adequada perfusão tecidual sanguínea essencialmente composta por nutrientes e oxigênio, é dependente de uma manutenção imprescindível da pressão arterial sistêmica a níveis coerentes com a homeostase e sobrevivência do organismo (Beavers, Lip e O'Brien, 2001). Assim, os determinantes para o correto desempenho funcional da circulação obedecem à lei de Poiseuille, cujo conceito embasa-se na determinação simplificada da pressão arterial (PA), que pode ser estabelecida utilizando a seguinte formulação: pressão (arterial) = fluxo (sanguíneo) vs. resistência (periférica total), sendo que o fluxo sanguíneo depende do débito cardíaco (DC) - o qual pode ser evidenciado pelo volume sistólico (VS) final ejetado e pela frequência cardíaca (FC) - e que a resistência periférica total (RPT) é primariamente presumida pelo estado contrátil de pequenas artérias e arteríolas, cuja distribuição estende-se por todo o organismo (Coffman, 2011).

A HAS, diagnosticada e caracterizada por valores crônicos de pressão arterial sistólica iguais ou superiores a 140 mmHg e/ou de pressão arterial diastólica iguais ou superiores a 90 mmHg, é estimada ser a responsável por mais de 7,5 milhões de mortes, o que representa 12,8% de todas as mortes ocorridas anualmente no mundo, principalmente pelo fato de ela ser o maior fator de risco para IAM e AVE. De forma global, a prevalência da hipertensão na população com idade superior a 25 anos foi de aproximadamente 40%, em 2008. Apesar de a proporção da população mundial com elevados níveis pressóricos sanguíneos, ou hipertensão não controlada, ter diminuído infimamente, entre 1980 e 2008, o número de pessoas hipertensas passou de 600 milhões, em 1980, para um bilhão, em 2008. Ainda em relação a dados epidemiológicos, a maior prevalência de pessoas com hipertensão arterial sistêmica está no continente africano e a menor encontra-se no continente americano, o que pode ser constatado, respectivamente, pelos valores de 46% e 35%, independentemente do sexo (Danaei *et al*, 2011, WHO, 2010).

Considerando-se a pressão sanguínea constante e fisiologicamente variável e que, quanto maior os seus níveis, maiores as chances de riscos cardiovasculares (Neaton e Wentworth, 1992, Stamler J, Stamler R e Neaton, 1993), chegou-se a um consenso sobre os valores de pressão arterial sistólica e diastólica para se determinar os estágios de hipertensão na população adulta. Segundo esse consenso, pessoas que apresentarem, em repouso, pressão arterial (sistólica/diastólica) inferior a 120/80 mmHg, terão a pressão sanguínea considerada ideal e as que obtiverem valores iguais a esse e inferiores a 129/84 mmHg, serão constatadas como normotensas. Valores identificados entre 130/85 mmHg e 139/89 mmHg indicam um estágio limítrofe de pressão arterial desejável, denominado estágio de pré-hipertensão. Já os valores pressóricos acima de 140/90 mmHg, serão classificados como hipertensão de grau 1, grau 2 e grau 3, quando apresentarem, respectivamente, pressão arterial de 140/90 a 159/99 mmHg, de 160/100 a 179/109 mmHg e superior a 180/110 mmHg. Casos em que a pressão arterial sistólica for maior ou igual a 140 mmHg e a diastólica estiver menor do que 90 mmHg estarão diagnosticados como hipertensão sistólica isolada (Chobanian *et al*, 2003, Mancia *et al*, 2007).

Apesar de, em estágios iniciais do seu surgimento, a hipertensão arterial sistêmica ser assintomática, o seu profundo impacto na morbimortalidade de indivíduos no mundo dá-se principalmente pela sua relação com alterações em órgãos alvos importantes, como cérebro, coração, rins, vasos sanguíneos, etc. (Ganten e Jong, 1994). Além disso, esta síndrome clínica está frequentemente associada a algumas doenças, como diabetes mellitus, aterosclerose

coronariana, insuficiência cardíaca congestiva, derrame, ataque cardíaco, aneurisma, doença vascular periférica, insuficiência renal crônica, além de poder levar o indivíduo a inúmeras sessões de diálise e/ou à morte (Sanchez *et al*, 2009).

Atualmente, a HAS é etiologicamente classificada em duas formas. A primeira é a hipertensão primária (denominada ainda como essencial ou idiopática), a qual é diagnosticada quando a pressão arterial é superior à considerada normal e essa elevação pressórica não possui uma causa base definida, podendo inclusive ter uma etiologia multifatorial. Essa forma é responsável por 90-95% de todos os casos de hipertensão no mundo. Já a hipertensão secundária, ocorre quando a elevação da pressão arterial é decorrente de alguma alteração fisiopatológica, previamente identificada. Em torno de 5-10% da população hipertensa possui esse tipo (Carretero e Oparil, 2000, Sanchez *et al*, 2009). Nesta modalidade de HAS, pode-se inferir que a elevada pressão arterial é geralmente consequência de alterações renais, do sistema endócrino, do sistema vascular, do sistema nervoso central, etc. (Chiong *et al*, 2008).

Normalmente, a hipertensão secundária vincula-se à hipertensão resistente, cujo conceito desta, de acordo com trabalho publicado por Calhoun *et al* (2008), é definido quando se tem uma pressão arterial descontrolada, apesar do uso simultâneo de três ou mais medicamentos anti-hipertensivos (incluindo-se pelo menos um diurético), além de ela estar presente em 20-30% dos casos diagnosticados com hipertensão. A prevalência de causas secundárias que elevam a pressão sanguínea é maior em pessoas com hipertensão resistente quando comparado às pessoas com hipertensão controlada. Dessa forma, uma sistemática pesquisa sobre as causas secundárias da hipertensão torna-se extremamente importante em pacientes com hipertensão resistente, devido à provável presença de condições reversíveis que possam auxiliar o controle da pressão arterial (Chobanian *et al*, 2003).

Não obstante à sua importância clínica, a hipertensão secundária, etiologicamente conhecida, é potencialmente curável ou é mais facilmente controlada por drogas mais específicas. Em muitos casos, corrigindo-se a causa da hipertensão secundária, obter-se-á a cura definitiva dessa síndrome e evitar-se-á o uso de terapia medicamentosa por longos períodos de tempo, o que diminuiria os custos financeiros e os riscos colaterais com a sua utilização (Calhoun *et al*, 2008).

Diferentemente da hipertensão secundária, a hipertensão essencial necessita de pesquisas mais aprofundadas e complexas com o objetivo de se elucidar os seus múltiplos mecanismos etiológicos e suas condições fisiopatológicas, fundamentalmente por esta ser

relevantemente prevalente na população mundial, quando comparada à secundária, a fim de se aperfeiçoar o seu tratamento e, se possível, obter a sua cura definitiva.

Nesse contexto, a hipertensão arterial sistêmica essencial, por não ter diagnósticos inequivocadamente exatos e facilmente acessíveis, devido às suas causas indefinidas e possivelmente multifatoriais que elevam cronicamente a pressão arterial, ascende-se como uma síndrome clínica detentora de uma dificuldade quanto ao desenvolvimento preciso de terapias individuais para o seu tratamento. Conseqüentemente a esse empecilho, a escolha de medicamentos a serem ministrados terapêuticamente é determinada de forma empírica, baseada em estudos epidemiológicos, nos quais as classificações dos grupos de risco, exemplificados pela idade, pela raça ou, inclusive, pela coexistência de outras doenças (diabetes, doença cardíaca, etc.), são frequentemente consultadas. Dessa forma, um entendimento consensual sobre os reais mecanismos moleculares da patogenia da hipertensão primária institui-se como uma prioridade urgente a ser desvendada, tanto pela pesquisa básica, quanto pela pesquisa translacional (Coffman, 2011).

Ainda segundo Coffman (2011), os componentes variavelmente modificados que determinam a pressão arterial, como o débito cardíaco, a frequência cardíaca, o volume sistólico ou a resistência periférica total, estão sujeitos a diversos mecanismos regulatórios. Portanto, desvendar as causas da hipertensão arterial sistêmica requer o conhecimento dos diferentes sistemas que contribuem favoravelmente à manutenção homeostática da pressão sanguínea, incluindo-se o sistema nervoso central (autônomo simpático), o sistema vascular (função endotelial) e o rim, sobre os quais, mesmo sendo constantemente estudados há décadas, não se tem um conhecimento específico quanto às suas atuações etiológicas na hipertensão. Além desses, o sistema imune (Abboud, Harwani e Chapleau, 2012) e, principalmente, os fatores genéticos, através de suas variações gênicas, que podem ser altamente ou minimamente expressas, bem como de suas alterações fenotípicas, podem culminar com a elevação da pressão arterial, causando a HAS essencial (Luft, 1998).

O sistema nervoso autônomo é classificado em simpático e parassimpático, os quais normalmente apresentam ações opostas, onde o primeiro endossa “fuga e luta” e o segundo indica “descansar e digerir”. O controle neural da circulação sanguínea, importante mecanismo ativado no controle da PA a curto prazo, primordialmente sobre o débito cardíaco e a resistência periférica, é determinado pelo sistema nervoso autônomo parassimpático, o qual regula eferente e basicamente o coração, e pelo simpático, responsável pela inervação

eferente do coração, vasos sanguíneos, rins e medulas adrenais. A provável causa neurogênica da hipertensão essencial, possivelmente mais importante do que o comprometimento renal ou vascular, apesar da íntima associação do sistema nervoso autonômico com esses dois sistemas, é uma anormalidade essencialmente autonômica simpática, cuja alteração pode se iniciar no controle aferente do sistema (barorreceptores, quimiorreceptores ou aferentes renais) ou no circuito central. A preponderância do simpático sobre o parassimpático, comprovada em experimentos com substâncias antagonistas do sistema simpático, demonstra uma profunda relação deste sistema com a hipertensão arterial essencial humana, visto a sua mediação pressórica arterial, geralmente no que diz respeito à elevação da frequência cardíaca, aumento do tônus vascular (vasoconstrição) e redução da excreção renal de sódio (Coffman, 2011, Guyenet, 2006, Malpas, 2010).

O endotélio vascular está envolvido fundamentalmente na resposta vasodilatadora e vasoconstritora localizada, regulando assim as possíveis quedas ou elevações momentâneas de pressão arterial. Uma disfunção nesse tecido implicaria possivelmente em uma regulação vascular comprometida (Irigoyen *et al*, 2000). A hipertensão essencial está vinculada a inúmeras alterações bioquímicas e fisiológicas nas paredes vasculares, nas quais se incluem a contração excessiva do vaso, a hipertrofia e hiperplasia das células musculares lisas, promovendo uma resistência, constantemente aumentada no vaso, ao fluxo sanguíneo normal. Além dessas modificações estruturais do vaso, a ação hormonal de potentes vasoconstrictores, como a angiotensina II, principal mediador do sistema renina-angiotensina-aldosterona, favorecem essa resistência periférica aumentada, desencadeando, caso a resistência seja sustentada, o aparecimento de altos níveis pressóricos arteriais patológicos, após a ativação de uma cascata de sinalização intracelular, com a participação de receptores AT1, acoplados à proteína G, de proteínas quinases Rho, dentre outras (Guilluy *et al*, 2010).

A participação renal no controle da pressão arterial é percebida quando há a necessidade de se manter o equilíbrio hidroeletrólítico sanguíneo, estabilizando-se os volumes dos fluídos corpóreos (Guyton, 1991). Isso é ratificado por experimentos, nos quais as alterações promovidas favoreceram o desenvolvimento da hipertensão arterial sistêmica. Por exemplo, a elevada e constante ingestão de sal contribui para o aumento crônico da pressão arterial, devido essencialmente à disfunção na excreção renal de sódio, o que culmina com a alta manutenção desse composto iônico no sangue e, conseqüentemente, com a retenção de líquido, levando ao equilíbrio hidroeletrólítico (Meneton *et al*, 2005). Crowley *et al* (2005) demonstraram a conexão entre o sistema renina-angiotensina (SRA), independente de

aldosterona e ativado principalmente por mecanismos de barorreflexo, e os rins, fundamentalmente pela expressão nestes de receptores AT1 para angiotensina II, os quais estão intimamente relacionados com a vasculatura renal e com o epitélio renal, objetivando-se a realização da excreção renal de sódio. Mais uma vez, identifica-se um amplo vínculo entre os sistemas nervoso autonômico, vascular e renal, complicando-se ainda mais o cenário da busca pelas razões etiológicas da hipertensão primária humana.

Quanto ao controle imunológico da pressão arterial, pode-se inferir, de acordo com o trabalho de Abboud, Harwani e Chapleau (2012), que esse sistema, extensivamente modulado pelo sistema nervoso autonômico, é considerado um dos mais importantes desencadeadores de processos patológicos celulares e estruturais, visto a ativação de mediadores pró-inflamatórios do sistema imune inato e adaptativo, as quais podem promover o surgimento da hipertensão. Constata-se essa relação entre hipertensão e sistema imunológico, exemplificadamente, através da descrição publicada sobre a angiotensina II, substância conhecida por induzir hipertensão e elevar a expressão de interleucina-1 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) e molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) (Huang *et al*, 2010); ou também pela formação de neoantígenos, liberados após um estresse inicial de origem neural, os quais ativam o sistema imune inato e promovem a liberação de citocinas, que, por sua vez, ativam os linfócitos T e o sistema imune adaptativo, resultando em consequências inflamatórias consideráveis e hipertensão arterial (Harrison *et al*, 2010); entre outros.

As mutações gênicas inicialmente não são as principais alterações genéticas responsáveis pela possível elevação da pressão arterial, mas sim a presença de polimorfismos em genes altamente relevantes, como, por exemplo, no gene que codifica o angiotensinogênio, a α -aducina (proteína componente do citoesqueleto celular), os receptores α - e β -adrenérgicos ou a subunidade β -3 da proteína G, bem como os estudos de ligação gênica, os quais têm recebido atenção devido a inúmeros sítios genômicos que abrigam outros genes relacionados à HAS (Bray *et al*, 2000, Psaty *et al*, 2002). Embora haja algumas descobertas relacionando alterações gênicas com o controle da pressão arterial, a vasta maioria da contribuição genética à hipertensão essencial humana permanece inexplicável e é muito provável que isso seja decorrente da probabilidade de que a variação na pressão arterial seja determinada pela ação conjunta de vários genes, sendo que cada um desempenhe um pequeno efeito no conjunto (Coffman, 2011, Lifton, Gharavi e Geller, 2001). Além disso, a identificação de genes alelos influentes no desenvolvimento da hipertensão arterial é

dificultada pelo fato de dois fenótipos determinantes da pressão sanguínea (DC e RPT) serem controlados por fenótipos intermediários, incluindo o sistema nervoso autonômico, hormônios vasopressores/vasodepressores, a estrutura do sistema cardiovascular, a função renal, entre outros, o que indica, portanto, a característica poligênica da HAS (Williams *et al*, 1994). Também, considera-se um obstáculo enorme a essa identificação, a presença de um ou mais fatores fenotípicos simultaneamente observados em pacientes hipertensos, nos quais se incluem a obesidade, a resistência à insulina, a alta ingestão de álcool e sal, a idade, o estilo de vida sedentário, o estresse, etc. (Sever e Poulter, 1989).

Estudos sobre a causalidade da hipertensão arterial idiopática humana são particularmente desafiadores no cenário clínico, nos quais, além de necessitarem de métodos invasivos dificilmente oportunos, observa-se um mascaramento dos reais mecanismos fisiopatológicos por vias alternativas compensatórias, por uma dieta específica ou, até mesmo, por uso de medicamentos. Dados esses obstáculos e com o intuito de facilitar os estudos mecanísticos da hipertensão essencial humana, modelos de animais geneticamente modificados têm sido frequentemente utilizados, objetivando-se promover uma alteração gênica importante e suas consequências. Porém, dessa forma, não se consegue uma recapitulação idônea do quadro hipertensivo observado em seres humanos (Coffman, 2011).

Na busca incessante por modelos semelhantes ao modelo de hipertensão arterial sistêmica primária humana, em 1963, na cidade de Kyoto (Japão), Okamoto e Aoki desenvolveram um modelo originalmente a partir de endocruzamentos seletivos de ratos que apresentavam os maiores níveis pressóricos da linhagem Wistar. Assim, esses pesquisadores obtiveram um modelo de rato detentor de uma similaridade enorme com a fisiopatogenia da HAS essencial humana: o rato espontaneamente hipertenso (SHR). Em contrapartida, os animais normotensos, ou seja, isentos de características inerentes à hipertensão primária encontrada nos animais SHR, foram denominados ratos Wistar-Kyoto (WKY) e são reorganizados experimentalmente como grupos controle, em relação aos SHRs. Apesar dessa descoberta e mesmo sendo amplamente utilizados em pesquisas, há de se ressaltar que a hipertensão espontânea, tanto em rato, quanto em humanos, dificilmente tenha a mesma expressão gênica em ambos, seja poligênica, sofra a influência dos mesmos fatores ambientais e tenha os mesmos mecanismos pressores expressos em ambos, visto ser, o controle cardiocirculatório, multifatorial (Trippodo e Frohlich, 1981).

Animais desta linhagem começam a desenvolver a hipertensão arterial com aproximadamente cinco semanas de vida, apresentando níveis tensionais, considerados hipertensivos, entre a 7^a e a 15^a semanas e atingem uma estabilidade pressórica (platô) por volta da 20^a até a 28^a semana. A partir desta idade, a hipertensão se estabiliza até aproximadamente um a um ano e meio de idade, quando os animais começam a desenvolver um quadro de insuficiência cardíaca congestiva (ICC), a qual está associada com uma elevada taxa de mortalidade (Yamori, 1984). Contudo, fatores ambientais, tais como ingestão exagerada de sódio, estresse, alterações sociais ou alterações no ciclo claro-escuro, podem afetar o desenvolvimento da hipertensão arterial espontânea em ratos (Fazan, Dias da Silva e Salgado, 2001).

Estudos *in vivo* demonstraram, em estágios iniciais de hipertensão, que os SHR possuem um DC elevado e uma RPT normal, e que, no decorrer do tempo, com a progressão a um estágio de vida adulta e estabelecimento da HAS, percebe-se o retorno do DC a valores normais, ou ainda diminuídos, e a elevação na RPT, promovidos por vasos sanguíneos hipertrofiados (Potts, Mckeown e Shoukas, 1998, Smith e Hutchins, 1979). Isso potencialmente desencadeará, com o progredir da hipertensão sistêmica no SHR, uma hipertrofia cardíaca (Thomas *et al*, 1997), culminando, em estágios avançados da síndrome, com uma ICC, onde se identifica uma diminuição relevante do DC (Frohlich, 1977).

Em relação à frequência cardíaca, constata-se que a sua elevação precoce nos animais espontaneamente hipertensos (a partir da 3^a semana de vida) é correlacionada aos altos níveis de pressão arterial, atingidos já na 6^a semana de vida, e isso se constitui como um índice amplamente preditivo de HAS na população estudada (Dickout e Lee, 1998).

A marcada hiperatividade simpática, uma das principais responsáveis pela elevação da RPT, é uma das características mais importantes dos SHRs (Judy *et al*, 1976). A importância do sistema nervoso autônomo simpático no desenvolvimento da hipertensão em SHR foi demonstrada por meio da redução da PA, em resposta à ablação cirúrgica ou farmacológica do sistema nervoso autonômico simpático, da prevenção do desenvolvimento da hipertensão por imunossimpatectomia, da simpatectomia química e outros métodos (Fazan, Dias da Silva e Salgado, 2001, Trippodo e Frohlich, 1981).

Além da hiperatividade simpática, uma relevante característica do modelo SHR é a acentuada disfunção endotelial, caracterizada essencialmente por uma vasodilatação dependente de endotélio, a qual se encontra profundamente diminuída, e por uma reduzida

biodisponibilidade do óxido nítrico, provavelmente decorrente de um estresse oxidativo endotelial excessivamente elevado. A disfunção endotelial também está diretamente implicada na elevação da resistência periférica total e na lesão crônica de órgãos alvo (McIntyre, Bohr e Dominiczak, 1999, Touyz, 2004).

Outra peculiaridade dos animais SHRs, indiretamente associada à própria disfunção endotelial, é a rarefação vascular, especialmente na microcirculação, a qual resulta em uma perda significativa de vasos arteriulares e capilares dispostos em paralelo na árvore circulatória, o que, seguramente, também contribui para a elevada RPT, fato seguramente observado neste modelo de hipertensão essencial em ratos (Le Noble *et al*, 1990, Le Noble *et al*, 1998, Levy *et al*, 2001, Prewitt, Chen e Dowell, 1982). A reduzida densidade capilar, usualmente identificada no tecido miocárdico, possivelmente reflete uma incapacidade do crescimento microcirculatório durante a angiogênese, no sentido do acompanhamento da hipertrofia cardíaca, o qual favorece o aumento da pressão arterial nesses animais (Feihl *et al*, 2006).

Curiosamente, essa mesma rarefação vascular foi demonstrada em pacientes hipertensos essenciais, mais uma vez, reforçando as similaridades entre os ratos espontaneamente hipertensos e os humanos, em relação à HAS essencial (Noon *et al*, 1997, Sullivan, Prewitt e Josephs, 1983). As razões para essa rarefação, verificada nos SHRs, não estão completamente elucidadas, mas parece envolver um defeito na capacidade de angiogênese, ou seja, formação de novos vasos por proliferação e migração de células endoteliais, um mecanismo mediado por fatores angiogênicos, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), pela angiopoietina 1 e 2 e por outros mecanismos. Em 2004, Wang *et al* demonstraram, utilizando-se de um modelo de angiogênese em esponja de álcool polivinil implantada no subcutâneo dos animais SHRs, uma menor capacidade de expressão do receptor 2 do VEGF (VEGFR-2), o mais importante na mediação dos efeitos angiogênicos do VEGF, além de uma reduzida expressão também da metaloproteinase de matriz tipo 1 de membrana (MT1-MMP), implicada na capacidade invasiva tecidual de células endoteliais, durante o processo angiogenético. Esses mesmos autores identificaram também, através de uma transfecção adenoviral com o gene do VEGF humano, o melhoramento da angiogênese previamente defeituosa no SHR. Não obstante a isso, a densidade microvascular pode estar diminuída também em decorrência de uma possível destruição vascular, a qual ocorre, pelo menos em parte, devido a apoptose de células endoteliais, mediante ao estresse oxidativo aumentado (Kobayashi, Delano e Schmid-Schonbein, 2005).

Nos últimos anos, em meio às mais instigantes publicações científicas, as quais salientam os principais avanços da medicina moderna, são comuns as descrições de uso de manipulação gênica e/ou celular para o tratamento de doenças/lesões, dentre as quais se destacam as doenças cardiovasculares. Frente às características desse modelo de rato espontaneamente hipertenso e a suas similaridades com a hipertensão essencial humana, estratégias terapêuticas anti-hipertensivas são normalmente estudadas nos animais SHRs, na tentativa de se elucidar mecanismos etiológicos ou tratamentos específicos para esse tipo de síndrome, que está altamente prevalente na população humana. Com esse intuito, novas modalidades terapêuticas baseadas principalmente em manipulação gênica (terapia gênica) e transplante de células (terapia celular) têm sido intensamente estudadas em inúmeras doenças cardiovasculares, inclusive na HAS humana (Melo *et al*, 2004).

A terapia gênica é uma ferramenta científica, iniciada na década de 1990, a qual consiste basicamente em uma técnica experimental de manipulação gênica, onde é introduzido um material genético, acoplado ou não ao genoma de uma determinada célula, para modular direta ou indiretamente a expressão gênica de um dado fenótipo (por exemplo, uma proteína específica), de forma a bloquear, ativar, diminuir ou aumentar essa sua expressão. Nesse sentido, obtém-se uma nova metodologia para o estudo e/ou manipulação de doenças incuráveis, ou até mesmo, intratáveis, como HAS essencial humana, câncer, síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) ou condições genéticas estabelecidas. Os genes de interesse ao estudo são incorporados ao material genético dos vetores virais atenuados, principalmente retrovírus e adenovírus, e, posteriormente, introduzidos por estes no organismo receptor. Se houver utilização de retrovírus como transportador do material a ser incorporado, o material genético de interesse é obrigatoriamente incluído em algum cromossomo do genoma celular do hospedeiro e, se a manipulação gênica for através de adenovírus, o material gênico é liberado no núcleo, porém não é obrigatoriamente inserido em algum cromossomo do hospedeiro (Genetics Home Reference, 2012, Gonin *et al*, 2005).

Ainda segundo Gonin *et al* (2005), o desenvolvimento de uma terapia gênica altamente segura e adequada deve ser estratificado em algumas etapas. Primeiramente, os pesquisadores e clínicos necessitam entender a fisiopatogênese da doença específica, almejando-se conhecer as células do organismo envolvidas nessa debilidade funcional patológica e, assim, projetar os alvos apropriados. Segundo, os desenvolvedores desses materiais genéticos precisam atentar-se para a pesquisa básica com o intuito de produzir, de forma estável e segura, vetores virais, cassetes de expressão (DNA vetorial) e células

hospedeiras, bem como para a pesquisa pré-clínica em modelos animais, aperfeiçoando-se assim a estratégia de terapia gênica. Além dessas etapas, é extremamente indispensável a consideração das questões legais ético-tecnológicas envolvidas nesse procedimento. Portanto, um diálogo transversal entre os pesquisadores e os criadores dos materiais gênicos a serem incorporados torna-se imprescindível, facilitando-se a criação de vetores ideais e resolvendo-se as restrições tecnológicas ligadas à complexidade dos condutores virais e da biologia celular animal, assim como dos fatores importantes para a sua correta utilização, como dosagem, vias de administração vetorial, tratamento, ou outros.

Concomitantemente, a medicina regenerativa surge como outra ferramenta promissora nesse contexto de doenças altamente complexas, no que diz respeito ao tratamento e/ou à cura. Usando-se de qualquer método para substituir ou regenerar células, tecidos ou órgãos, a fim de se restaurar ou se restabelecer a função normal comprometida, essa medicina é baseada em terapias sedimentadas em todos os quatro pilares, ou plataformas tecnológicas, da saúde: farmacêutica (química), biologia molecular (biotecnologia), engenharia (indústria de dispositivos médicos) e terapia celular. Assim como os três primeiros pilares citados, a terapia celular vem obtendo relevante atenção no mundo científico. Ela consiste na aplicação terapêutica de células que, assim como as outras plataformas tecnológicas, abrange uma ampla diversidade de especialidades médicas e aplicações, nas quais se incluem a terapia permanente de substituição celular, a engenharia de tecidos, a terapia com células transitórias (causam interrupção ou redução da progressão natural de uma doença), a terapia com células imunomodulatórias, a terapia com células protetoras (contra riscos a outras células e tecidos), a terapia gênica (veículos celulares) e as vacinas de células contra o câncer (Mason e Manzotti, 2009, Mason *et al*, 2011).

A terapia celular envolvendo as células tronco (“*stem cells*” - SC) tem despertado amplo interesse, tanto aos profissionais da área científica, quanto ao público geral, tornando-se provavelmente um dos tópicos mais relevantes da biologia experimental, atualmente. Uma das razões para essa expansiva expectativa dessa técnica consiste na promessa de que, decifrando-se e compreendendo-se as suas propriedades peculiares, ter-se-iam profundas percepções sobre a biologia dessas células, bem como novos anseios acerca do tratamento de uma enorme gama de doenças degenerativas, inclusive da HAS humana (Melton e Cowan, 2004).

As células tronco, intimamente envolvidas no crescimento, homeostase e reparo de muitos tecidos adultos, são definidas corretamente quanto às suas habilidades. Primeiramente, visto haver uma plasticidade variável, elas podem gerar progênes celulares, diferenciadas e especializadas, dos mais variados tecidos e órgãos, dependendo do grau inicial de potência (indiferenciação), a elas inerente. Segundo, essas células mantêm a capacidade de auto-renovação, a qual está relacionada à sua proliferação e multiplicação, em específicas condições, além de possuírem características clonogênicas, pelas quais essas células são capazes de produzir clones de si mesmas, o que é imprescindível para a manutenção do estoque (“*pool*”) de células tronco indiferenciadas (Jones e Wagers, 2008, Nombela-Arrieta, Ritz e Silberstein, 2011, Zipori, 2004).

Discorrendo sobre a classificação das células tronco, de acordo com Tsonis (2007), entende-se que elas são posicionalmente classificadas de acordo, principalmente, com o seu estado “tronco”, o que está relacionado ao grau de indiferenciação das mesmas, desde o maior estágio de indiferenciação (possibilidade de se diferenciar em qualquer tecido do organismo, inclusive anexos embrionários) até o maior grau de diferenciação (aquisição de morfologia, fenótipo e características funcionais específicas do tecido), sendo este o que possui o menor poder de especialização. Assim sendo, as células tronco totipotentes são assim denominadas por estarem aptas a originar, não somente as células somáticas embrionárias, mas também as células germinativas, bem como todos os anexos embrionários vinculados ao desenvolvimento embrionário (característica peculiar a esse tipo de células tronco). O seu maior exemplo é o zigoto, contudo algumas poucas células iniciais da fase de mórula do embrião também têm essa capacidade (Jaenisch e Young, 2008).

Outra categoria, ainda dentro da classificação quanto ao estado “tronco”, diz respeito às células tronco pluripotentes, cuja descendência é advinda das células totipotentes e cuja marcante função é proceder, a partir delas, os três folhetos embrionários: ectoderma, mesoderma e endoderma, não contribuindo, todavia, para a formação de membranas extraembrionárias. Enquadram-se a esse grupo, a célula tronco embrionária (ESC) (Evans e Kaufman, 1981), a qual está, fundamental e estruturalmente, localizada no maciço celular interno do blastocisto embrionário, e a célula tronco pluripotente induzida (iPSC) (Takahashi e Yamanaka, 2006), que, como o próprio nome sugere, é artificialmente induzida a readquirir pluripotência. Além dessas, a célula tronco derivada do epiblasto pós-implantação (EpiSC), a célula germinativa embrionária (EG) ou ainda a célula tronco germinativa adulta multipotente (maGSC) apresentam estado de pluripotência (Rossant, 2008).

Por último, há as células tronco multipotentes, detentoras de um potencial limitado de diferenciação celular e cuja origem e localização estão interligadas a praticamente todos os tecidos/órgãos adultos do organismo. Inicialmente, achava-se que as células tronco adultas de mamíferos estavam presentes somente em alguns órgãos, como sangue, pele, intestino, testículo e trato respiratório. No entanto, parece que a maioria ou, talvez, todos os órgãos do corpo humano são locais naturais dessas células tronco (Raff, 2003). Portanto, essas células são subclassificadas de acordo com os respectivos nichos originários, aos quais elas estão essencialmente, porém não somente, relacionadas com a reposição celular local. Nesse grupo, citam-se as células tronco, já bem caracterizadas e descritas na literatura, como a célula estromal mesenquimal multipotente - MSC (Dominici *et al*, 2006), a célula tronco hematopoiética - HSC (Kondo *et al*, 2003, Till e McCulloch, 1961), a célula progenitora endotelial - EPC (Asahara *et al*, 1997), a célula tronco neural - NSC (Gage, 2000) e a célula tronco cardíaca - CSC (Beltrami *et al*, 2003), bem como outras células tronco tecido-específicas, exemplificadas pelas células tronco hepáticas, musculares esqueléticas, de pele, pancreáticas, dentre outras (Blau, Brazelton e Weimann, 2001).

O estudo de células tronco pluripotentes iniciou-se na década de 1960, com trabalhos de suma relevância para a época, os quais demonstraram a pluripotencialidade de células derivadas de teratocarcinomas embrionários de camundongos (Kleinsmith e Pierce, 1964) e a possibilidade de se verificar o desenvolvimento potencial, *in vitro*, de células extraídas dos blastômeros de embriões de coelho (Edwards, 1964). Apesar de toda a expectativa eufórica nessa década, somente no ano de 1981, Evans e Kaufman conseguiram o isolamento e cultivo, sob condições ideais, de células tronco embrionárias originadas de blastocistos embrionários de camundongos, as quais puderam ser proliferadas extensiva e indefinidamente em células indiferenciadas, apresentavam formações estruturais de corpos embrióides - semelhantemente aos embriões em estágios iniciais - ou se diferenciavam em células de linhagens específicas. Anos depois, Thomson *et al* (1998) isolaram células tronco embrionárias do blastocisto de embrião humano e, em cultura, promoveram a proliferação de células indiferenciadas por quatro a cinco meses, induzindo a diferenciação, posteriormente a esse período, dessas ESCs em linhagens ectodermis, mesodermis e endodermis, além de constatarem a preservação da formação trofoblástica do embrião.

Essas imprescindíveis descobertas geraram um avanço consideravelmente relevante na pesquisa com células tronco embrionárias, além de uma promissora perspectiva científica em pesquisas biomédicas e na medicina regenerativa, pois, sabendo-se da sua

pluripotencialidade em se diferenciar em quaisquer células dos três folhetos embrionários, poder-se-ia induzir a diferenciação das ESCs em mais de duzentos tipos celulares tecido-específicos, o que representaria a provável solução para inúmeras doenças degenerativas, dentre elas, a insuficiência cardíaca, a HAS essencial, o AVE, a cegueira, o diabetes, as doenças neurodegenerativas e/ou hematológicas, etc., possivelmente pelo fato de se entender os processos envolvidos nos mecanismos de gênese dessas doenças ou se ter uma nova perspectiva quanto ao desenvolvimento de drogas mais eficazes (Murry e Keller, 2008, Thomson *et al*, 1998). Entretanto, a pesquisa com células tronco embrionárias humanas (hESC) indubitavelmente passa por, ainda hoje, constantes embates ético-religiosos, principalmente por se tratar da extração das mesmas a partir do maciço celular interno do blastocisto embrionário, cujo procedimento inativa o correto desenvolvimento do embrião, destruindo-o. Segundo os religiosos, isso acaba com uma possível vida humana, tornando-se inadmissível a utilização desse tipo de experimento.

Na tentativa de se contornar o debate entre pesquisa e religião, surgem algumas descrições na literatura sobre a reprogramação de células somáticas, a qual consiste basicamente na conversão de células somáticas (diferenciadas) em células pluripotentes (indiferenciadas), através de estratégias especificamente controladas, como a transferência nuclear somática (clonagem), na qual os conteúdos nucleares das células somáticas são introduzidos em oócitos (Wilmot *et al*, 1997), a fusão celular, onde a célula somática é fundida à célula tronco embrionária (Cowan *et al*, 2005), e a reprogramação induzida por cultura, método onde as células diferenciadas são associadas aos componentes da cultura, geralmente em meio de cultura para ESC (Jaenisch e Young, 2008). A partir dessas possibilidades de reprogramação, chegou-se à formação das células tronco pluripotentes induzidas. Em experimentos realizados por Takahashi e Yamanaka (2006), nos quais houve a introdução, em fibroblastos de camundongo, de quatro genes elegantemente selecionados a partir de um conjunto de 24 genes relacionados com as principais funções na manutenção da identidade das células tronco embrionárias: o Oct4, o Sox2, o Klf4 e o c-Myc, verificou-se a presença de características idênticas, em cultura, entre as iPSCs e as ESCs, no que diz respeito principalmente à morfologia, à proliferação, à expressão gênica, à expressão de marcadores de superfície e à formação de teratomas. Um ano após essa descoberta, a ideia base desse procedimento foi realizada em humanos, onde foi possível, através da mesma manipulação gênica retroviral, contendo os mesmos quatro genes envolvidos no trabalho anterior, reprogramar fibroblastos humanos em células de pluripotência induzida. A similaridade de

parâmetros, como morfologia, proliferação, expressão de marcadores de superfície, ou outros, entre a célula tronco pluripotente induzida humana (hiPSC) e a célula tronco embrionária humana foi também constatada, apesar de não haver uma exímia identidade, visto a comprovação de algumas diferenças entre os dois tipos celulares pluripotentes, observado em métodos específicos de análise de DNA (Takahashi *et al*, 2007). Conseqüentemente a esse achado, ter-se-á uma nova ferramenta de pesquisa científica, além de um novo modelo experimental de células pluripotentes originadas de células adultas, tornando essa metodologia, caso ratificada a sua efetividade, extremamente indispensável para o futuro entendimento e esclarecimento mecanístico, tanto das doenças incuráveis ou intratáveis, quanto dos fatores imprescindíveis à embriogênese humana.

Atualmente, uma gama considerável de trabalhos científicos são realizados e publicados utilizando, como terapia celular, as células tronco multipotentes (ou adultas), que, apesar de serem consideravelmente restritas quanto à amplitude potencial de diferenciação, têm sua extração, no organismo em questão, menos invasiva e impactante do que as hESCs. Dentre elas, as células tronco hematopoiéticas, as células estromais mesenquimais multipotentes, as células progenitoras endoteliais e as células tronco cardíacas recebem relevante atenção frente às doenças cardiovasculares, como por exemplo, o IAM ou a insuficiência cardíaca, incluindo-se os fatores de risco vinculados ao surgimento dessas morbidades, exemplificados pela hipertensão arterial essencial humana, fundamentalmente.

A identificação de células tronco multipotentes em tecidos pós-natais teve seu início nos anos 1960, quando da obtenção da primeira prova conceitual de que o sangue e/ou a medula óssea (MO) continham células que eram aptas a reestabelecer a função hematopoiética comprometida, em casos de falência de MO (Gatti *et al*, 1968, Pillow *et al*, 1966). As células tronco adultas melhor caracterizadas e mais utilizadas clinicamente são as células tronco hematopoiéticas da MO, cujo conceito é entendido pela capacidade de elas serem responsáveis pela produção de células sanguíneas, tanto da linhagem linfóide, representada preferencialmente pelos linfócitos T e B, quanto da linhagem mielóide, nas quais se agrupam os glóbulos vermelhos e brancos, além das plaquetas (Wang e Wagers, 2011).

A capacidade do organismo em coordenar satisfatoriamente um processo proliferativo de tamanha vivacidade, como a produção das células sanguíneas, deve ser enaltecida. Tal organização regula, em circunstâncias normais, o número de células produzidas e garante o estágio correto de diferenciação das células a serem liberadas na

circulação. Essa coordenação é vinculada à participação de citocinas e fatores de crescimento (Moore, 2002). A manutenção das HSCs e a regulação da sua auto-renovação e diferenciação *in vivo* depende do seu microambiente, também conhecido como local de célula tronco hematopoiética (Schofield, 1978), o qual, quando da alteração gênica dos seus ligantes de membrana, promove mudanças estruturais nesse nicho, culminando com a insuficiência da medula óssea, o que compromete a reposição celular sanguínea (Barker, 1997).

Inúmeros marcadores são utilizados para a definição de uma população de células, as quais são isoladas, marcadas e injetadas em modelos experimentais vivos (animais) para posteriores estudos. Todas as HSCs funcionalmente ativas têm um padrão de expressão de proteínas de superfície bastante peculiar, o que é comprovado pela presença ou ausência desses marcadores, como células hematopoiéticas linhagem-comprometidas (Lin), antígeno-1 de célula tronco (Sca-1), receptor do fator de célula tronco - ligante de SCF- ou proteína tirosina quinase (Kit, c-Kit ou CD117), CD34, CD38, CD45, ou outros, dependendo do modelo em estudo. São encontradas globalmente, na população da medula óssea de murinos, células que não expressam os marcadores de superfície celular geralmente presentes nas células hematopoiéticas linhagem-comprometidas (Lin⁻), bem como CD34⁻, contudo expressam altos níveis de Sca-1⁺ e c-Kit⁺, sendo, portanto, conhecidas como HSCs CD34⁻Kit⁺Sca⁺Lin⁻. Em humanos, percebe-se a positividade para CD34 (CD34⁺), um das evidências da diferença da expressão de marcadores entre as espécies, dentre algumas outras distinções existentes (Matsuzaki *et al*, 2004, Verfaillie, 2002, Wilson e Trumpp, 2006). É relevante ressaltar que a marcação, nesse modelo experimental, para CD45 normalmente é negativa, visto a relação desse padrão de expressão com linfócitos B maduros, os quais já estão diferenciados (Brown *et al*, 1994).

Concomitantemente ao advento das células tronco hematopoiéticas, surgem descrições na literatura indicando a presença de células não hematopoiéticas em fragmentos removidos da cavidade medular óssea ou compartimento estromal medular, as quais retinham um potencial osteogênico (diferenciação em componentes ósseos) e rápida aderência ao recipiente para a cultura de tecidos de vasos. Além dessas características, a sua progenia apresentava uma aparência estrutural similar aos fibroblastos, bem como a capacidade de formação de clones, conhecidas por unidades formadoras de colônias de fibroblastos (CFU-F), procedentes das células de MO, quando semeadas em cultura (Friedenstein, Chailakhjan e Lalykina, 1970, Travassoli e Crosby, 1968). Em adição, elas expressam marcadores superficiais, como CD13, CD29, CD44, CD73 e CD90, e não expressam alguns outros, como

CD14, CD15, CD33, CD34, CD45, CD79 e antígeno leucocitário humano DR (HLA-DR). Posteriormente, verificou-se, por modelos *in vitro* e por transplantes experimentais em modelos *in vivo*, que essa progenia advinda de uma única célula estromal de medula óssea detinha a capacidade de se diferenciar em osso, em cartilagem, em tecido adiposo, em músculo esquelético, em músculo liso, em miocárdio, em tendão/ligamento, em derme, em tecido fibroso, além de outros componentes teciduais (Caplan, 1994, Caplan, 2004, Friedenstein, 1990).

Tomadas essas características potenciais em conjunto, esse tipo celular foi denominado de célula tronco mesenquimal, denominação alternativa para a nomenclatura proposta por Caplan (1991) - célula tronco “estromal” ou “osteogênica”. Contudo, algumas razões julgam essa nomeação inapropriada. Primeiramente, a diferenciação dessas células, conforme anteriormente citado, em músculo esquelético ou liso, miocárdio, tendão/ligamento, etc., ainda permanece controversamente discutida, quando em estudos experimentais em modelos vivos. Segundo, durante a organogênese pré-natal, uma série de tecidos, tidos previamente como originários dessas células do estroma medular ósseo, após o nascimento, são realmente formados a partir de distintos progenitores, por exemplo, osso e músculo esquelético, e não de um ancestral comum. Em vista disso, atualmente, o termo mais aceito no mundo científico para designar essas células multipotentes extravasculares, não hematopoiéticas e nem endoteliais, e encontradas no estroma da medula óssea é o de célula estromal mesenquimal multipotente, embora as nomenclaturas de célula estromal de medula óssea ou célula tronco mesenquimal, também identificadas pela mesma sigla de MSC, serem ainda utilizadas (Bianco, Robey e Simmons, 2008, Dominici *et al*, 2006, Horwitz *et al*, 2005, Xu *et al*, 2004).

Outro tipo de célula multipotente, identificada primeiramente por célula progenitora hematopoiética CD34⁺, foi isolada de adultos humanos e foi capaz de se diferenciar, *in vitro*, em fenótipo endotelial (Asahara *et al*, 1997). Um ano depois, Shi *et al* (1998) demonstraram que essas células tronco hematopoiéticas CD34⁺, além de reterem a capacidade de diferenciação endotelial, expunham marcadores típicos de células endoteliais em suas membranas, como o fator de Von Willebrand (vWF), e também incorporavam o corante cianina de lipoproteína de baixa densidade acetilada (DiI-Ac-LDL), cuja característica é observada nesse fenótipo. Posteriormente, ao se reconhecer a expressão na membrana dessas células dos marcadores CD34, CD133 e VEGFR2, não obstante à percepção de certa inespecificidade, de forma que células mais imaturas são marcadas por CD133⁺VEGFR2⁺ e as

isoladas da parede de vasos são identificadas por CD34⁺VEGFR2⁺, definiu-se as células progenitoras endoteliais. Estas células são oriundas da medula óssea, do fígado ou do intestino e, caso recrutadas, entram na corrente sanguínea, deslocando-se para áreas lesadas, objetivando a formação de novos microvasos, com conseqüente vasculogênese, que é o surgimento de capilares através da diferenciação dessas células em um novo endotélio (Crosby *et al*, 2000, Murasawa e Asahara, 2005, Urbich e Dimmeler, 2004). Embora existam recentes avanços científicos neste assunto, os entendimentos sobre as características fenotípicas e funcionais de supostas populações de células progenitoras vasculares não são consensuais, visto não haver um marcador peculiar a essas EPCs e nem tampouco uma precisão quanto às fontes de células progenitoras endoteliais no organismo (Chao e Hirschi, 2010, Yoder, 2009).

Na literatura científica, há descrições associando algumas possibilidades etiológicas à fisiopatogênese da hipertensão primária, quando do uso experimental de alguns tipos de células tronco adultas. Alguns trabalhos identificaram alterações importantes em células progenitoras endoteliais, quando em modelos de HAS essencial (Delva *et al*, 2007, Lee *et al*, 2011, de Ciuceis *et al*, 2011), e, além disso, estudos demonstraram uma acelerada senescência das EPCs em animais e seres humanos hipertensos (Imanishi *et al*, 2005). Outros pesquisadores, em seus respectivos trabalhos experimentais, vincularam a participação indispensável de MSCs nessa fisiopatogenia hipertensiva, uma vez que elas podem se relacionar ao processo neoangiogênico da microvasculatura do organismo, o que é necessário para o bom funcionamento dos componentes vasculares e, logicamente, da circulação global do organismo (Meirelles Lda e Nardi, 2009, Oskowitz *et al*, 2011).

Dados prévios do nosso laboratório indicam um déficit funcional nas células estromais mesenquimais multipotentes de SHRs, em comparação às mesmas células dos seus respectivos animais-controle, o que pôde ser evidenciado pelos ensaios de proliferação celular e de expansão celular, em cultura, até a senescência e diferenciação osteogênica e adipogênica (Oliveira, 2010). Isso permite criar expectativas quanto às deficiências funcionais (de proliferação e de diferenciação), o que provavelmente se estenderia aos efeitos pró-angiogênicos dessas células, tornando-se, pelo menos em parte, responsável pela rarefação microvascular. Além disso, a deficiência funcional das MSCs, identificada nos animais SHRs, pode se refletir em uma modulação endotelial deficiente e, conseqüentemente, em uma disfunção endotelial, a qual é característica importante na HAS (Oliveira, 2010).

Sendo relevante a participação de células tronco adultas na reformulação estrutural e funcional dos diversos órgãos e sistemas do organismo humano e entendendo-se que, caso ocorra alterações imprescindíveis ao desempenho correto das suas funções, essas ineficiências celulares relacionam-se possivelmente ao surgimento de síndromes ou doenças ainda não elucidadas, como é o caso da hipertensão arterial sistêmica primária humana, o entendimento do profundo mecanismo intrínseco e das específicas funções de células tronco/progenitoras em modelos animais de hipertensão essencial é imprescindível no auxílio ao estudo da complexidade dessa síndrome clínica, a qual está extremamente vinculada a diversas alterações em outros órgãos do corpo humano, indicando uma nova possibilidade experimental para a decifração etiológica intrincada na HAS.

Em adição, a demonstração de déficits funcionais destas células tronco adultas de MO, as EPCs e as MSCs, no SHR e em seres humanos hipertensos suscita imediatamente a idéia de que a reposição dessas células por meio de transplante, um exemplo de terapia celular, poderia proporcionar efeitos benéficos para o tratamento da hipertensão arterial sistêmica.

Adotando a consideração de que a disfunção endotelial e a rarefação microvascular são alterações marcantes na patogenia da hipertensão (McIntyre *et al*, 1999, Touyz, 2004) e que as mesmas participam do mecanismo fisiopatológico das manifestações crônicas da hipertensão arterial (Prewitt *et al*, 1982), é plausível imaginar que o reparo desses danos, por meio da terapia celular com células tronco/progenitoras de medula óssea, possa promover benefício terapêutico na HAS.

Diversos trabalhos têm evidenciado benefícios promovidos pelo transplante de células tronco mesenquimais ou progenitoras endoteliais na hipertensão pulmonar induzida pela monocrotalina, em modelos experimentais. Além da redução da hipertensão na artéria pulmonar, pressão sistólica ventricular direita, relação peso ventricular direito/peso corporal e resistência vascular pulmonar, os mecanismos envolvidos nessa melhora parecem estar envolvidos com a melhora da vasodilatação endotélio-dependente (Baber *et al*, 2007, Kanki-Horimoto *et al*, 2006, Nagaya *et al*, 2003). Embora a fisiopatologia das duas formas de hipertensão, a pulmonar e a sistêmica, seja, em muitos aspectos, diferente, tais achados dão um grande suporte à hipótese de que o mesmo poderia acontecer na hipertensão arterial sistêmica primária (Humbert *et al*, 2004).

Na literatura, poucos trabalhos sobre o efeito terapêutico de células tronco na HAS foram encontrados. Kukharchuk *et al* (2003) descreveram um efeito anti-hipertensivo crônico (um mês) de uma única administração de células tronco embrionárias alogênicas em ratos espontaneamente hipertensos, porém sem nenhuma explicação mecanística para tal efeito. Soloviev *et al* (2010) verificaram que células tronco mesenquimais humanas são capazes de atenuar o prejuízo na função vascular promovida por irradiação em ratos, obtendo satisfatório efeito sobre os níveis de pressão arterial sistólica (PAS) nesses animais. A administração, por via endovenosa (i.v.), semanal de MSCs alogênicas (2×10^5 células/animal i.v.), a partir da terceira semana de indução de hipertensão renovascular em ratos, atenuou o desenvolvimento da hipertensão sistêmica, em dados preliminares, além de reduzir a expressão de receptores AT-1 da angiotensina II na região rostral ventro-lateral do bulbo (RVLM) dos animais hipertensos (Oliveira-Sales *et al*, 2011). Mais recentemente, dados do nosso laboratório demonstraram que a administração de uma única dose de MSCs (5×10^6 células/animal i.v.) cultivadas *in vitro* e oriundas de SHRs isogênicos foi apta a reduzir, por tempo prolongado (cerca de 15 dias), a PA sistêmica de SHRs receptores. Em adição, tal efeito anti-hipertensivo foi acompanhado por melhora da sensibilidade barorreflexa, da hipertrofia cardíaca e de alguns aspectos morfológicos renais (Loss, 2011).

Outros dados do nosso laboratório demonstraram que a administração de EPCs CD133⁺VEGFR2⁺ (4×10^4 células/animal, i.v.) extraídas de MO de SHRs machos, por meio de imunoadsorção magnética, e injetadas em SHRs fêmeas receptoras reduziu a PA em cerca de 15-20 mmHg (nos animais tratados com células comparados aos animais controle) por cerca de duas semanas consecutivas, sendo acompanhada por concomitante redução da hipertrofia cardíaca. Como os SHRs são animais isogênicos, tal redução da PA observada em ambos os resultados com MSCs e EPCs CD133⁺VEGFR2⁺, muito provavelmente, não pode ser atribuída a uma eventual reação de rejeição imunológica e ativação de uma resposta inflamatória sistêmica (Dias da Silva *et al*, 2005).

Mais recentemente, Nakajima *et al* (2012) observaram que o transplante de MO foi capaz de restaurar a perda da função endotelial microvascular em camundongos hipertensos (condição adquirida ao prévio “knockout” da expressão do gene da enzima sintase de óxido nítrico - eNOS), o que poderia sugerir que EPCs, ou mesmo HSCs, poderiam ser importantes no processo de restauração da disfunção endotelial e melhora da rarefação microvascular, importante redutor da pressão arterial. De fato, estudos têm demonstrado que células tronco hematopoiéticas são capazes de se diferenciarem em células endoteliais

vasculares e células musculares lisas *in vitro* e *in vivo* para a formação de novos vasos, indicando que células tronco adultas podem participar na vasculogênese pós-natal e angiogênese (Hamano *et al*, 2000, Zulli *et al*, 2005).

Diante do aparente potencial terapêutico descrito para as três populações de células tronco/progenitoras obtidas de medula óssea na reparação da rarefação vascular e/ou disfunção endotelial, com possível redução da pressão arterial, algumas perguntas poderiam ser formuladas: considerando que os três tipos de células tronco/progenitoras acima citados são encontrados na fração de células mononucleares da medula óssea, qual seria o efeito do transplante de tal fração sobre a pressão arterial de animais SHRs? Dada a relativa facilidade de processamento e separação desta fração de células mononucleares de medula óssea, via centrifugação em gradiente de densidade, não seria esta uma estratégia de transplante mais factível, econômica e segura, imaginando um eventual cenário de uso clínico dessas células para o tratamento da HAS? Em outras palavras, nossa hipótese é de que a administração dessas células tronco/progenitoras presentes na fração mononuclear da medula óssea, sem qualquer estratégia adicional de cultivo ou purificação, poderia trazer significativos benefícios terapêuticos para a HAS. Em adição, seria o transplante de células mononucleares de medula óssea retiradas de animais normotensos WKY (controles naturais dos SHRs, sem os defeitos genéticos implicados na patogênese da hipertensão arterial) tão ou mais eficientes que o transplante isogênico, ainda que as células de WKY sejam alogênicas, em relação aos SHRs?

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente trabalho é determinar os efeitos terapêuticos do transplante de células mononucleares, isoladas e extraídas de medula óssea, sobre a hipertensão arterial sistêmica em ratos espontaneamente hipertensos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos de células mononucleares isogênicas, extraídas de medula óssea de animais SHRs machos jovens e adultos, e de células mononucleares alogênicas, oriundas de ratos WKY machos adultos, processadas por meio de centrifugação em gradiente de densidade diferencial em solução de Ficoll-Paque® e transplantadas em ratas SHR adultas receptoras, quanto:

- à pressão arterial sistêmica,
- à variabilidade da pressão arterial,
- ao peso cardíaco,
- à histologia renal.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 45 ratos espontaneamente hipertensos (SHR), 04 machos doadores e 39 fêmeas receptoras, com idade inicial de 16-20 semanas, e 02 machos doadores, com idade inicial de 04 semanas. Além desses, 02 ratos Wistar-Kyoto (WKY) machos normotensos doadores, com idade inicial de 16-20 semanas, também foram utilizados. Todos esses animais foram fornecidos pelo biotério da Disciplina de Fisiologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), onde foram mantidos em condições controladas e estáveis em biotério climatizado (temperatura 22° C, umidade de 40-70% e ciclo claro-escuro de 12/12horas) onde tiveram livre acesso à água e ração (Nubilav CR1, Nuvital S.A., Curitiba, PR). Todos os procedimentos experimentais empregados no presente trabalho estiveram de acordo com o Guide for the Care and Use of Laboratory Animals publicado pelo the US National Institutes of Health (NIH publication No. 85-23, revised 1996) e com as recomendações do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFTM. Nesse mesmo comitê, este trabalho foi protocolado e aprovado (Protocolo nº 100).

3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Ratas SHR fêmeas foram divididas em 05 grupos experimentais, de acordo com o tipo de transplante recebido:

3.2.1 Transplante Isogênico

- a) grupo controle (CON, administração endovenosa de veículo contendo 1mL de PBS/EDTA, n=10),
- b) grupo transplante de células mononucleares de medula óssea adulta (TMN-Ad, administração endovenosa de um volume de 1 mL contendo uma concentração final de 5×10^6 células mononucleares isoladas da medula óssea de 04 SHRs machos adultos de 16 semanas de idade, n=10).
- c) grupo transplante de células mononucleares de medula óssea jovem (TMN-Jv, administração endovenosa de um volume de 1 mL contendo uma concentração final de 5×10^6 células mononucleares isoladas da medula óssea de 02 SHRs machos jovens de 04 semanas de idade, n=7).

3.2.2 Transplante Alogênico

- d) grupo controle (CON, administração endovenosa de veículo contendo 1mL de PBS/EDTA, n=5),
- e) grupo transplante de células mononucleares de medula óssea adulta de ratos WKY normotensos (TMN-WKY, administração endovenosa de um volume de 1 mL contendo uma concentração final de 5×10^6 células mononucleares isoladas da medula óssea de 02 ratos WKY machos adultos de 16 semanas de idade, n=7).

3.3 ISOLAMENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA

Ratos SHR machos, isogênicos, de 16 semanas de idade (TMN-Ad, n=4) ou de 04 semanas de idade (TMN-Jv, n=2), ou ratos WKY normotensos machos de 16 semanas de idade (TMN-WKY, n=2) foram sacrificados através de uma overdose por anestésico pentobarbital sódico, 100 mg/kg, i.p.. Logo a seguir, os ossos (fêmur, tíbia e úmero) retirados dos animais foram embebidos em PBS/EDTA (pH=7,2) e resfriados, em temperatura de 4-8°C, até seu posterior processamento.

Utilizando-se de um ambiente asséptico de cabine de fluxo laminar vertical, removeu-se as epífises ósseas, colocou-se as metáfises dentro de tubos hematológicos plásticos, os quais apresentavam um orifício na extremidade inferior, introduziu-se este conjunto em um tubo falcon de 15mL e centrifugou-se por 3 minutos a 400g. Posteriormente, a medula óssea total foi ressuspensa em PBS/EDTA (pH=7,2) e filtrada em filtro de nylon especial com poros de 70 μ m (Cell Strainer, BDBiosciences, USA), a fim de se remover os agregados celulares e os coágulos. Após centrifugação (200g por 10 minutos a 4-8°C) e remoção do sobrenadante, o sedimento de células de medula óssea foi ressuspensa novamente em solução de PBS/EDTA. Em seguida, 35 mL da suspensão de medula óssea em PBS/EDTA foram adicionadas sobre 15 mL de solução de Ficoll-Paque® (densidade de 1.077) em um tubo cônico de 50 mL, tomando-se o extremo cuidado de não permitir a mistura dos dois meios líquidos. Em seguida, uma centrifugação a 400g por 40 minutos a 20° C foi realizada em uma centrífuga refrigerada (Rotanta 460R, Hettich Co.).

Após a aspiração da camada líquida superior, a interfase opalescente, contendo as células mononucleares e plaquetas, foi transferida para um segundo tubo cônico de 50 mL, misturada a PBS/EDTA e centrifugada a 300g por 10 minutos a 20° C, seguido da eliminação

cuidadosa do sobrenadante. Com o objetivo de se remover as plaquetas, o sedimento de células foi ressuspensionado em 50 mL de PBS/EDTA e centrifugado a 200g por 10 minutos a 20° C, seguido da eliminação cuidadosa do sobrenadante, o qual continha a maior parte das plaquetas. Após a repetição dessa última etapa por mais uma vez, as células mononucleares foram suspensas em meio líquido PBS gelado (4-8°C) misturado a 2 mM de EDTA.

Em seguida, a suspensão de células mononucleares de medula óssea foram marcadas com o corante fluorescente celltracker CM-DiI (Molecular Probes, Inc.) pela incubação da suspensão das células com o corante numa concentração final de corante de 4 µM/L por 5 minutos a 37°C em banho-maria, seguido de 15 minutos a 4° C. O celltracker CM-DiI é um corante fluorescente lipossolúvel baseado no anel da carbocianina que acaba se ligando permanentemente à membrana plasmática das células, sem aparente modificação de suas propriedades funcionais (Aicher *et al*, 2003, Yoon *et al*, 2005), emitindo uma coloração laranja-avermelhada à microscopia de fluorescência, o que a faz um marcador interessante para monitorização e localização das células marcadas no organismo receptor. Após o procedimento de marcação, as células foram lavadas e ressuspensas duas vezes em meio PBS/EDTA, para se remover o celltracker CM-DiI não ligado.

Posteriormente à marcação das células, as mesmas foram contadas utilizando-se um câmara de Neubauer. Em adição, avaliou-se a viabilidade das células pela coloração das mesmas com azul de Tripán 0,4%. Somente suspensões com mais de 90% de viabilidade foram utilizadas. Após a contagem e avaliação da viabilidade celular, a suspensão foi ajustada para uma concentração final de 5×10^6 células mononucleares/mL e, posteriormente a um procedimento anestésico com pentobarbital sódico, 100 mg/kg, i.p., foi injetado um total de 5×10^6 células mononucleares/animal (1 mL/animal), através da veia jugular, nas 24 ratas SHR fêmeas receptoras (com idade entre 16-20 semanas) dos três grupos, TMN-Ad (n=10), TMN-Jv (n=7) e TMN-WKY (n=7). O grupo CON (n=10 para o transplante isogênico e n=5 para o transplante alogênico) recebeu o mesmo volume de PBS/EDTA (1 mL veículo/animal).

3.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

As SHRs fêmeas tiveram sua pressão arterial monitorada diariamente ou a cada dois dias, por até duas semanas, após o transplante de células mononucleares (grupos TMN-Ad, TMN-Jv, TMN-WKY) ou de veículo (grupo CON). Ao longo do período de observação, os animais foram pesados em dias alternados. A pressão arterial caudal e frequência cardíaca

foram avaliadas diariamente ou a cada dois dias, empregando-se o método de oclusão da artéria caudal, com a utilização de um sistema automatizado (Digital Blood Pressure Meter LE-5000, Letica S.I., Barcelona, Espanha), o qual permite uma medida indireta da pressão arterial sistólica (PAS) e frequência cardíaca (FC), baseada no ponto de surgimento de pulsação, após a liberação da oclusão da artéria caudal (Kurtz *et al*, 2005).

Ao final das duas semanas de observação, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal (pentobarbital sódico, 40 mg/kg, i.p.) e submetidos à implantação de cateteres na artéria e veia femorais direitas para a possibilidade de medida direta de pressão arterial e administração de drogas, respectivamente. As extremidades livres dos cateteres foram exteriorizadas no dorso dos animais e os mesmos foram alojados em gaiolas individuais para a recuperação anestésica. Após 24-48 horas da recuperação cirúrgica, todos os animais foram submetidos a um registro direto de pressão arterial por uma hora, através da conexão do cateter arterial a um transdutor de pressão (modelo P23Gb Statham, Hato Rey, Puerto Rico) ligado a um amplificador (modelo 8805D, Hewlett Packard), cuja função é enviar o sinal de pressão arterial amostrado a 1000Hz a um computador pessoal (IBM/PC) equipado com um conversor analógico-digital de 12-bit de resolução (modelo CAD12/36, Lynx Tecnologia Eletrônica, São Paulo, SP, Brazil). O sinal de pressão arterial pulsátil foi registrado por uma hora em ambiente silencioso, com o animal em livre movimentação. Esse mesmo sinal foi utilizado posteriormente para a medida dos valores basais de pressão arterial e avaliação dos parâmetros de variabilidade cardiovascular.

Ao final do protocolo experimental, amostras de plasma foram coletadas para posterior análise e os animais foram sacrificados, através de uma overdose por anestésico pentobarbital sódico, 100 mg/kg, i.p.). Coração, pulmões, rins, fígado, baço, aorta e músculos (gastrocnêmio e vasto lateral) foram removidos. Fragmentos dos órgãos foram fixados em formaldeído a 10% tamponado, para posterior processamento histológico, enquanto outros fragmentos foram congelados a -80°C, até ulterior processamento bioquímico e histológico. O coração foi adicionalmente pesado, previamente à fixação e congelamento a -80°C, objetivando-se estimar o peso cardíaco relativo (peso cardíaco/peso corporal), um parâmetro de hipertrofia cardíaca decorrente da HAS.

3.5 ANÁLISE DOS DADOS

Os valores basais médios de FC e de PA sistólica, diastólica e média foram calculados para o período basal de uma hora de registro.

Para o estudo da variabilidade cardiovascular, o sinal de PA pulsátil, continuamente registrado ao longo do protocolo, foi processado por software (Software PRE-24, gentilmente cedido por Eng. Dr. Alberto Porta, Universidade de Milão, Itália), de modo a gerar séries temporais batimento-a-batimento de intervalo de pulso (IP) e pressão arterial sistólica (PAS). A variância dos valores de IP e PAS, dentro do período basal de uma hora, foi tomada como um índice de variabilidade no domínio do tempo.

A variabilidade do IP e da PAS foi também avaliada no domínio da frequência, empregando-se o método de análise espectral autorregressivo. Os procedimentos teóricos e analíticos estão completamente descritos em publicações prévias (Malliani *et al*, 1991, Task Force, 1996). Brevemente, séries temporais batimento a batimento de IP e PAS, coletados durante os 60 minutos de registro basal, foram divididas em segmentos seriados de 300 batimentos, sendo que todo segmento sucessivo sobrepunha-se em 50% (150 batimentos) no segmento anterior (método de Welch). Usando os segmentos estacionários das séries temporais, parâmetros autorregressivos foram estimados através do método de Levinson-Durbin e a ordem do modelo foi escolhida, de acordo com o critério de Akaike. Em seguida, sobre cada segmento estacionário individual de 300 batimentos, a decomposição espectral foi realizada mediante uso de software apropriado (software, LA-24, gentilmente cedido pelo engenheiro Dr. Alberto Porta, Universidade de Milão, Itália). Este procedimento permite automaticamente quantificar a frequência central e a potência de cada componente espectral relevantes em unidades absolutas, bem como em unidades normalizadas. O procedimento de normalização, aplicado apenas à variabilidade do IP, foi realizado pela divisão da potência do componente de baixa frequência (low frequency – LF; 0,20-0,80 Hz), ou de alta frequência (high frequency – HF; 0,80 –2,50 Hz), pela potência espectral total, da qual se subtrai a potência da banda de muito baixa frequência (very low frequency – VLF, 0,01-0,20 Hz), multiplicando-se o resultado por 100 (Malliani *et al*, 1991, Rubini *et al*, 1993, Task Force, 1996). Os parâmetros espectrais obtidos para cada segmento estacionário individual de 300 batimentos foram mediados e valores médios resultantes de 60 minutos de registro foram obtidos para cada animal.

As séries temporais de IP e PAS foram adicionalmente submetidas à análise

espectral cruzada por meio de modelamento autorregressivo, a fim de se calcular a sensibilidade barorreflexa espontânea, utilizando-se as variações naturais da PAS, como sinal de entrada da alça barorreflexa, e as oscilações espontâneas do IP, como sinal de saída. Dois parâmetros foram quantificados pela análise espectral cruzada: a coerência e o desvio de fase. A coerência entre os sinais, a qual pode variar de 0 a 1 unidade, quantifica o grau de dependência linear entre os dois sinais. Um valor de coerência maior que 0,5 é considerado estatisticamente significativo. O desvio de fase (expresso em radianos), por sua vez, indica o retardo ou o avanço de tempo da entrada (PAS), em relação à saída (IP), e no contexto do controle barorreflexo do coração, somente faixas de frequência com desvio de fase negativa foram consideradas para o cálculo da sensibilidade barorreflexa. Se as duas condições acima estiverem presentes (coerência > 0,5 e desvio de fase < 0), o que em geral acontece na faixa de frequência LF, a sensibilidade barorreflexa cardíaca espontânea é calculada como o alfa-índice, ou seja, a raiz quadrada da razão entre o LF_{IP} e o LF_{PAS} , expresso em ms/mmHg (Pagani *et al*, 1988).

O peso cardíaco relativo foi calculado para cada animal pela divisão do peso cardíaco (em miligrama) pelo peso corporal (em grama), no momento do sacrifício do animal.

3.6 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Cortes histológicos dos rins fixados em formaldeído foram obtidos por técnica histológica padrão, confeccionando-se lâminas dos rins dos animais SHRs submetidos ao transplante de células mononucleares (isogênicas ou alogênicas) ou controle. Os cortes dos rins foram frontais, permitindo-se assim que fossem observadas tanto a região cortical, quanto a medular. Em lâmina corada com picosirius red, utilizando-se um microscópio de luz convencional (Carl Zeiss Inc.), com aumento de 5x, foram contados todos os glomérulos em 10 campos aleatórios não sobrepostos da região cortical. A densidade de glomérulos por milímetros quadrados foi quantificada, dividindo-se o número total de glomérulos contados pela área cortical total analisada.

Fragments congelados do baço, do coração, dos pulmões e dos rins foram seccionados em cortes de 5 μ m e processados para microscopia de fluorescência, na tentativa de se identificar a presença eventual de células marcadas pelo celltracker CM-DiI. Foram avaliados campos histológicos aleatórios em microscópio de fluorescência (Axio-Observer Z1, Carl Zeiss, Inc.) com filtro apropriado para fluorescência vermelha. Imagens foram

capturadas por câmera digital de alta resolução acoplada ao microscópio de fluorescência (Carl Zeiss, Inc.) e digitalizada em um microcomputador (IBM/PC). A presença de coloração avermelhada em campos aleatórios de alta resolução (200x ou 400x) foi tomada como confirmação da presença de células transplantadas nos órgãos dos animais. No baço das fêmeas SHR receptoras das células alogênicas provenientes de animais WKY, contra-coloração nuclear com DAPI foi também efetuada.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os parâmetros coletados foram expressos como média (\pm erro padrão). Os dados referentes à medida indireta de pressão arterial e frequência cardíaca por meio de oclusão da artéria caudal foram analisados empregando-se ANOVA “two way” para medidas repetidas, seguido de teste de comparações múltiplas de Tukey. Os demais dados foram comparados entre os grupos empregando-se o teste de ANOVA “one way”, seguido de teste de comparações múltiplas de Tukey, ou o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn, de acordo com os requisitos estatísticos de normalidade da distribuição e homogeneidade da variância. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 TRANSPLANTE ISOGÊNICO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA

Os efeitos do transplante isogênico de células mononucleares de medula óssea, adultas (TMN-Ad) ou jovens (TMN-Jv), sobre a evolução da pressão arterial sistólica podem ser observados na figura 1. Note que, para ambos os transplantes, uma redução significativa da pressão arterial na artéria caudal inicia-se a partir do quarto dia, atingindo os valores mais baixos (aproximadamente 20-25 mmHg) de queda em 01 semana, assim permanecendo até o 14º dia, quando a observação foi interrompida para a canulação dos animais e medida direta da pressão arterial.

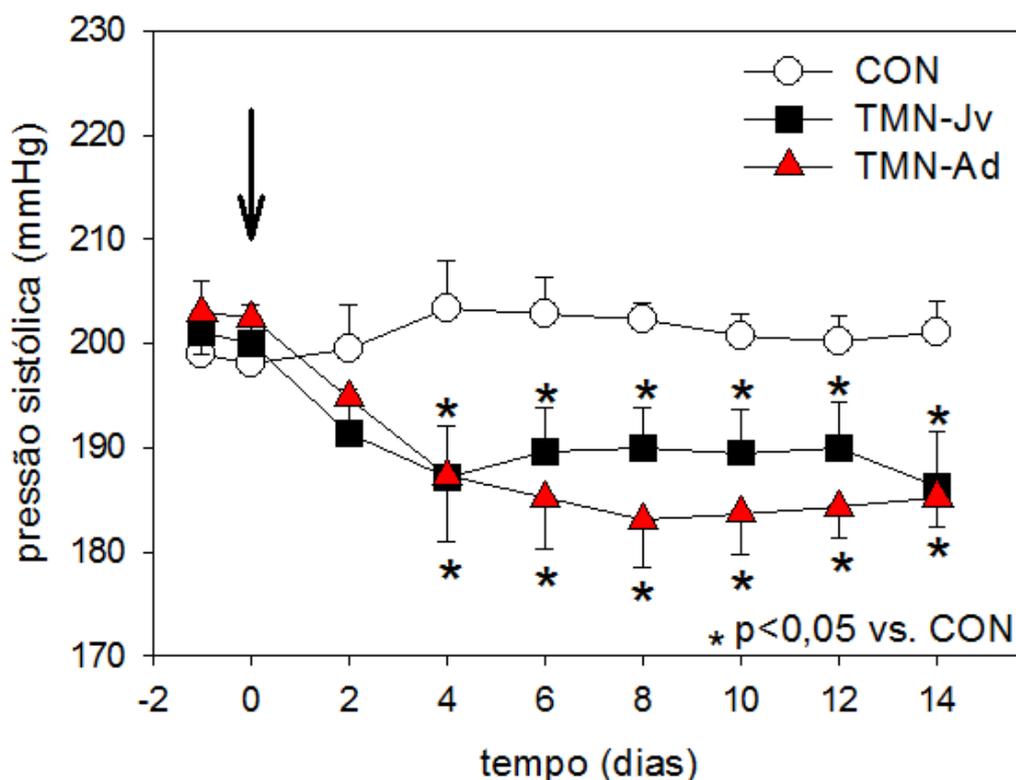


Figura 1: Efeitos do transplante isogênico de células mononucleares de medula óssea. Valores médios (\pm erro padrão) das pressões arteriais sistólicas medidas pela artéria caudal a cada dois dias, até o décimo quarto dia de observação, após o transplante isogênico de células mononucleares adultas (TMN-Ad) ou jovens (TMN-Jv). Note a queda da pressão arterial em ambos os grupos TMN-Ad e TMN-JV, após o quarto dia, quando comparado ao grupo controle (CON). (* $P < 0,05$ versus grupo CON).

A tabela 1 mostra os valores hemodinâmicos basais coletados nos três grupos experimentais, ao final dos 14 dias de observação, por meio de registro direto da pressão arterial, durante 01 hora, estando o animal em estado consciente e acordado.

Tabela 1: Efeitos do transplante isogênico de células mononucleares de medula óssea. Valores médios (\pm erro padrão) das pressões arteriais sistólica (PAS), média (PAM) e diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) dos grupos controle (CON) e tratados com células mononucleares de medula óssea adulta (TMN-Ad) ou jovem (TMN-Jv), coletados durante um período de registro basal de 01 hora.

	CON (n=10)	TMN-Ad (n=10)	TMN-Jv (n=7)
PAS (mmHg)	203,2 \pm 4,6	172,5 \pm 4,6*	171,4 \pm 3,3*
PAM (mmHg)	162,6 \pm 4,5	137,2 \pm 3,8*	135,6 \pm 3,5*
PAD (mmHg)	142,4 \pm 4,6	119,6 \pm 3,7*	122,1 \pm 3,5*
FC (bpm)	425,7 \pm 14,6	406,2 \pm 8,5	407,5 \pm 8,1

(* P <0,01 versus grupo CON)

Tanto para os animais do grupo TMN-Ad, quanto do grupo TMN-Jv, a queda de pressão arterial registrada diretamente foi de aproximadamente 25 mmHg, se comparada ao grupo controle, ratificando os dados obtidos pela medida de pressão indireta na artéria caudal.

A partir dos sinais de pressão arterial pulsátil coletados diretamente, séries temporais de intervalo de pulso e pressão arterial sistólica foram processadas e submetidas à análise de variabilidade cardiovascular. A tabela 2 mostra os valores médios dos parâmetros temporais e espectrais da variabilidade do intervalo de pulso, o qual foi realizado nos animais dos grupos TMN-Ad e TMN-Jv, e comparado aos animais controles. Pode-se verificar que nenhuma modificação foi observada na variabilidade da frequência cardíaca nos animais transplantados (figura 2).

Tabela 2: Efeitos do transplante isogênico de células mononucleares de medula óssea. Valores médios (\pm erro padrão) dos parâmetros temporais (variância) e espectrais da variabilidade do intervalo de pulso dos animais do grupo controle (CON) e dos animais tratados com transplante de células mononucleares de medula óssea adulta (TMN-Ad) ou jovem (TMN-Jv), coletados durante um período de registro basal de 01 hora.

	CON (n=10)	TMN-Ad (n=10)	TMN-Jv (n=7)
IP (ms)	142,5 \pm 4,9	147,7 \pm 4,5	147,2 \pm 4,3
Variância (ms ²)	12,5 \pm 1,4	10,4 \pm 2,5	13,7 \pm 5,2
VLF (ms ²)	8,4 \pm 1,0	6,5 \pm 2,4	7,9 \pm 2,6
LF (ms ²)	1,0 \pm 0,3	0,9 \pm 0,4	1,3 \pm 0,7
LF (u.n)	19,3 \pm 3,0	18,4 \pm 4,2	27,2 \pm 7,2
HF (ms ²)	2,6 \pm 0,3	3,0 \pm 0,8	2,5 \pm 0,9
HF (u.n.)	66,3 \pm 2,6	70,1 \pm 3,9	67,5 \pm 7,8
Razão LF/HF	0,43 \pm 0,08	0,33 \pm 0,08	0,38 \pm 0,09

IP (intervalo de pulso), VLF (componente de muito baixa frequência), LF (componente de baixa frequência), HF (componente de alta frequência), ms (milissegundos), u.n. (unidades normalizadas).

Por outro lado, em relação à variabilidade da pressão arterial sistólica, alterações significativas foram verificadas (tabela 3 e figura 2). Uma significativa redução da variância e dos componentes VLF e LF, bem como uma elevação do componente HF, foram observadas. Tais mudanças associam-se também a uma significativa redução da razão LF/HF da variabilidade da pressão arterial (tabela 3 e figura 2). Nenhuma diferença significativa foi notada entre os grupos TMN-Ad e TMN-Jv.

Tabela 3: Efeitos do transplante isogênico de células mononucleares de medula óssea. Valores médios (\pm erro padrão) dos parâmetros temporais (variância) e espectrais da variabilidade de pressão arterial sistólica (PAS) dos animais do grupo controle (CON) e dos animais tratados com transplante de células mononucleares de medula óssea adulta (TMN-Ad) ou jovem (TMN-Jv), coletados durante um período de registro basal de 01 hora.

	CON (n=10)	TMN-Ad (n=10)	TMN-Jv (n=7)
PAS (mmHg)	203,2 \pm 4,6	172,5 \pm 4,6*	171,4 \pm 3,3*
Variância (mmHg ²)	48,8 \pm 6,1	30,1 \pm 3,1*	29,0 \pm 3,2*
VLF (mmHg ²)	17,8 \pm 2,6	7,1 \pm 1,0*	6,7 \pm 1,5*
LF (mmHg ²)	25,3 \pm 3,5	14,1 \pm 3,0*	12,5 \pm 3,3*
HF (mmHg ²)	5,1 \pm 0,7	10,5 \pm 2,4*	11,1 \pm 2,2*
Razão LF/HF	6,9 \pm 0,6	1,51 \pm 0,26*	1,34 \pm 0,46*

PAS (pressão arterial sistólica), VLF (componente de muito baixa frequência), LF (componente de baixa frequência), HF (componente de alta frequência), ms (milissegundos), u.n. (unidades normalizadas). (* $p < 0,05$ versus grupo CON).

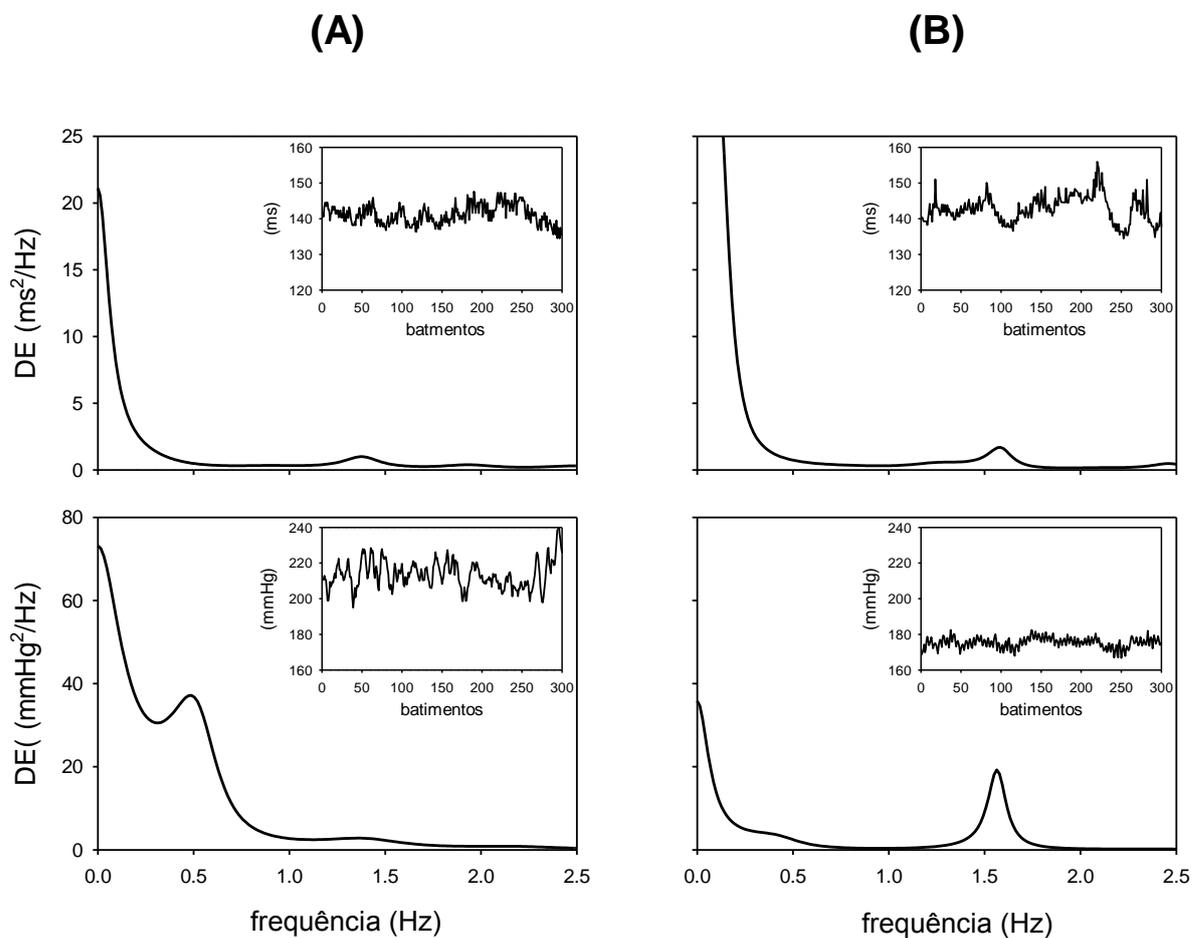


Figura 2: Efeitos do transplante isogênico de células mononucleares de medula óssea. Traçados representativos das séries temporais (inserto) e densidade espectral de potência da variabilidade do intervalo de pulso (painel acima) e da pressão arterial sistólica (painel abaixo) de um animal do grupo controle (A) e de um animal do grupo que recebeu células mononucleares de medula óssea adulta (B).

O cálculo do alfa-índice, um marcador de sensibilidade barorreflexa cardíaca espontânea, não mostrou diferença entre os grupos CON, TMN-Ad e TMN-Jv (tabela 4). Pode-se verificar também que a coerência e o desvio de fase entre a variabilidade do intervalo de pulso e da pressão arterial sistólica na faixa de LF não se mostraram diferentes entre os três grupos.

Tabela 4: Efeitos do transplante isogênico de células mononucleares de medula óssea. Valores médios (\pm erro padrão) da coerência, do desvio de fase e do alfa-índice estimados a partir da análise espectral cruzada entre as oscilações na faixa LF da variabilidade do intervalo de pulso e da pressão arterial sistólica dos animais do grupo controle (CON) e dos animais tratados com transplante de células mononucleares de medula óssea adulta (TMN-Ad) ou jovem (TMN-Jv), coletados durante um período de registro basal de 01 hora.

	CON (n=10)	TMN-Ad (n=10)	TMN-Jv (n=7)
Coerência	0,978 \pm 0,010	0,955 \pm 0,015	0,934 \pm 0,012
Desvio de Fase (π rads)	-0,54 \pm 0,13	-0,67 \pm 0,23	-0,65 \pm 0,18
Alfa-índice (ms/mmHg)	0,20 \pm 0,02	0,25 \pm 0,04	0,29 \pm 0,09

π rads. (π radianos), ms (milissegundos), mmHg (milímetros de mercúrio)

O peso cardíaco absoluto (em gramas) e o relativo (em mg/g) (figura 3) foi significativamente menor nos animais dos grupos TMN-Ad e TMN-Jv, quando comparado ao grupo CON (respectivamente, $0,85 \pm 0,04g$ e $4,27 \pm 0,18mg/g$ e $0,81 \pm 0,05g$ e $4,05 \pm 0,19mg/g$ versus $0,98 \pm 0,03g$ e $4,99 \pm 0,17mg/g$ no grupo CON, $p < 0,05$). Não houve diferença significativa para o peso corporal final dos animais ($199,5 \pm 7,2g$ no grupo TMN-Ad, $200,2 \pm 6,5g$ no grupo TMN-Jv versus $196,4 \pm 3,8g$ no grupo CON, não significativo).

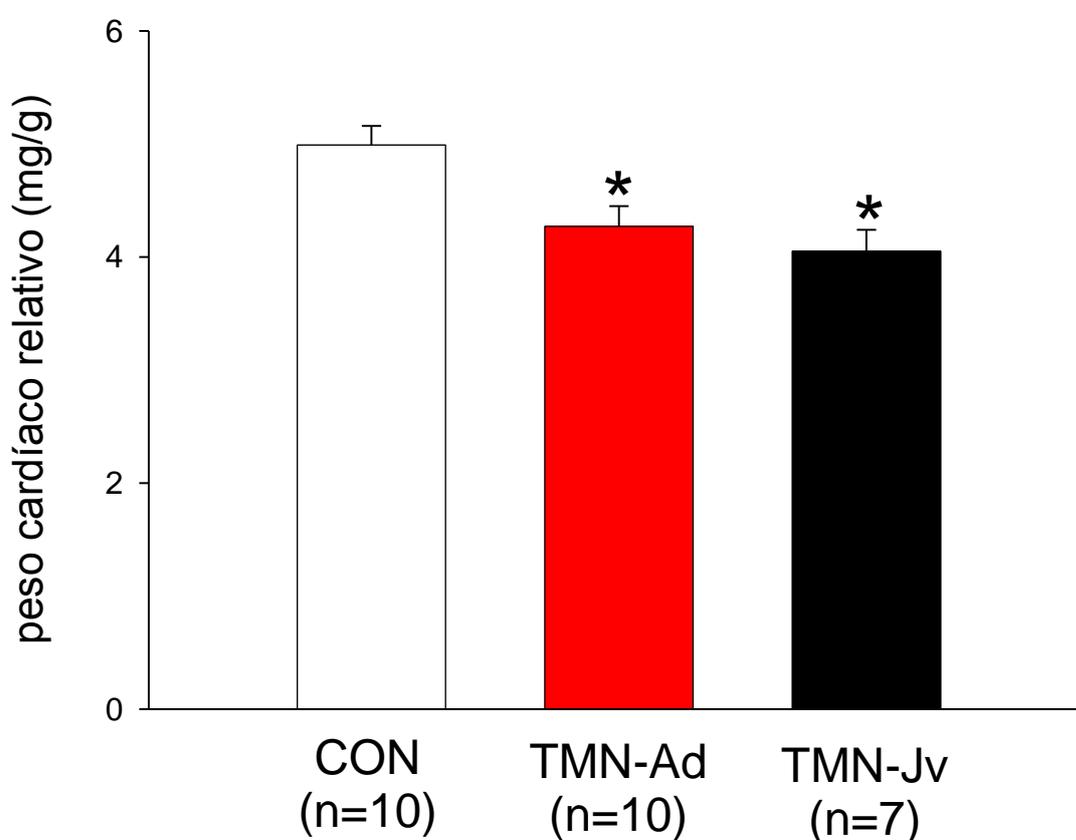


Figura 3: Efeitos do transplante isogênico de células mononucleares de medula óssea. Valores médios (\pm erro padrão) do peso cardíaco relativo (em mg/g) nos animais do grupo TMN-Ad, TMN-Jv e CON. (* $p < 0,05$ versus grupo CON).

A densidade glomerular renal (glomérulos/mm²) não foram diferentes entre os três grupos experimentais (tabela 5 e figura 4).

Tabela 5: Efeitos do transplante isogênico de células mononucleares de medula óssea. Valores médios (\pm erro padrão) da densidade glomerular (em glomérulos/mm²) nos animais do grupo controle (CON) e nos animais tratados com transplante de células mononucleares de medula óssea adulta (TMN-Ad) ou jovem (TMN-Jv).

	CON (n=5)	TMN-Ad (n=5)	TMN-Jv (n=5)
Densidade glomerular (glom./mm ²)	4,9 \pm 0,5	5,2 \pm 0,8	5,1 \pm 0,9

mm² (milímetros quadrados)

O exame histológico ao microscópio de fluorescência evidenciou a presença de marcação avermelhada nos cortes de rins dos animais que receberam células mononucleares de medula óssea marcadas com celltracker CM-DiI (figura 5). Entretanto, o número de marcações encontradas foi sempre pequeno, em geral uma ou duas marcações por campo examinado. Eventualmente, foram encontradas marcações na camada endotelial de pequenas artérias renais (figura 5).

Por outro lado, o baço dos animais que receberam células mononucleares de medula óssea apresentou um grande número de células marcadas (figura 6). Marcações raras foram encontradas nos outros órgãos analisados.

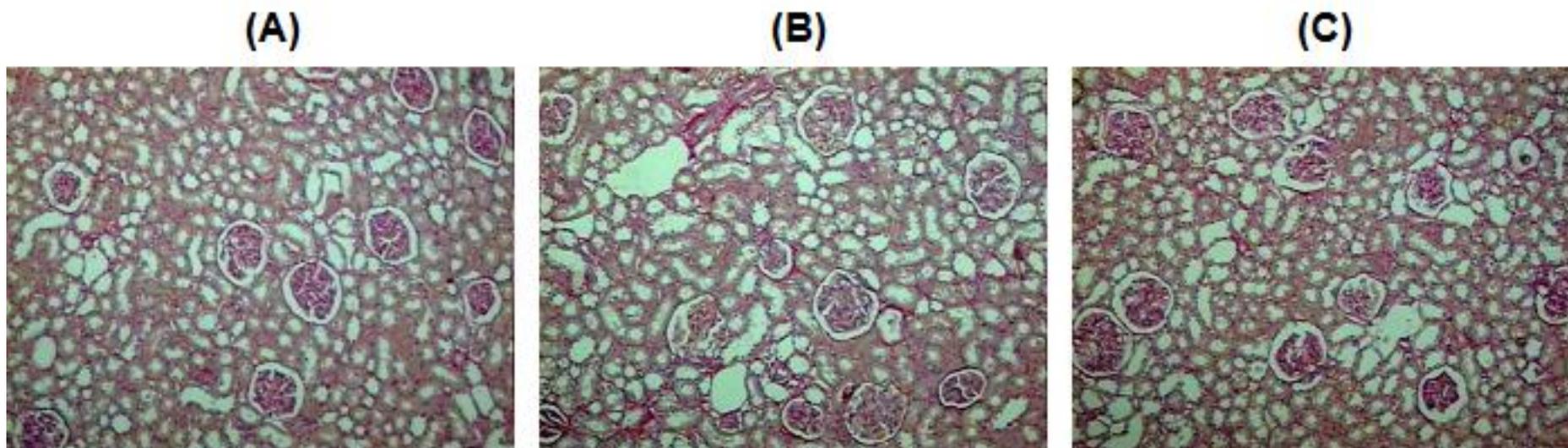


Figura 4: Efeitos do transplante isogênico de células mononucleares de medula óssea. Cortes histológicos com 5 μm de espessura de rins, corados com picosirius red, de animais representativos do grupo controle (Painel A) e dos grupos que receberam células mononucleares de medula óssea jovem (Painel B) ou adulta (Painel C). Aumento de 50X.

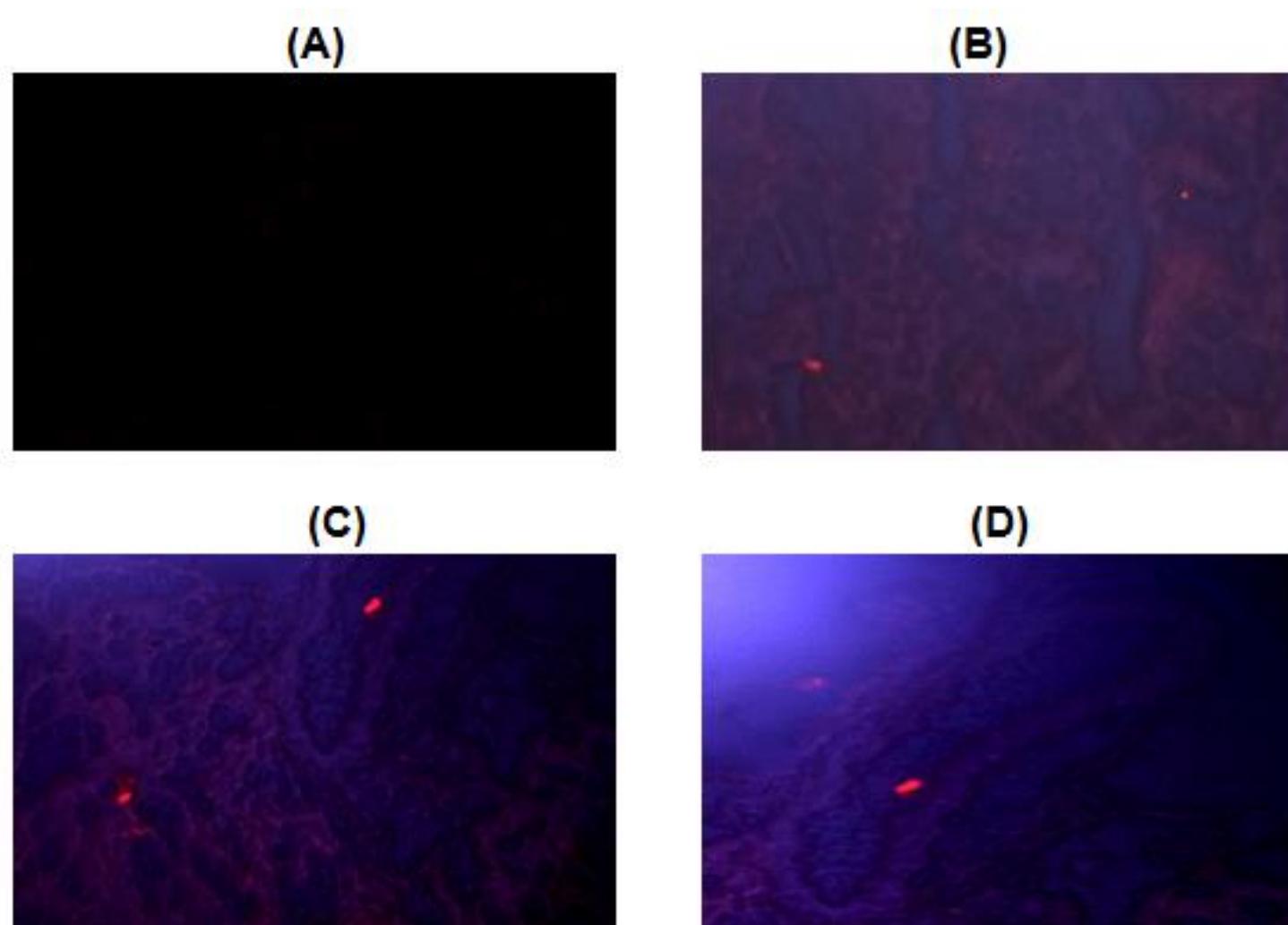


Figura 5: Efeitos do transplante isogênico de células mononucleares de medula óssea. Cortes histológicos com 5 μ m de espessura de rim de um animal representativo do grupo controle (painel A – 200x) e dos grupos que receberam células mononucleares de medula óssea jovem (painel B – 200x) ou adulta (Painel C – 200x e Painel D – 400x), marcadas com celltracker CM-DiI.

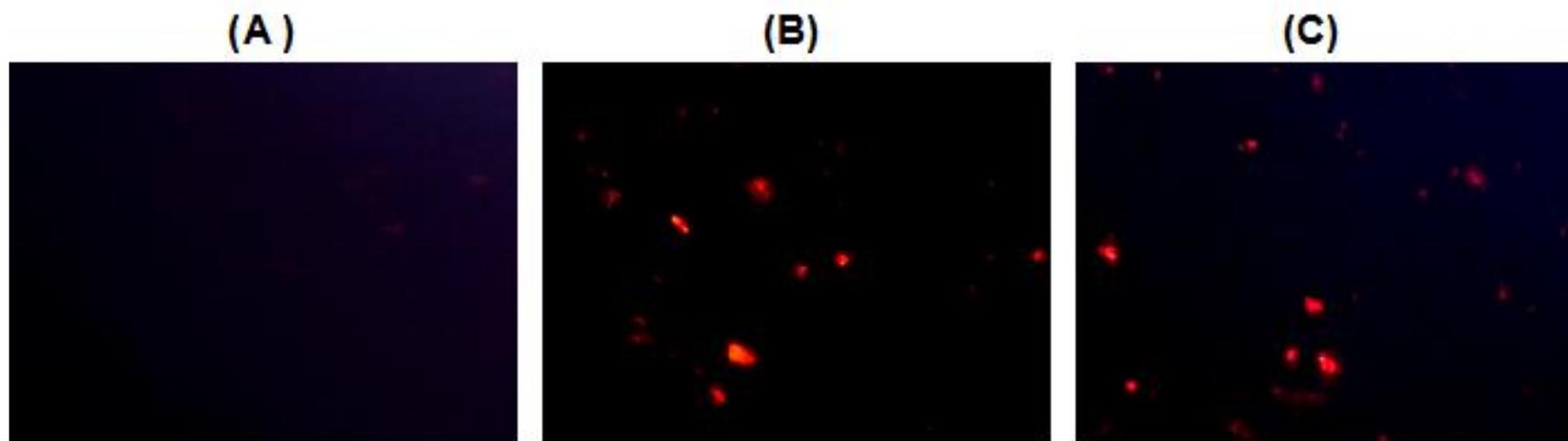


Figura 6: Efeitos do transplante isogênico de células mononucleares de medula óssea. Cortes histológicos com 5 μm de espessura de baço de um animal representativo do grupo que recebeu veículo (Painel A) e dos grupos que receberam células mononucleares de medula óssea jovem (Painel B) ou adulta (Painel C), marcadas com celltracker CM-DiI (B). Aumento de 200X.

4.2 TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA

Os efeitos do transplante alogênico de células mononucleares de medula óssea, oriundas de ratos WKY normotensos adultos (TMN-WKY), sobre a evolução da pressão arterial sistólica podem ser observados na figura 7. Perceba que, após o transplante, apesar de uma leve queda inicial por volta do terceiro dia, nenhuma redução persistente e significativa da pressão arterial na artéria caudal foi observada até 11º dia, quando a observação foi interrompida para a canulação dos animais e medida direta da pressão arterial.

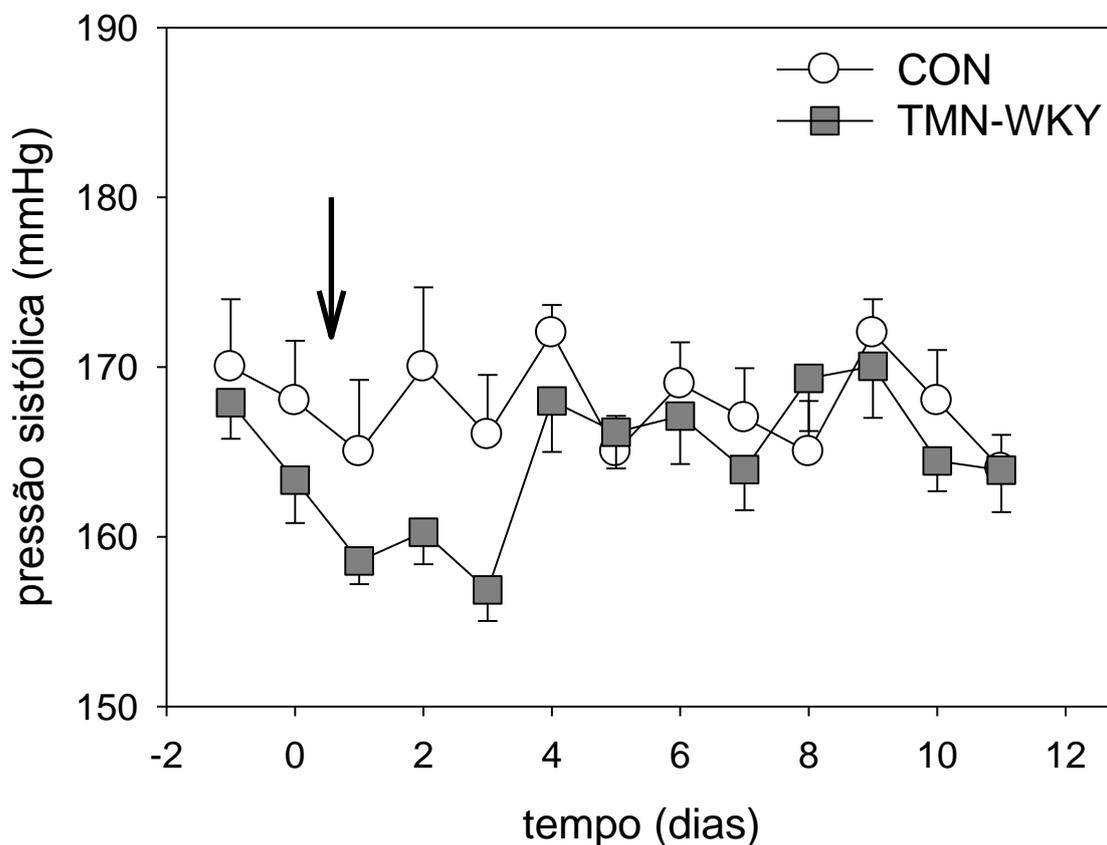


Figura 7: Efeitos do transplante alogênico de células mononucleares de medula óssea. Valores médios (\pm erro padrão) das pressões arteriais sistólicas medidas pela artéria caudal diariamente, até o décimo primeiro dia de observação, após o transplante alogênico de células mononucleares adultas oriundas de ratos WKY normotensos (TMN-WKY). Note a tendência de queda transitória da pressão arterial sistólica (no terceiro dia) no grupo TMN-WKY, quando comparado ao grupo controle (CON). Ao final do período de observação, nenhuma diferença foi observada entre os dois grupos.

A tabela 6 mostra os valores hemodinâmicos basais coletados nos dois grupos experimentais, ao final dos 11 dias de observação, por meio de registro direto da pressão arterial, durante 01 hora, estando o animal em estado consciente e acordado.

Tabela 6: Efeitos do transplante alogênico de células mononucleares de medula óssea. Valores médios (\pm erro padrão) das pressões arteriais sistólica (PAS), média (PAM) e diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC), coletados durante um período de registro basal de 01 hora, dos grupos controle (CON) e tratados com células mononucleares de medula óssea adulta de ratos WKY normotensos (TMN-WKY).

	CON (n=5)	TMN-WKY (n=7)
PAS (mmHg)	172,4 \pm 5,8	170,6 \pm 4,4
PAM (mmHg)	145,5 \pm 6,0	146,8 \pm 3,0
PAD (mmHg)	132,5 \pm 6,1	134,8 \pm 2,8*
FC (bpm)	384,5 \pm 25,7	340,2 \pm 33,4

Os valores de pressão arterial e frequência cardíaca, registrados por meio direto, nos animais do grupo TMN-WKY não diferiram do grupo controle, confirmando os dados obtidos pela medida de pressão indireta na artéria caudal.

A partir dos sinais de pressão arterial pulsátil, coletados diretamente, séries temporais de intervalo de pulso e pressão arterial sistólica foram processadas e submetidas à análise de variabilidade cardiovascular.

A tabela 7 mostra os valores médios dos parâmetros temporais e espectrais da variabilidade do intervalo de pulso, medidos nos animais dos grupos TMN-WKY e comparados aos animais do grupo controle. Pode-se verificar que nenhuma modificação foi observada na variabilidade da frequência cardíaca, nos animais transplantados.

Tabela 7: Efeitos do transplante alogênico de células mononucleares de medula óssea. Valores médios (\pm erro padrão) dos parâmetros temporais (variância) e espectrais da variabilidade do intervalo de pulso, coletados durante um período de registro basal de 01 hora, dos animais do grupo controle (CON) e dos animais tratados com transplante de células mononucleares de medula óssea adulta de ratos WKY normotensos (TMN-WKY).

	CON (n=5)	TMN-WKY (n=7)
IP (ms)	156,0 \pm 25,2	187,0 \pm 18,3
Variância (ms ²)	33,6 \pm 7,6	40,7 \pm 5,2
VLF (ms ²)	20,5 \pm 5,1	26,5 \pm 2,7
LF (ms ²)	2,0 \pm 1,8	2,5 \pm 1,1
LF (u.n)	25,4 \pm 5,4	28,9 \pm 2,7
HF (ms ²)	6,3 \pm 2,5	8,7 \pm 2,1
HF (u.n.)	72,4 \pm 5,2	65,7 \pm 4,5
Razão LF/HF	0,41 \pm 0,07	0,44 \pm 0,06

IP (intervalo de pulso), VLF (componente de muito baixa frequência), LF (componente de baixa frequência), HF (componente de alta frequência), ms (milissegundos), u.n. (unidades normalizadas).

Da mesma forma, em relação à variabilidade da pressão arterial sistólica, nenhuma diferença significativa foi verificada (tabela 8) entre os grupos TMN-WKY e controle.

Tabela 8: Efeitos do transplante alogênico de células mononucleares de medula óssea. Valores médios (\pm erro padrão) dos parâmetros temporais (variância) e espectrais da variabilidade de pressão arterial sistólica (PAS), coletados durante um período de registro basal de 01 hora, dos animais do grupo controle (CON) dos animais tratados com transplante de células mononucleares de medula óssea adulta de ratos WKY normotensos (TMN-WKY).

	CON (n=5)	TMN-WKY (n=7)
PAS (mmHg)	172,4 \pm 5,8	170,6 \pm 4,4
Variância (mmHg ²)	36,5 \pm 6,6	40,9 \pm 5,9
VLF (mmHg ²)	15,5 \pm 4,9	18,4 \pm 4,1
LF (mmHg ²)	22,6 \pm 6,1	19,6 \pm 3,3
HF (mmHg ²)	3,1 \pm 1,8	2,7 \pm 0,4
Razão LF/HF	5,94 \pm 0,97	7,31 \pm 0,75

PAS (pressão arterial sistólica), VLF (componente de muito baixa frequência), LF (componente de baixa frequência), HF (componente de alta frequência), ms (milissegundos), u.n. (unidades normalizadas).

O cálculo do alfa-índice, marcador de sensibilidade barorreflexa cardíaca espontânea, não mostrou diferença entre os grupos CON e TMN-WKY (tabela 9). Pode-se notar também que a coerência e o desvio de fase entre a variabilidade do intervalo de pulso e da pressão arterial sistólica na faixa de LF não se mostraram diferentes entre os dois grupos.

Tabela 9: Efeitos do transplante alogênico de células mononucleares de medula óssea. Valores médios (\pm erro padrão) da coerência, do desvio de fase e do alfa-índice estimados a partir da análise espectral cruzada entre as oscilações na faixa LF da variabilidade do intervalo de pulso e da pressão arterial sistólica, coletadas durante um período de registro basal de 01 hora, dos animais do grupo controle (CON) e dos animais tratados com transplante de células mononucleares de medula óssea adulta de ratos WKY normotensos (TMN-WKY).

	CON (n=5)	TMN-WKY (n=7)
Coerência	0,943 \pm 0,013	0,932 \pm 0,012
Desvio de Fase (π rads)	-0,52 \pm 0,17	-0,63 \pm 0,29
Alfa-índice (ms/mmHg)	0,28 \pm 0,09	0,33 \pm 0,05

π rads. (π radianos), ms (milissegundos), mmHg (milímetros de mercúrio)

O peso cardíaco absoluto (em gramas) e o relativo (em mg/g) (figura 8) foi semelhante entre os dois grupos estudados ($0,76 \pm 0,01\text{g}$ e $4,04 \pm 0,06\text{mg/g}$ no grupo TMN-WKY versus $0,79 \pm 0,04\text{g}$ e $4,12 \pm 0,11\text{mg/g}$ no grupo CON, $p =$ não significativo). Não houve diferença significativa para o peso corporal final dos animais ($187,1 \pm 1,7$ no grupo TMN-WKY versus $190,2 \pm 3,5\text{g}$ no grupo CON, $p =$ não significativo).

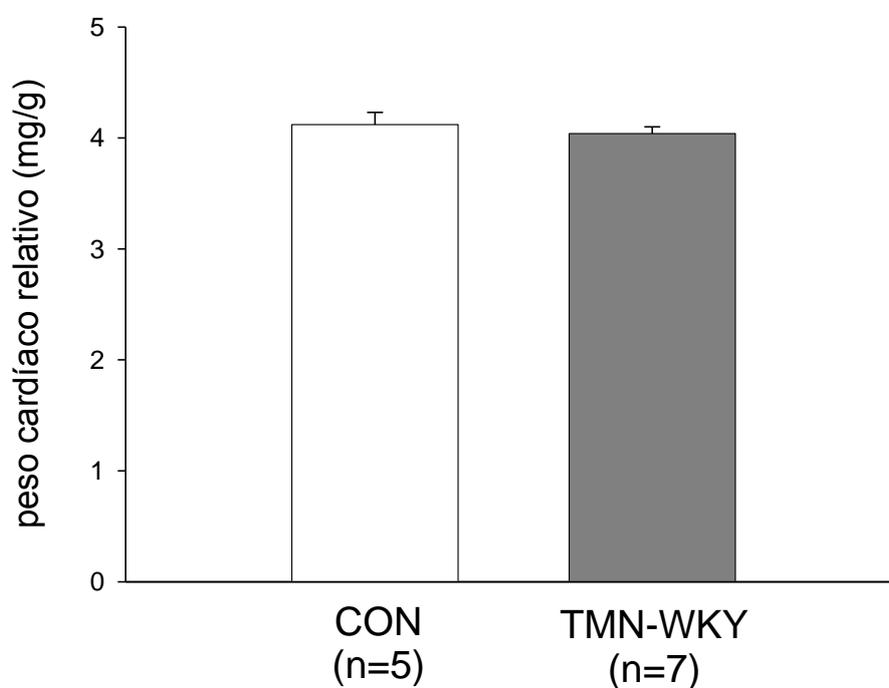


Figura 8: Efeitos do transplante alogênico de células mononucleares de medula óssea. Valores médios (\pm erro padrão) do peso cardíaco relativo (em mg/g) nos animais do grupo CON e TMN-WKY.

A densidade glomerular (glomérulos/mm²) não diferiu entre os grupos experimentais TMN-WKY e CON (tabela 10). A figura 9 ilustra a semelhança na quantidade de glomérulos por campo encontrados em ambos os grupos.

Tabela 10: Efeitos do transplante alôgênico de células mononucleares de medula óssea. Valores médios (\pm erro padrão) da densidade glomerular (em glomérulos/mm²) nos animais do grupo controle (CON) e nos animais tratados com transplante de células mononucleares de medula óssea adulta de ratos WKY normotensos (TMN-WKY).

	CON (n=5)	TMN-WKY (n=5)
Densidade glomerular (glom./mm ²)	4,93 \pm 0,26	4,95 \pm 0,20

mm² (milímetros quadrados)

O exame histológico ao microscópio de fluorescência não conseguiu evidenciar nenhuma marcação avermelhada em todos os cortes dos rins, pulmões e corações dos animais que receberam células mononucleares de medula óssea marcadas com celltracker CM-DiI.

Por outro lado, o baço dos animais que receberam células mononucleares de medula óssea adultas de ratos WKY apresentou um número relativamente frequente de células marcadas (figura 10-B). Em alguns pontos do baço, marcações mais intensas foram notadas, as quais pareciam estar circundadas por células mononucleares, cujos núcleos foram marcados com DAPI. (figura 10-C).

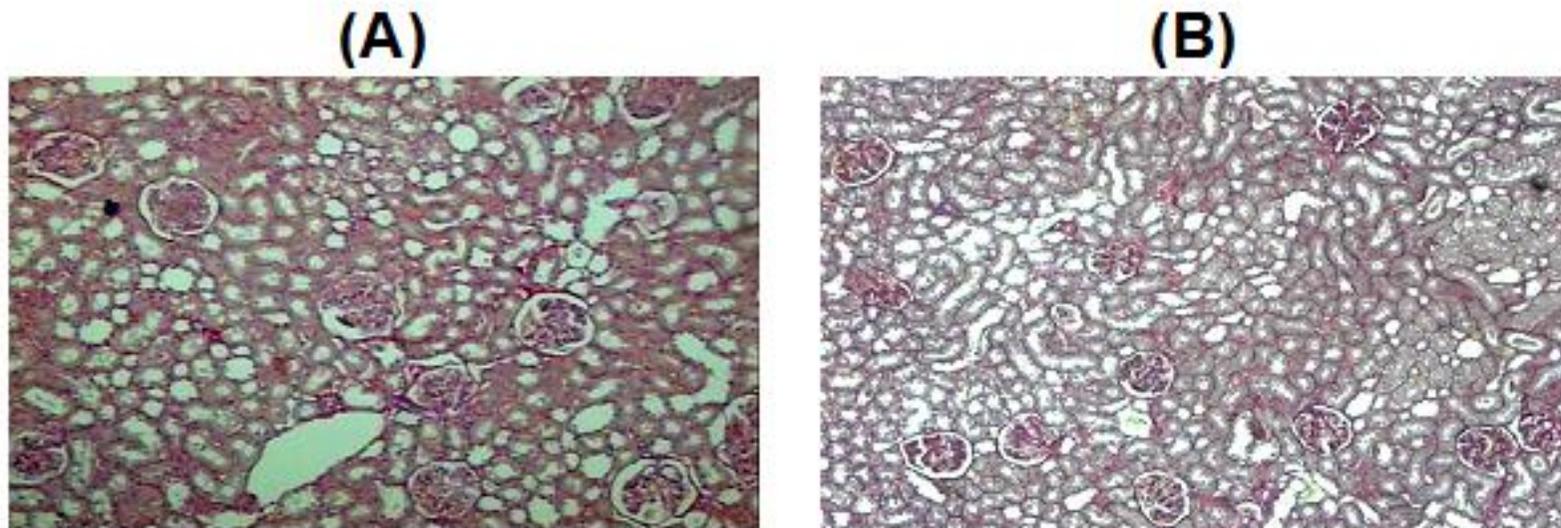


Figura 9: Efeitos do transplante alôgênico de células mononucleares de medula óssea. Cortes histológicos com 5 μm de espessura de rins, corados com picrosirius red, de animais representativos do grupo controle (Painel A) e do grupo que recebeu células mononucleares de medula óssea de rato WKY normotenso (Painel B). Aumento de 50X.

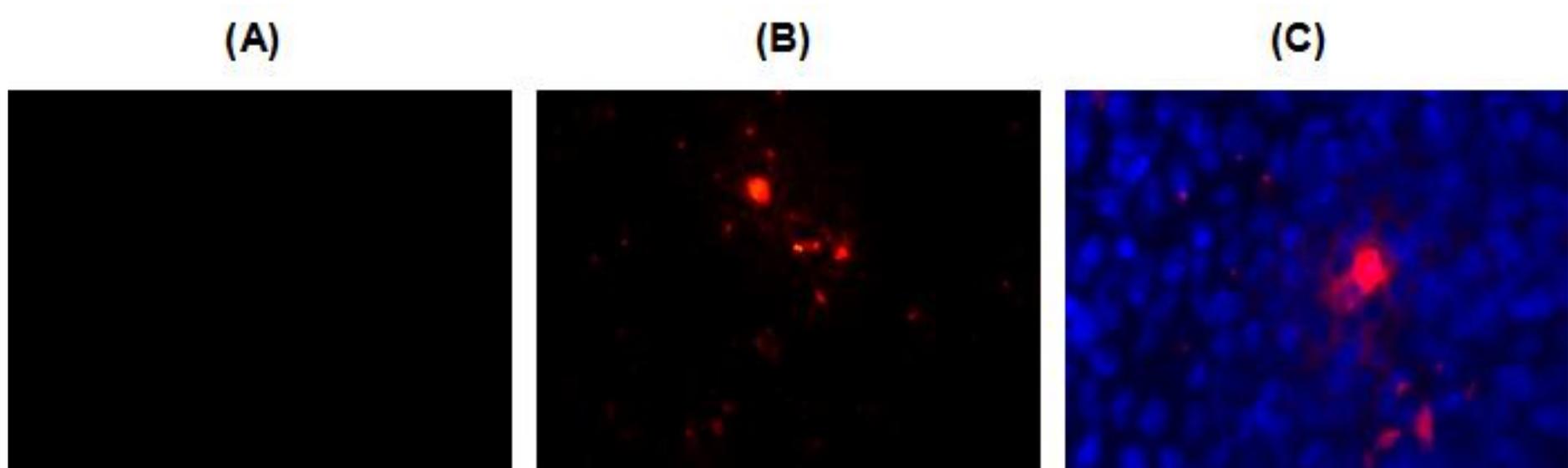


Figura 10: Efeitos do transplante alôgênico de células mononucleares de medula óssea. Cortes histológicos com 5 μm de espessura de baço de um animal representativo do grupo controle (painel A – 200x) e do grupo que recebeu células mononucleares de medula óssea de rato WKY normotenso marcadas com celltracker CM-DiI (painel B – 200x). Note, no painel C (400x), fluorescência avermelhada (celltracker CM-DiI) circundada por núcleos celulares marcados com DAPI.

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como principal achado uma redução da pressão arterial sistêmica associada a uma melhora na variabilidade de baixa frequência (LF) da pressão arterial e na hipertrofia cardíaca, em decorrência do transplante isogênico de células mononucleares, de medula óssea, adultas e jovens em ratos espontaneamente hipertensos. Tal descoberta é inédita, não tendo ainda sido relatada por nenhum artigo científico da literatura, até o presente momento.

A certificação de viabilidade de transplantes cardíacos de corações de neonatos de SHRs para orelhas de SHRs adultos, após 04 semanas (Dias da Silva *et al*, 2005, observações não publicadas), caracterizada por batimentos visíveis, rítmicos e regulares em frequências cardíacas similares ao citados na literatura (Fey *et al*, 1998), demonstra a isogenicidade dessa linhagem, como já relatado por outros autores em diferentes contextos experimentais (Smallegange *et al*, 2004, Smallegange, Kline e Adams, 2003). Assim sendo, pode-se afirmar que, no período de até um mês, células de SHRs doadoras não são rejeitadas pelo sistema imune dos animais receptores, o que exclui a possibilidade de rejeição imunológica das células de medula óssea transplantadas em SHRs. A favor dessa afirmação, está o fato de que, após 15 dias de transplante, a marcação com celltracker CM-DiI foi encontrada em vários tecidos, incluindo o parênquima renal e o baço.

Por outro lado, a ausência de qualquer efeito do transplante das células mononucleares de medula óssea de ratos WKY normotensos, as quais são alogênicas em relação às SHRs receptoras, sugere fortemente uma resposta imune montada contra as células WKY alogênicas transplantadas, as quais muito provavelmente foram eliminadas dos vários tecidos corporais das SHRs receptoras. De fato, em nenhum dos cortes histológicos, à exceção do baço, foram observadas células CM DiI+, o que contrasta com os achados do transplante isogênico acima citado, onde células CM DiI+, ainda que de forma escassa, foram encontradas nos vários tecidos receptores examinados. Em reforço à ideia de eliminação das células alogênicas transplantadas, podemos mencionar a presença de marcação de células e concentrados de CM-DiI no baço das SHRs receptoras isogênicas, onde, em torno dos concentrados de CM-DiI, pode ser notado um conjunto de células mononucleares circunjacentes, sugerindo, talvez, uma resposta de ativação imune. Entretanto, tal achado necessita de confirmação adicional. Porém, dados de Dias da Silva *et al* (2005, observações não publicadas) mostram claramente uma marcada rejeição imune de transplantes de corações neonatais de WKY para orelhas de SHRs adultos, a qual já se manifesta como ausência de batimentos e/ou atividade elétrica irregular e ulceração cutânea na orelha, já na primeira

semana após o transplante, evidenciando assim a alogenicidade do transplante no contexto WKY para SHR. Tal fato é reforçado por outros relatos de literatura com transplantes renais, por exemplo (Bianchi *et al*, 1974).

A resposta hipotensora no transplante isogênico foi observada após o transplante de células mononucleares de medula óssea extraídas por centrifugação em Ficoll-Paque® e marcadas com celltracker CM-DiI, oriundas tanto de animais doadores adultos hipertensos (16 semanas de idade), como de doadores jovens pré-hipertensos (04 semanas de idade). Tais achados sugerem que a idade e a condição de pressão arterial dos sujeitos doadores de medula óssea parecem não influenciar o perfil de resposta anti-hipertensiva das células mononucleares de medula óssea. Em adição, o contato das células com o Ficoll-Paque®, bem como a marcação com o celltracker CM-DiI, pressupõem não afetar a resposta hipotensora observada. Todas as células tronco multipotentes encontradas na medula óssea são localizadas na fração mononuclear, isolada após centrifugação diferencial em gradiente de densidade (Perin *et al*, 2003, Strauer e Kornwiski, 2003, Verfaillie, 2002, Zubair, Silberstein e Ritz, 2002), o que sugere que a resposta hipotensora observada pode ser decorrente do efeito de células tronco ali presentes. Entretanto, não se deve afirmar nada quanto a qual tipo de célula tronco estaria exercendo tal efeito, se hematopoiética, mesenquimal ou progenitora endotelial. Além disso, não se pode descartar em hipótese alguma, com os dados obtidos até o momento, que este efeito hipotensor possa também ser exercido por células pré-linfocíticas ou pré-monocíticas, também presentes na camada mononuclear obtida no procedimento de separação celular.

Nos experimentos realizados com o transplante de células mononucleares de medula óssea isogênica, percebeu-se uma tendência de elevação da pressão arterial em direção aos níveis hipertensivos prévios, na última medida executada no décimo quarto dia, o que poderia sugerir um efeito hipotensor temporário do transplante.

Esse efeito hipotensor temporário do transplante de células mononucleares de medula óssea deveria mesmo ser esperado, uma vez que as células transplantadas são, como acima atestado, isogênicas (células que carregam a mesma carga genética hipertensiva, o que caracteriza o modelo SHR). Embora haja uma queda da pressão arterial associada à melhora na variabilidade da pressão arterial e na hipertrofia cardíaca, é possível que as alterações genéticas portadas por estas novas células, mais cedo ou mais tarde, acabem por serem expressas, tornando-as alteradas, desfazendo-se, assim, os eventuais efeitos benéficos.

Para contornar esse eventual problema, uma abordagem terapêutica interessante a ser adotada seria a manipulação genética das células tronco de medula óssea antes da administração sistêmica das mesmas, na tentativa de se corrigir ou se reverter um ou mais defeitos genéticos conhecidos, os quais são associados ao desenvolvimento da HAS. Modificação genética de células tronco para hiperexpressar fatores de crescimento angiogênicos, aumentar a atividade de sinalização da resposta angiogênica, melhorar a biodisponibilidade e/ou estender o período de vida das células tronco constituem-se, inclusive, estratégias alternativas que poderiam otimizar o provável efeito terapêutico anti-hipertensivo das células tronco. Entretanto, tais abordagens terapêuticas, conhecidas como terapias híbridas, gênicas e celulares, para o nosso conhecimento, nunca foram testadas no contexto da hipertensão arterial sistêmica.

Apesar disso, vários estudos pré-clínicos, em outros contextos patológicos, como no IAM (Mangi *et al*, 2003, Matsumoto *et al*, 2005), isquemia de membros inferiores (Iwaguro *et al*, 2002), hipertensão pulmonar (Nagaya *et al*, 2003), etc., demonstraram a exequibilidade e efetividade terapêutica desta abordagem. Genes alvos, como os que expressam VEGF, superóxido dismutase, NO sintase endotelial, adrenomedulina, etc., poderiam ser efetivos, se transfectados em células tronco isogênicas de SHR.

A análise de variabilidade da frequência cardíaca, por meio de análise espectral, é atualmente um método amplamente aceito para a avaliação da modulação autonômica simpática e parassimpática do coração (Malliani *et al*, 1991, Task Force, 1996). A frequência cardíaca basal; a potência das oscilações do LF, um marcador de modulação simpática cardíaca; a potência das oscilações do HF, um marcador de modulação parassimpática vagal cardíaca, e a razão LF/HF, uma expressão do balanço simpato-vagal cardíaco (Malliani *et al*, 1991, Task Force, 1996), não foram modificadas no presente trabalho pelo transplante de células mononucleares de medula óssea. Além disso, a sensibilidade barorreflexa cardíaca espontânea dos animais que receberam células mononucleares de medula óssea isogênicas, avaliada pelo cálculo do alfa índice (Pagani *et al*, 1988), não se mostrou diferente dos animais controle, mostrando-se bastante atenuada. Isto contraria o esperado, visto que a queda significativa da pressão arterial poderia induzir uma esperada melhora na função barorreceptora, via mecanismos de adaptação crônica (Chapleau *et al*, 1995).

Tais achados, embora frutos de métodos de avaliação indireta do controle neural do coração, sugerem que o efeito hipotensor do transplante de células mononucleares de

medula óssea aparentemente não dependem totalmente de alterações nos mecanismos neurais centrais e/ou periféricos de controle da pressão arterial. É importante ressaltar, entretanto, que experimentos adicionais, envolvendo, por exemplo, registro de atividade simpática periférica, quantificação de tônus simpático e parassimpático, testes farmacológicos do barorreflexo, entre outros, são necessários para confirmar esses achados indiretos.

Os resultados obtidos na análise de variabilidade da pressão arterial sistólica após o transplante isogênico mostraram, porém, uma significativa atenuação da variabilidade total da pressão arterial (variância), principalmente decorrente de redução na variabilidade do VLF e do LF. As oscilações VLF, embora geradas por mecanismos neuro-humorais complexos não completamente entendidos, são bastante atenuadas por dois sistemas tampões de oscilações da pressão arterial: os barorreceptores arteriais (Cowley, Liard e Guyton, 1973) e o óxido nítrico endotelial (Stauss e Persson, 2000). Como acima mencionado, evidências indiretas parecem sugerir que os barorreceptores não se modificaram, após o transplante de medula óssea.

O sistema da NO sintase endotelial, além das inúmeras funções vasomotoras e reológicas já descritas (Umans e Levi, 1995), parece ser importante também na atenuação de oscilações da pressão arterial, nas faixas VLF e, principalmente, LF, através de um mecanismo de retroalimentação negativa, baseado na tensão de cisalhamento endotelial (Nafz, Wagner e Persson, 1997, Stauss *et al*, 1999, Stauss e Persson, 2000). Por exemplo, eventuais elevações da pressão arterial resultariam em um aumento de fluxo para os tecidos, o que elevaria a tensão de cisalhamento endotelial, estimulando a liberação de NO, provocando vasodilatação arterial com conseqüente queda da resistência periférica, normalizando assim a pressão arterial. Este sistema de retroalimentação negativa opera com sua maior eficácia na faixa de oscilação de LF e VLF. Bloqueio farmacológico ou “*knockout*” gênico da NOS endotelial aumentam as oscilações de baixa frequência da pressão arterial em animais de laboratório (Nafz *et al*, 1996, Nafz, Wagner e Persson, 1997, Stauss *et al*, 1999, Stauss e Persson, 2000).

Nos SHRs, os quais, em comparação com animais normotensos, apresentam altos valores de variabilidade da pressão arterial na faixa VLF e LF, parte dessa elevada variabilidade poderia ser dependente da disfunção endotelial, amplamente descrita neste modelo (McIntyre *et al*, 1999), com conseqüente incapacidade de tamponamento das oscilações da pressão arterial, por parte do óxido nítrico. Inúmeros trabalhos na literatura têm descrito uma reduzida produção e/ou biodisponibilidade do NO em SHR (Junquero *et al*,

1993, Li e Joshua, 1993). A redução das oscilações de VLF e LF da pressão arterial, observada em nosso estudo, após 15 dias de transplante de células mononucleares de medula óssea, poderia indicar um efeito benéfico das células transplantadas, melhorando a disfunção endotelial e a formação e/ou biodisponibilidade NO, aumentando, dessa forma, a capacidade do óxido nítrico endotelial em tamponar as oscilações da pressão arterial. Além desse feito, uma eventual melhora na função endotelial poderia também explicar o efeito hipotensor do transplante. Porém, experimentos adicionais envolvendo testes diretos de função endotelial são necessários para confirmar um potencial efeito benéfico das células transplantadas, sobre a função endotelial de SHRs. Em adição a isso, como o componente LF da variabilidade da pressão arterial é em parte gerado por uma modulação simpática para os vasos periféricos (Pagani *et al*, 1988), não se pode aqui descartar também um efeito do transplante de medula óssea na redução da aumentada atividade simpática dos SHRs. Porém, os dados de variabilidade da frequência cardíaca sugerem não apoiar essa hipótese.

Em resumo, os dados obtidos neste atual trabalho indicam que células mononucleares de medula óssea isogênicas não somente reduzem a pressão arterial elevada, como também melhoram a variabilidade da pressão arterial, sugerindo uma melhora da disfunção endotelial, sendo esta presente em SHRs. Por quais mecanismos células mononucleares de medula óssea poderiam estar melhorando a hipertensão e a disfunção endotelial desses animais? As respostas para tal pergunta não são ainda possíveis, contudo algumas hipóteses podem ser lançadas, as quais se baseiam no conhecimento prévio já acumulado em estudos de células de medula óssea.

No conjunto de células mononucleares presente na medula óssea, dois contingentes de células poderiam ser importantes: as células tronco (hematopoiéticas, mesenquimais e/ou progenitoras endoteliais) e as células monocíticas. Em relação às células tronco, vários são os trabalhos da literatura que demonstram a habilidade das mesmas na diferenciação em células endoteliais e na incorporação em superfícies vasculares (re-endotelização), ou ainda de se integrarem em novos vasos, formados pelo mecanismo da vasculogênese pós-natal. Aqui, é imprescindível ressaltar a especial habilidade das células progenitoras endoteliais CD133⁺ e/ou CD34⁺ e VEGFR2⁺ na realização destas funções (Asahara e Kawamoto, 2004, Urbich e Dimmeler, 2004). Entretanto, dados recentes da literatura também demonstram que células monocíticas CD133⁻, CD34^{baixo} e VEGFR2⁺, porém CD14⁺, também apresentam propriedades semelhantes, fundamentalmente no contexto da neovascularização inflamatória (Romagnani *et al*, 2005).

Além da possível diferenciação dessas células em células endoteliais, outro provável mecanismo, também descrito na literatura em outros contextos, poderia ser uma eventual ação parácrina e, até mesmo, endócrina das mesmas, já que elas são aptas a secretarem uma vasta gama de fatores de crescimento/citocinas, muitas das quais detêm propriedades angiogênicas, pro-sobrevivência celular e anti-apoptóticas, como o VEGF, o fator 1 alfa derivado de célula estromal (SDF1- α), a angiopoietina 1 e 2, o fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), o fator estimulador de colônias granulocíticas (G-CSF), a eritropoietina, entre outros. Além dessas características, pode estar havendo uma estimulação da expressão e/ou ativação de NO sintase endotelial, da expressão de enzimas removedoras de radicais livres, como a superóxido dismutase, da secreção de substâncias vasodilatadoras, como a adrenomedulina, etc. (Gnecchi *et al*, 2005, Heil *et al*, 2004, Losordo e Dimmeler, 2004).

Embora neste estudo tenha sido observada a incorporação de marcação de celltracker CM-DiI na camada endotelial de pequenas artérias renais, o número de células encontradas nos rins foi relativamente pequeno para se pensar na hipótese de diferenciação celular em endotélio, re-endotelização ou vasculogênese pós-natal. Isso aparentemente poderia parecer surpreendente, já que, se considerarmos que cerca de 1/4 do débito cardíaco irriga os rins, seria de se suspeitar numa grande marcação nos rins, fato que não foi verificado. Talvez o acontecimento mais provável seja o efeito parácrino/endócrino das células mononucleares, cujo entendimento seria mais plausível, mesmo com um pequeno número de células incorporadas. Além disso, essas células parecem situar-se preferencialmente em outros órgãos, como é o caso da própria medula óssea do receptor, o fígado e, indubitavelmente, o baço, evidenciando a preferência e a atração quimiotática das mesmas pelo ambiente hematopoiético (Verfaillie, 2002) ou ainda no pulmão, porém em menor extensão, já que muitas das células injetadas ficam presas na microcirculação pulmonar, posteriormente à primeira passagem nesse órgão, após a administração intravenosa pela veia jugular (Aicher *et al*, 2003).

Por fim, o presente trabalho procurou avaliar também as consequências da redução da pressão arterial sistêmica, decorrente do transplante de células mononucleares de medula óssea sobre alguns importantes órgãos-alvo, mais especificamente, o coração e os próprios rins. Em relação ao coração, pode-se observar que, após apenas 15 dias de pequena hipotensão (cerca de 25 mmHg somente), uma significativa redução da hipertrofia cardíaca foi verificada (cerca de 12% de redução do peso cardíaco relativo), o que deve ser

inequivocadamente conseqüente à redução da sobrecarga hemodinâmica imposta ao coração. Entretanto, estudos adicionais são necessários para se completar o entendimento acerca dos mecanismos envolvidos na redução da hipertrofia e se algum efeito anti-fibrogênico e/ou neovascularizante poderiam também ser encontrados.

Em relação aos rins, utilizando-se de uma técnica de morfometria para quantificação da densidade glomerular, não se identificou qualquer modificação na densidade glomerular, posterior aos 15 dias de hipotensão provocada pelo transplante de células mononucleares de medula óssea. É bem descrito na literatura, uma progressiva perda glomerular vigente em SHR ao longo de sua vida (Persson, 2003, Retig e Grisk, 2005). Todavia, a velocidade de perda nefrônica acelera-se substancialmente em idades mais avançadas, para além de 30-40 semanas. Os animais estudados no trabalho tiveram uma idade inicial de 16 semanas, podendo ser ainda considerados jovens e, portanto, sem perda nefrônica acelerada. Assim sendo, por conta da baixa velocidade de perda nefrônica em animais com idades jovens, pela pequena queda relativa na hipertensão e, talvez, pelo pequeno tempo de observação (15 dias), não foi possível demonstrar uma preservação nefrônica posteriormente ao transplante de células mononucleares de medula óssea em SHRs. Estudos adicionais, envolvendo a avaliação de outros aspectos funcionais e estruturais dos rins, fazem-se necessários.

O presente estudo apresenta algumas limitações. A principal delas refere-se à incapacidade do estudo de demonstrar o real mecanismo da ação hipotensora, além de não permitir identificar qual(is) célula(s) está(ão) executando essa ação hipotensora. Porém, levando-se em consideração o crescente uso de transplante de células mononucleares de medula óssea em seres humanos atualmente, portadores de diferentes condições clínicas não hematológicas, parece-nos muito relevante descrever um provável efeito terapêutico destas células no contexto da HAS. Métodos de cultivo e separação de populações específicas de células, ainda que necessários para a real elucidação destas questões, são, em sua maioria, onerosos e, em algumas situações, perigosos, principalmente em relação ao cultivo *in vitro* de células, cuja manipulação indica indução de modificações genéticas e instabilidade genômica, já após algumas poucas passagens *in vitro* (Ahmadbeigi *et al*, 2011, Carothers *et al*, 2012).

Embora com limitações, o atual estudo traz imprescindíveis implicações clínicas: um melhor entendimento do papel de células mononucleares de medula óssea na fisiopatologia da hipertensão arterial essencial e, talvez o mais importante, a perspectiva do

uso terapêutico de células tronco de medula óssea autóloga, e não alogênicas, para o tratamento da HAS, a qual figura como importante marcadora de risco, predispondo a inúmeras outras doenças do sistema cardiovascular. Além do aspecto dos mecanismos de ação terapêutica, outra importante implicação clínica é o tempo de ação hipotensora: 15 dias no rato. Esse tempo representaria, nos seres humanos, teoricamente, aproximadamente 450 dias (cerca de 1,3-1,5 anos), levando-se em consideração a relação de expectativa de vida das duas espécies (2-2,5 anos para o rato e 70-80 anos para o homem).

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste estudo, algumas conclusões foram identificadas:

1) O transplante de células mononucleares de medula óssea oriundas de doadores isogênicos adultos e jovens:

- reduz a pressão arterial sistêmica em SHRs,
- não modifica a variabilidade da frequência cardíaca, nem a sensibilidade barorreflexa cardíaca espontânea, sugerindo uma eventual ausência de efeitos autonômicos sobre o coração dos animais SHRs,
- reduz a variabilidade da pressão arterial nas faixas de VLF e LF em ratos espontaneamente hipertensos, sugerindo um eventual efeito na via do óxido nítrico endotelial,
- reduz a hipertrofia cardíaca em ratas espontaneamente hipertensas,
- não modifica a densidade glomerular renal de animais SHRs, após 15 dias de transplante.

Além disso, células mononucleares isogênicas transplantadas foram encontradas em vários órgãos, incluindo o parênquima renal e o baço, após 15 dias do transplante, com algumas delas presentes na parede arterial de pequenas artérias renais.

2) O transplante de células mononucleares de medula óssea alogênicas, oriundas de ratos WKY normotensos, não apresentaram quaisquer efeitos de longo prazo no modelo de hipertensão arterial espontânea em ratos imunocompetentes, provavelmente devido à rejeição imunológica.

Por todas estas ações, o uso de células mononucleares de medula óssea isogênica parece representar uma nova perspectiva terapêutica para a hipertensão arterial sistêmica.

REFERÊNCIAS

Abboud FM, Harwani SC, Chapleau MW. Autonomic Neural Regulation of the Immune System Implications for Hypertension and Cardiovascular Disease. *Hypertension*. 2012;59(4):755-62.

Ahmadbeigi N, Shafiee A, Seyedjafari E, Gheisari Y, Vassei M, Amanpour S, Amini S, Bagherizadeh I, Soleimani M. Early spontaneous immortalization and loss of plasticity of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Prolif*. 2011 Feb;44(1):67-74.

Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, Technau-Ihling K, Zeiher AM, Dimmeler S. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med*. 2003 Nov;9(11):1370-6.

Asahara T, Kawamoto A. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004 Sep;287(3):C572-9.

Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997; 275:964-967.

Baber SR, Deng W, Master RG, Bunnell BA, Taylor BK, Murthy SN, Hyman AL, Kadowitz PJ. Intratracheal mesenchymal stem cell administration attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension and endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 Feb;292(2):H1120-8.

Barker, JE. Early transplantation to a normal microenvironment prevents the development of Steel hematopoietic stem cell defects. *Exp Hematol*. 1997;25:542-547.

Beevers G, Lip GY, O'Brien E. ABC of hypertension: The pathophysiology of hypertension. *BMJ (Clinical Research ed.)*. 2001 Apr 14;322(7291):912-6.

Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 2003;114:763-776.

Bianchi G, Fox U, Di Francesco GF, Giovanetti AM, Pagetti D. Blood pressure changes produced by kidney cross-transplantation between spontaneously hypertensive rats and normotensive rats. *Clin Sci Mol Med*. 1974 Nov;47(5):435-48

Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. *Cell Stem Cell*. 2008 Apr 10;2(4):313-9.

Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell*. 2001 Jun 29;105(7):829-41.

Bray MS, Li L, Turner ST, Kardia SL, Boerwinkle E. Association and linkage analysis of the alpha-adducin gene and blood pressure. *Am J Hypertens*. 2000;13:699-703.

Brown VK, Ogle EW, Burkhardt AL, Rowley RB, Bolen JB, Justement LB. Multiple components of the B cell antigen receptor complex associate with the protein tyrosine phosphatase, CD45. *J Biol Chem*. 1994 Jun 24;269(25):17238-44.

Calhoun DA, Jones D, Textor S, Goff DC, Murphy TP, Toto RD, White A, Cushman WC, White W, Sica D, Ferdinand K, Giles TD, Falkner B, Carey RM. American Heart Association Professional Education Committee. Resistant hypertension: diagnosis, evaluation, and treatment: a scientific statement from the American Heart Association Professional Education Committee of the Council for High Blood Pressure Research. *Hypertension*. 2008;51:1403-1419.

Caplan AI. Mesenchymal Stem Cells. In: Robert Lanza, John Gearhart, Brigid Hogan, Douglas Melton, Roger Pedersen, James Thomson and Michael West, Editor(s), *Handbook of Stem Cells*. Burlington: Academic Press; Vol. 2-C.28, Pages 299-308, 2004.

Caplan AI. Mesenchymal Stem Cells. *J Orthop Res*. 1991 Sep;9(5):641-50.

Caplan AI. The mesengenic process. *Clin Plas Surg*. 1994;21:429-435.

Carothers AM, Rizvi H, Hasson RM, Heit YI, Davids JS, Bertagnolli MM, Cho NL. Mesenchymal stromal cell mutations and wound healing contribute to the etiology of desmoid tumors. *Cancer Res*. 2012 Jan 1;72(1):346-55.

Carretero OA, Oparil S. Essential hypertension. Part I: definition and etiology. *Circulation*. 2000 Jan 25;101(3):329-35.

Chao H, Hirschi KK. Hemato-vascular origins of endothelial progenitor cells? *Microvasc Res*. 2010 May;79(3):169-73.

Chapleau MW, Cunningham JT, Sullivan MJ, Wachtel RE, Abboud FM. Structural versus functional modulation of the arterial baroreflex. *Hypertension*. 1995 Aug;26(2):341-7.

Chiong JR, Aronow WS, Khan IA, Nair CK, Vijayaraghavan K, Dart RA, Behrenbeck TR, Geraci SA. Secondary hypertension: current diagnosis and treatment. *Int J Cardiol.* 2008 Feb 20;124(1):6-21.

Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jones DW Jr, Materson BJ, Oparil S, Wright JT Jr, Roccella EJ. For the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure, National Heart, Lung and Blood Institute; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. The Seventh Report Of The Joint National Committee On Prevention, Detection, Evaluation, And Treatment Of High Blood Pressure. *Hypertension.* 2003 Dec;42(6):1206-52.

Coffman TM. Under pressure: the search for the essential mechanisms of hypertension. *Nat Med.* 2011 Nov 7;17(11):1402-9.

Cowan CA, Atienza J, Melton DA, Eggan K. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science.* 2005;309:1369-1373.

Cowley AW Jr, Liard JF, Guyton AC. Role of baroreceptor reflex in daily control of arterial blood pressure and other variables in dogs. *Circ Res.* 1973 May;32(5):564-76.

Crosby JR, Kaminski WE, Schatteman G, Martin PJ, Raines EW, Seifert RA, Bowen-Pope DF. Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation. *Circ Res.* 2000;87:728-30.

Crowley SD, Gurley SB, Oliverio MI, Pazmino AK, Griffiths R, Flannery PJ, Spurney RF, Kim HS, Smithies O, Le TH, Coffman TM. Distinct roles for the kidney and systemic tissues in blood pressure regulation by the renin-angiotensin system. *J Clin Invest.* 2005 Apr;115(4):1092-9.

Danaei G, Finucane MM, Lin JK, Singh GM, Paciorek CJ, Cowan MJ, Farzadfar F, Stevens GA, Lim SS, Riley LM, Ezzati M. National, regional, and global trends in systolic blood pressure since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 786 country-years and 5.4 million participants. *Lancet.* 2011 Feb 12;377(9765):568-77.

de Ciuceis C, Pilu A, Rizzoni D, Porteri E, Muiesan ML, Salvetti M, Paini A, Belotti E, Zani F, Boari GE, Rosei CA, Rosei EA. Effect of antihypertensive treatment on circulating endothelial progenitor cells in patients with mild essential hypertension. *Blood Press.* 2011 Apr;20(2):77-83.

Delva P, Degan M, Vallerio P, Arosio E, Minuz P, Amen G, Di Chio M, Lechi A. Endothelial progenitor cells in patients with essential hypertension. *J Hypertens.* 2007 Jan;25(1):127-32.

Dias da Silva VJ, Machado MPR, Rocha AM, Franchini KG, Voltarelli JC. Bone marrow stem/progenitor cells reduce arterial blood pressure and ameliorate endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats (abstract). *FASEB J.* 2005;19:7439-7439.

Dickout JG, Lee RM. Blood pressure and heart rate development in young spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol.* 1998 Mar;274(3 Pt 2):H794-800.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-7.

Edwards RG. Cleavage of one- and two-celled rabbit eggs in vitro after removal of the zona pellucida. *J Reprod Fertil.* 1964;7:413-415.

Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 1981;292:154-156.

Fazan R Jr, Dias da Silva VJ, Salgado HC. Modelos de hipertensão arterial. *Rev Bras Hipertens.* 2001;8:19-29.

Feihl F, Liaudet L, Waeber B, Levy B. Hypertension: A Disease of the Microcirculation? *Hypertension.* 2006;48:1012-1017.

Fey TA, Krause RA, Hsieh GC, Andrews JM, Bretheim PT, Morgan SJ, Luly JR, Mollison KW. Improved methods for transplanting split-heart neonatal cardiac grafts into the ear pinna of mice and rats. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 1998 Feb;39(1):9-17.

Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 1970;3:393-403.

Friedenstein AJ. Osteogenic stem cells in bone marrow. In *Bone and Mineral Research*, J.N.M. Heersche and J.A. Kanis, eds. Amsterdam: Elsevier; pp.243-272, 1990.

Frohlich ED. The adrenergic nervous system and hypertension: State of the art. *Mayo Clinic Proceedings.* Mayo Clin Proc. 1977 Jun;52(6):361-8.

Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science.* 2000;287:1433-1438.

Ganten D, Jong W. In: *Handbook of Hypertension.* Elsevier Science; 1994.

Gatti RA, Meuwissen HJ, Allen HD, Hong R, Good, RA. Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet*. 1968;2:1366-1369.

Genetics Home Reference. Help Me Understand Genetics. Lister Hill National Center for Biomedical Communications, U.S. National Library of Medicine National, Institutes of Health Department of Health & Human Services. Handbook Gene Therapy: Published 2012 March 19;p.2-10.

Gnecchi M, He H, Liang OD, Melo LG, Morello F, Mu H, Noiseux N, Zhang L, Pratt RE, Ingwall JS, Dzau VJ. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med*. 2005 Apr;11(4):367-8.

Gonin P, Buchholz CJ, Pallardy M, Mezzina M. Gene therapy bio-safety: scientific and regulatory issues. Conference Paper. *Gene Ther*. 2005 Oct;12 Suppl 1:S146-52.

Guilluy C, Brégeon J, Toumaniantz G, Rolli-Derkinderen M, Retailleau K, Loufrani L, Henrion D, Scalbert E, Bril A, Torres RM, Offermanns S, Pacaud P, Loirand G. The Rho exchange factor Arhgef1 mediates the effects of angiotensin II on vascular tone and blood pressure. *Nat Med*. 2010 Feb;16(2):183-90.

Guyenet PG. The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci*. 2006 May;7(5):335-46.

Guyton AC. Blood pressure control--special role of the kidneys and body fluids. *Science*. 1991 Jun 28;252(5014):1813-6.

Hamano K, Li TS, Kobayashi T, Kobayashi S, Matsuzaki M, Esato K. Angiogenesis induced by the implantation of self-bone marrow cells: a new material for therapeutic angiogenesis. *Cell Transplant*. 2000 May-Jun;9(3):439-43.

Harrison DG, Vinh A, Lob H, Madhur MS. Role of the adaptive immune system in hypertension. *Curr Opin Pharmacol*. 2010 Apr;10(2):203-7.

Heil M, Ziegelhoeffer T, Mees B, Schaper W. A different outlook on the role of bone marrow stem cells in vascular growth: bone marrow delivers software not hardware. *Circ Res*. 2004 Mar 19;94(5):573-4.

Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A; International Society for Cellular Therapy. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005;7(5):393-5.

Huang XR, Chung AC, Yang F, Yue W, Deng C, Lau CP, Tse HF, Lan HY. Smad3 mediates cardiac inflammation and fibrosis in angiotensin II-induced hypertensive cardiac remodeling. *Hypertension*. 2010;55:1165-1171.

Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, Christman BW, Weir EK, Eickelberg O, Voelkel NF, Rabinovitch M. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2004 Jun 16;43(12 Suppl S):13S-24S.

Imanishi T, Moriwaki C, Hano T, Nishio I. Endothelial progenitor cell senescence is accelerated in both experimental hypertensive rats and patients with essential hypertension. *J Hypertens*. 2005;23:1831-1837.

Irigoyen MC, Oliveira AR, D'ávila KAL, Fiorino P, Dall'ago P, Lacchini S. Alterações funcionais do sistema cardiovascular durante o envelhecimento. In: Jeckel-Neto EA, da Cruz IB. *Aspectos biológicos e geriátricos do envelhecimento II*. Porto Alegre: EDIPUCRS; p. 337-70, 2000.

Iwaguro H, Yamaguchi J, Kalka C, Murasawa S, Masuda H, Hayashi S, Silver M, Li T, Isner JM, Asahara T. Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration. *Circulation*. 2002 Feb 12;105(6):732-8.

Jaenisch R, Young R. Stem Cells, the Molecular Circuitry of Pluripotency and Nuclear Reprogramming. *Cell*. 2008 Feb 22;132(4):567-82.

Jones DL, Wagers AJ. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Jan;9(1):11-21.

Judy WV, Watanabe AM, Henry DP, Besch HRJr, Murphy WR, Hockel GJ. Sympathetic nerve activity: Role in regulation of blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Circ Res*. 1976 Jun;38(6 Suppl 2):21-9.

Junquero DC, Schini VB, Scott-Burden T, Vanhoutte PM. Enhanced production of nitric oxide in aortae from spontaneously hypertensive rats by interleukin-1 beta. *Am J Hypertens*. 1993 Jul;6(7 Pt 1):602-10.

Kanki-Horimoto S, Horimoto H, Mieno S, Kishida K, Watanabe F, Furuya E, Katsumata T. Implantation of mesenchymal stem cells overexpressing endothelial nitric oxide synthase improves right ventricular impairments caused by pulmonary hypertension. *Circulation*. 2006 Jul 4;114(1 Suppl):I181-5.

Kleinsmith RJ, Pierce GB Jr. Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells. *Cancer Res*. 1964 Oct;24:1544-51.

Kobayashi N, Delano FA, Schmid-Schonbein GW. Oxidative stress promotes endothelial cell apoptosis and loss of microvessels in the spontaneously hypertensive rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 Oct;25(10):2114-21.

Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, Prohaska SS, Scherer DC, Beilhack GF, Shizuru JA, Weissman IL. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu Rev Immunol.* 2003;21,759-806.

Kukharchuk OL, Radchenko VV, Sipman BM, Sahach VF. Effect of allotransplantation of embryonic pluripotent progenitor cells on dynamics of systemic arterial blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Fiziol Zh.* 2003;49(4):68-71.

Kurtz TW, Griffin KA, Bidani AK, Davisson RL, Hall JE; Subcommittee of Professional and Public Education of the American Heart Association Council on High Blood Pressure Research. Recommendations for blood pressure measurement in humans and experimental animals: part 2: blood pressure measurement in experimental animals: a statement for professionals from the Subcommittee of Professional and Public Education of the American Heart Association Council on High Blood Pressure Research. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 Mar;25(3):e22-33.

Le Noble FA, Stassen FR, Hacking WJ, Struijker-Boudier HA. Angiogenesis and hypertension. *J Hypertens.* 1998 Nov;16(11):1563-72.

Le Noble JL, Tangelder GJ, Slaaf DW, Van Essen H, Reneman RS, Struijker-Boudier HA. A functional morphometric study of the cremaster muscle microcirculation in young spontaneous hypertensive rats. *J Hypertens.* 1990;8:741-748.

Lee CW, Huang PH, Huang SS, Leu HB, Huang CC, Wu TC, Chen JW, Lin SJ. Decreased circulating endothelial progenitor cell levels and function in essential hypertensive patients with electrocardiographic left ventricular hypertrophy. *Hypertens Res.* 2011 Sep;34(9):999-1003.

Levy BI, Ambrosio G, Pries AR, Struijker-Boudier HA. Microcirculation in hypertension: a new target for treatment? *Circulation.* 2001;104:735-740.

Li F, Joshua IG. Decreased arteriolar endothelium-derived relaxing factor production during the development of genetic hypertension. *Clin Exp Hypertens.* 1993 May;15(3):511-26.

Lifton RP, Gharavi A, Geller D. Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell.* 2001;104:545-556.

Losordo DW, Dimmeler S. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease: part II: cell-based therapies. *Circulation*. 2004 Jun 8;109(22):2692-7.

Loss, IO. *Terapia Celular Na Hipertensão Arterial Espontânea em Ratos*. Tese de doutorado em Patologia, CPGP/UFTM, Uberaba-MG, 2011.

Luft FC. Molecular genetics of human hypertension. *J Hypertens*. 1998;16:1871-1878.

Malliani A, Pagani M, Lombardi F, Cerutti S. Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. *Circulation*. 1991 Aug;84(2):482-92.

Malpas SC. Sympathetic nervous system overactivity and its role in the development of cardiovascular disease. *Physiol Rev*. 2010 Apr;90(2):513-57.

Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G, Grassi G, Heagerty AM, Kjeldsen SE, Laurent S, Narkiewicz K, Ruilope L, Rynkiewicz A, Schmieder RE, Boudier HA, Zanchetti A, Vahanian A, Camm J, De Caterina R, Dean V, Dickstein K, Filippatos G, Funck-Brentano C, Hellems I, Kristensen SD, McGregor K, Sechtem U, Silber S, Tendera M, Widimsky P, Zamorano JL, Erdine S, Kiowski W, Agabiti-Rosei E, Ambrosioni E, Lindholm LH, Viigimaa M, Adamopoulos S, Agabiti-Rosei E, Ambrosioni E, Bertomeu V, Clement D, Erdine S, Farsang C, Gaita D, Lip G, Mallion JM, Manolis AJ, Nilsson PM, O'Brien E, Ponikowski P, Redon J, Ruschitzka F, Tamargo J, van Zwieten P, Waeber B, Williams B; Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension; European Society of Cardiology. 2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension, The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens*. 2007;25:1105-1187.

Mangi AA, Noiseux N, Kong D, He H, Rezvani M, Ingwall JS, Dzau VJ. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat Med*. 2003 Sep;9(9):1195-201.

Mason C, Manzotti E. Regen: the industry responsible for cell-based therapies. *Regen Med*. 2009 Nov;4(6):783-5.

Mason C, Brindley DA, Culme-Seymour EJ, Davie NL. Cell therapy industry: billion dollar global business with unlimited potential. *Regen Med*. 2011 May;6(3):265-72.

Matsumoto R, Omura T, Yoshiyama M, Hayashi T, Inamoto S, Koh KR, Ohta K, Izumi Y, Nakamura Y, Akioka K, Kitaura Y, Takeuchi K, Yoshikawa J. Vascular endothelial growth factor-expressing mesenchymal stem cell transplantation for the treatment of acute myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Jun;25(6):1168-73.

Matsuzaki Y, Kinjo K, Mulligan RC, Okano H. Unexpectedly efficient homing capacity of purified murine hematopoietic stem cells. *Immunity* 2004;20:87-93.

McIntyre M, Bohr DF, Dominiczak AF. Endothelial function in hypertension: the role of superoxide anion. *Hypertension*. 1999;34:539-545.

Meirelles Lda S, Nardi NB. Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Front Biosci*. 2009 Jan 1;14:4281-98.

Melo LG, Gnechi M, Pachori AS, Kong D, Wang K, Liu X, Pratt RE, Dzau VJ. Endothelium-targeted gene and cell-based therapies for cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 Oct;24(10):1761-74.

Melton DA, Cowan C. "Stemness", In: Robert Lanza, John Gearhart, Brigid Hogan, Douglas Melton, Roger Pedersen, James Thomson and Michael West, Editor(s), *Handbook of Stem Stem Cells*. Burlington: Academic Press; Pages xxv-xxxi, 2004.

Meneton P, Jeunemaitre X, De Wardener HE, Macgregor GA. Links Between Dietary Salt Intake, Renal Salt Handling, Blood Pressure, and Cardiovascular Diseases. *Physiol Rev*. 2005 Apr;85(2):679-715.

Moore MA. Cytokine and chemokine networks influencing stem cell proliferation, differentiation, and marrow homing. *J Cell Biochem Suppl*. 2002;38:29-38.

Murasawa S, Asahara T. Endothelial progenitor cells for vasculogenesis. *Physiology (Bethesda)*. 2005 Feb;20:36-42.

Murry CE, Keller G. Differentiation of Embryonic Stem Cells to Clinically Relevant Populations: Lessons from Embryonic Development. *Cell*. 2008 Feb 22;132(4):661-80.

Nafz B, Just A, Stauss HM, Wagner CD, Ehmke H, Kirchheim HR, Persson PB. Blood-pressure variability is buffered by nitric oxide. *J Auton Nerv Syst*. 1996 Mar 7;57(3):181-3.

Nafz B, Wagner CD, Persson PB. Endogenous nitric oxide buffers blood pressure variability between 0.2 and 0.6 Hz in the conscious rat. *Am J Physiol*. 1997 Feb;272(2 Pt 2):H632-7.

Nagaya N, Kangawa K, Kanda M, Uematsu M, Horio T, Fukuyama N, Hino J, Harada-Shiba M, Okumura H, Tabata Y, Mochizuki N, Chiba Y, Nishioka K, Miyatake K, Asahara T, Hara H, Mori H. Hybrid cell-gene therapy for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cells. *Circulation*. 2003 Aug 19;108(7):889-95.

Nakajima S, Ohashi J, Sawada A, Noda K, Fukumoto Y, Shimokawa H. Essential Role of Bone Marrow for Microvascular Endothelial and Metabolic Functions in Mice. *Circ Res*. 2012 Jun 22;111(1):87-96.

Neaton JD, Wentworth D. Serum cholesterol, blood pressure, cigarette smoking, and death from coronary heart disease. Overall findings and differences by age for 316,099 white men. Multiple Risk Factor. Intervention Trial Research Group. *Arch Intern Med*. 1992 Jan;152(1):56-64.

Nombela-Arrieta C, Ritz J, Silberstein LE. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011 Feb;12(2):126-31.

Noon JP, Walker BR, Webb DJ, Shore AC, Holton DW, Edwards HV, Watt GC. Impaired microvascular dilatation and capillary rarefaction in young adults with a predisposition to high blood pressure. *J Clin Invest*. 1997 Apr 15;99(8):1873-9.

Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*. 1963 Mar;27:282-93.

Oliveira LF. Avaliação das Células Tronco Mesenquimais de MO em Ratos Normotensos Wistar-Kyoto (WKY) e Espontaneamente Hipertensos (SHR). Dissertação de Mestrado em Patologia. CPGP/UFTM, Uberaba-MG, 2010.

Oliveira-Sales EB, Maquigussa E, Semedo P, Guilhermino LP, Camara NOS, Bergamaschi CT, Boim M, Campos RR. Mesenchymal stem cells decrease AT1 receptor in the RVLM and the hypertension in 2K-1C Wistar rats. *Autonomic Neuroscience*, Volume 163, Issues 1-2, 1 September 2011, Pages 82-83.

Oskowitz A, McFerrin H, Gutschow M, Carter ML, Pochampally R. Serum-deprived human multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) are highly angiogenic. *Stem Cell Res*. 2011 May; 6(3):215-25.

Pagani M, Somers V, Furlan R, Dell'Orto S, Conway J, Baselli G, Cerutti S, Sleight P, Malliani A. Changes in autonomic regulation induced by physical training in mild hypertension. *Hypertension*. 1988 Dec;12(6):600-10.

Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, Silva SA, Sousa AL, Mesquita CT, Rossi MI, Carvalho AC, Dutra HS, Dohmann HJ, Silva GV, Belém L, Vivacqua R, Rangel FO, Esporcatte R, Geng YJ, Vaughn WK, Assad JA, Mesquita ET, Willerson JT. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation*. 2003 May 13;107(18):2294-302.

Persson PB. The kidney and hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003 May;284(5):R1176-8.

Pillow RP, Epstein RB, Buckner CD, Giblett ER, Thomas ED. Treatment of bone-marrow failure by isogeneic marrow infusion. *N Engl J Med*. 1966;275:94-97.

Potts JT, Mckeown KP, Shoukas AA. Reduction in arterial compliance alters carotid baroreflex control of cardiac output in a model of hypertension. *Am J Physiol*. 1998 Apr;274(4 Pt 2):H1121-31.

Prewitt RL, Chen II, Dowell R. Development of microvascular rarefaction in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol*. 1982 Aug;243(2):H243-51.

Psaty BM, Smith NL, Heckbert SR, Vos HL, Lemaitre RN, Reiner AP, Siscovick DS, Bis J, Lumley T, Longstreth WT Jr, Rosendaal FR. Diuretic therapy, the alpha-adducin gene variant, and the risk of myocardial infarction or stroke in persons with treated hypertension. *JAMA*. 2002 Apr 3;287(13):1680-9.

Raff M. Adult Stem Cell Plasticity: Fact or Artifact? *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2003;19:1-22.

Rettig R, Grisk O. The kidney as a determinant of genetic hypertension: evidence from renal transplantation studies. *Hypertension*. 2005 Sep;46(3):463-8.

Romagnani P, Annunziato F, Liotta F, Lazzeri E, Mazzinghi B, Frosali F, Cosmi L, Maggi L, Lasagni L, Scheffold A, Kruger M, Dimmeler S, Marra F, Gensini G, Maggi E, Romagnani S. CD14+CD34low Cells With Stem Cell Phenotypic and Functional Features Are the Major Source of Circulating Endothelial Progenitors. *Circ Res*. 2005 Aug 19;97(4):314-22.

Rossant J. Stem Cells and Early Lineage Development. *Cell*. 2008 Feb 22;132(4):527-31.

Rubini R, Porta A, Baselli G, Cerutti S, Paro M. Power spectrum analysis of cardiovascular variability monitored by telemetry in conscious unrestrained rats. *J Auton Nerv Syst*. 1993 Dec;45(3):181-90.

Sanchez RA, Ayala M, Baglivo H, Velazquez C, Burlando G, Kohlmann O, Jimenez J, Jaramillo PL, Brandao A, Valdes G, Alcocer L, Bendersky M, Ramirez AJ, Zanchetti A. Latin America guidelines on hypertension. On Behalf Of The Latin America Expert Group. *J Hypertens*. 2009;27(5):905-922.

Schofield, R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*. 1978;4:7-25.

Sever PS, Poulter NR. A hypothesis for the pathogenesis of essential hypertension: the initiating factors. *J Hypertens Suppl.* 1989 Feb;7(1):S9-12.

Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF, Hammond WP. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood.* 1998;92:362-367.

Smallegange C, Hale TM, Bushfield TL, Adams MA. Persistent lowering of pressure by transplanting kidneys from adult spontaneously hypertensive rats treated with brief antihypertensive therapy. *Hypertension.* 2004 Jul;44(1):89-94.

Smallegange C, Kline RL, Adams MA. Transplantation of enalapril-treated kidneys confers persistent lowering of arterial pressure in SHR. *Hypertension.* 2003 Nov;42(5):932-6.

Smith TL, Hutchins PM. Central hemodynamics in the developmental stage of spontaneous hypertension in the unanesthetized rat. *Hypertension.* 1979;1:508-517.

Soloviev A, Prudnikov I, Tsyvkin V, Tishkin S, Kyruchenko S, Zelensky S, Ivanova I. Electrophysiological and contractile evidence of the ability of human mesenchymal stromal cells to correct vascular malfunction in rats after ionizing irradiation. *J Physiol Sci.* 2010 Mar;60(2):161-72.

Stamler J, Stamler R, Neaton JD. Blood pressure, systolic and diastolic, and cardiovascular risks. US population data. *Arch Intern Med.* 1993 Mar 8;153(5):598-615.

Stauss HM, Gödecke A, Mrowka R, Schrader J, Persson PB. Enhanced blood pressure variability in eNOS knockout mice. *Hypertension.* 1999 Jun;33(6):1359-63.

Stauss HM, Persson PB. Role of Nitric Oxide in Buffering Short-Term Blood Pressure Fluctuations. *News Physiol Sci.* 2000 Oct;15:229-233.

Strauer BE, Kornowski R. Stem cell therapy in perspective. *Circulation.* 2003;107:929-934.

Sullivan JM, Prewitt RL, Josephs JA. Attenuation of the microcirculation in young patients with high-output borderline hypertension. *Hypertension.* 1983;5:844-851.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007 Nov 30;131(5):861-72.

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 2006 Aug 25;126(4):663-76.

Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. *Circulation*. 1996 Mar 1;93(5):1043-65.

Thomas CJ, Rankin AJ, Head GA, Woods RL. ANP enhances bradycardic reflexes in normotensive but not spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1997;5:1126-32.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998 Nov 6;282(5391):1145-7.

Till JE, McCulloch CE. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*. 1961 Feb;14:213-22.

Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension*. 2004;44:248-252.

Travassoli M, Crosby WH. Transplantation of marrow to extramedullary sites. *Science*. 1968 Jul 5;161(3836):54-6.

Trippodo NC, Frohlich ED. Similarities of Genetic (Spontaneous) Hypertension. *Circ Res*. 1981 Mar;48(3):309-19.

Tsonis PA. Bridging Knowledge Gaps on the Long Road to Regeneration: Classical Models Meet Stem Cell Manipulation and Bioengineering. *Mol Interv*. 2007 Oct;7(5):249-50.

Umans JG, Levi R. Nitric oxide in the regulation of blood flow and arterial pressure. *Annu Rev Physiol*. 1995;57:771-90.

Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res*. 2004 Aug 20;95(4):343-53.

Verfaillie CM. Hematopoietic stem cells for transplantation. *Nat Immunol*. 2002;3:314-317.

Wang H, Olszewski B, Rosebury W, Wang D, Robertson A, Keiser JA. Impaired angiogenesis in SHR is associated with decreased KDR and MT1-MMP expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Mar 5;315(2):363-8.

Wang LD, Wagers AJ. Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011 Sep 2;12(10):643-55.

Williams RR, Hunt SC, Hopkins PN, Hasstedt SJ, Wu LL, Lalouel JM. Tabulations and expectations regarding the genetics of human hypertension. *Kidney Int Suppl.* 1994 Jan;44:S57-64.

Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature.* 1997;385:810-813.

Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cells niches. *Nat Rev Immunol.* 2006 Feb;6(2):93-106.

World Health Organization. Causes of Death 2008: Data Sources and Methods. Department Of Health Statistics And Informatics. Geneva; April 2011a.

World Health Organization. Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control. Geneva; 2011b.

World Health Organization. Global Health Risks: Mortality and burden of disease attributable to selected major risks. Geneva; 2009.

World Heart Organization. Global Status Report On Noncommunicable Diseases 2010. Geneva; 2010.

Xu W, Zhang X, Qian H, Zhu W, Sun X, Hu J, Zhou H, Chen Y. Mesenchymal Stem Cells from Adult Human Bone Marrow Differentiate into a Cardiomyocyte Phenotype In Vitro. *Exp Biol Med (Maywood).* 2004 Jul;229(7):623-31.

Yamori Y. Development of the spontaneously hypertensive rat (SHR) and of various spontaneous rat models, and their implications. In: De Jong W (ed.). *Experimental and Genetic Models of Hypertension. Handbook of Hypertension.* Elsevier, 1984;224-39.

Yoder MC. Defining human endothelial progenitor cells. *J Thromb Haemost.* 2009 Jul;7 Suppl 1:49-52.

Yoon YS, Wecker A, Heyd L, Park JS, Tkebuchava T, Kusano K, Hanley A, Scadova H, Qin G, Cha DH, Johnson KL, Aikawa R, Asahara T, Losordo DW. Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. *J Clin Invest.* 2005 Feb;115(2):326-38.

Zipori D. The nature of stem cells: state rather than entity. *Nat Rev Genet.* 2004 Nov;5(11):873-8.

Zubair AC, Silberstein L, Ritz J. Adult hematopoietic stem cell plasticity. *Transfusion.* 2002 Aug;42(8):1096-1101.

Zulli A, Buxton BF, Black MJ, Hare DL. CD34 Class III positive cells are present in atherosclerotic plaques of the rabbit model of atherosclerosis. *Histochem Cell Biol.* 2005 Dec;124(6):517-22.