



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

Carolina Salomão Lopes

Terapia celular com células mononucleares de medula óssea
cultivados em meio basal de endotélio na hipertensão arterial
sistêmica em ratos.

Uberaba

2011

Carolina Salomão Lopes

Terapia celular com células mononucleares de medula óssea cultivados em meio basal de endotélio na hipertensão arterial sistêmica em ratos.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas. Área de Concentração II: Imunologia, Microbiologia e Parasitologia

Orientador: Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva

Uberaba - MG

2011

Carolina Salomão Lopes

Terapia celular com células mononucleares de medula óssea
cultivados em meio basal de endotélio na hipertensão arterial
sistêmica 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 28 de abril de 2011, atendendo às normas da
legislação vigente da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Programa de
Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Área de concentração II: Imunologia,
Microbiologia e Parasitologia.

Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva
- Coordenador do Programa –

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva
- Orientador -

Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM

Dr. Eduardo Barbosa Coelho
Universidade de São Paulo - Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto. FMRP-USP

Dr. David N. Silva Teixeira
Universidade Federal do Triângulo Mineiro.
UFTM

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

L851t Lopes, Carolina Salomão
Terapia celular com células mononucleares de medula óssea cultivados
em meio basal de endotélio na hipertensão arterial sistêmica em ratos /
Carolina Salomão Lopes. – 2011.
74 f. : tab. ; fig.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) -- Universidade
Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2011.
Orientador: Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva.

1. Hipertensão arterial. 2. Células mononucleares. 3. Células da medula
óssea. 4. Fatores de crescimento de fibroblastos. 5. Terapia celular. I. Silva,
Valdo José Dias da. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. IV.
Título.

CDU 616.12-008.331.1

À minha mãe (madrecita), e ao meu irmão, pelo apoio incondicional neste e em todos os projetos em que me envolvo; por compartilhar angústias e dúvidas estendendo sempre uma mão amiga.

AGRADECIMENTOS

Poderia escrever uma tese inteira agradecendo todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho. Desde já agradeço a todos pelo carinho, auxílio, convivência, paciência e amizade

A DEUS,

pela coleção de oportunidades oferecidas no meu caminho, por ter me enriquecido com coragem, persistência e força de vontade para enfrentar os desafios impostos pela vida, por ter permitido que eu trilhasse meu caminho e chegasse até onde estou e por ter colocado, em meu caminho, pessoas incríveis, com as quais posso contar em qualquer circunstância.

A minha família por me ensinar com exemplos o significado das palavras amor, companheirismo, paciência, e pelo sacrifício imposto pela distância (100Km às vezes parecem 1000Km)

Ao meu orientador pela confiança em meu trabalho, pela orientação e por todas as oportunidades que me fizeram crescer, porque é a adversidade que desperta em nós capacidades que, em circunstâncias favoráveis teriam ficado adormecidas.

Aos técnicos da Bioquímica Marco Túlio, Flávio e Geraldo pela paciência e auxílio; aos técnicos da farmacologia Januário e Douglas, ao técnico da parasitologia Luciano, e a técnica do Laboratório multi-usuário Keila pelas ajudas prestadas e principalmente aos técnicos da Fisiologia sem os quais não seria possível desenvolver este trabalho: Ana Maria, sempre aconselhando e “dando seus puxões de orelha”, Marquinho pelos momentos de descontração e “loucuras”, Fausto, Donizete, ao amigo Glauco que faz tudo parecer simples com sua paciência e “jeitinho boa praça” e ao amigo vascaíno Lucas com sua piadas e pegadinhas, que sempre me pegam. A secretária da graduação Isabel, e da pós-graduação Bete que compartilhou todos os momentos dessa jornada.

Aos meus colegas da Fisiologia: Alethéia, Angélica, Carol Luchini e Justulin, Igor, Lidiane, Liciane, Lívia, Lucas, Octávio, Sun, Thales, Paola, Vanessa, pelo excelente convívio neste período, pelas contribuições a este trabalho e a outras atividades e pelos bons momentos compartilhados no dia-a-dia do laboratório.

As colegas de pós graduação que incontáveis vezes me fizeram rir, e compartilharam aulas, seminários, experimentos e conversas de corredor Ana Carolina, Karine, Larissa, Leo Baessa, Leo Almeida, Tiago, Ton e Vander. Em especial agradeço ao César e ao Marcos Vinicius pela contribuição na reta final do trabalho, pelos conselhos e pelo bom convívio.

As minhas queridas amigas Carol Capitelli, Geruza e Marília muito obrigada pelos incentivos e conselhos por todos os momentos em que fosfatamos, despolarizamos, rimos, jogamos conversa fora e pelo companheirismo nos momentos de angustias, dúvidas, alegrias e nos momentos de espera no banquinho em frente à sala do orientador.

As meninas que fizeram parte da República (Angélica, Débora, Estela, Franciele e Larissa), pelo convívio, pelos momentos de alegrias e de adversidades que fizeram de cada momento um aprendizado.

Á minha primeira orientada e amiga Marília Normanton, tivemos a oportunidade de aprender e crescer “cientificamente” juntas.

A Universidade Federal do Triângulo Mineiro-UFTM pela estrutura oferecida, ao programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas que possibilitou a execução desse trabalho e aos professores da Disciplina de Fisiologia, Luiz Carlos, Edson, Aldo Simone e Martins, pelo convívio e oportunidade de aprendizagem.

Agradeço a CAPES-REUNI pela concessão da bolsa de mestrado e ao órgãos de fomento FAPEMIG e CNPq pelo financiamento da pesquisa

*“Pra quem tem pensamento forte o impossível
é só questão de opinião”
(Chorão e Tiago Castanho)*

RESUMO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é definida pela pressão sistólica ≥ 140 mmHg e pressão diastólica ≥ 90 mmHg, afetando 1/5 da população mundial sendo um grande problema de saúde mundial. Inúmeros avanços têm sido realizados para o entendimento das bases fisiopatológicas desta síndrome. No entanto falta muito ainda por ser investigado para se conhecer bem a patogênese da hipertensão arterial, reconhecidamente de origem multifatorial. Apesar dos avanços farmacológicos, a HAS não apresenta cura definitiva. O presente trabalho foi realizado com objetivo de investigar os efeitos do transplante de células mononucleares cultivadas em meio basal de endotélio sobre os níveis pressóricos, como uma possível estratégia terapêutica. Células mononucleares (MNC) de medula óssea foram extraídas da tíbia e fêmur de 16 ratos espontaneamente hipertensos (SHR) machos de 16 semanas e em seguida plaqueadas em placas de cultura recobertas com fibronectina e cultivadas em meio basal de endotélio suplementado com fatores de crescimento por duas semanas. Fibroblastos, usados como células controle, foram extraídos da pele dos mesmos animais utilizados na extração das MNC. Células mononucleares cultivadas em meio basal de endotélio (n=14) ou fibroblastos (n=11) marcados com CM-Dil celltracker foram injetados intravenosamente (1×10^6 células/rato, i.v.) em fêmeas SHR de 16 semanas de idade. Fêmeas SHR (grupo controle; n=14) pareados por idade receberam veículo. A pressão arterial indireta foi analisada antes e após o transplante pelo método de pletismografia da cauda. No 15º dia pós-transplante, os animais foram anestesiados e canulados e após 24 h fez-se o registro direto de pressão arterial por 1 hora (frequência de amostragem de 1000Hz). A partir do sinal de pressão arterial direta séries temporais de pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e intervalo de pulso (IP) foram avaliadas por análise espectral autorregressiva mono e bivariada. Ao final, sob anestesia, a função endotelial sistêmica foi avaliada em cada animal medindo-se as respostas vasodepressoras à acetilcolina e nitroprussiato de sódio. Os resultados do presente trabalho não demonstrou diferença significativa entre os grupos em relação a pressão arterial média (151.12 ± 4.58 mmHg no grupo transplantado MNC; 151.82 ± 4.23 mmHg no grupo dos fibroblastos e 146.83 ± 3.91 mmHg no grupo controle, p=não significativo) e nem entre os parâmetros espectrais. A frequência cardíaca dos animais transplantados com fibroblastos foi menor quando comparada aos demais grupos (340.33 ± 10.67 bpm grupo fibroblasto; 369.96 ± 4.57 bpm no grupo tratado MNC e 374.47 ± 5.55 bpm no grupo controle, $p < 0,05$ * fibroblasto versus salina e #fibroblasto versus MNC). A sensibilidade barorreflexa espontânea quantificada pela análise espectral bivariada demonstrou melhora no grupo dos fibroblastos (0.85 ± 0.04 ms/mmHg grupo fibroblasto; 0.46 ± 0.03 ms/mmHg no grupo controle e 0.41 ± 0.04 ms/mmHg no grupo tratado com MNC, $p < 0,05$ #fibroblasto versus MNC). Entretanto, a função endotelial sistêmica não diferiu entre os grupos experimentais. Estes resultados indicam que células mononucleares de medula óssea cultivadas em meio basal de endotélio com propriedades funcionais de células endoteliais não apresentam capacidade efetiva de reduzir a pressão arterial e a frequência cardíaca em SHR. Por outro lado, fibroblastos foram capazes de melhorar a frequência cardíaca e a sensibilidade barorreflexa dos animais hipertensos.

Palavras chave: Hipertensão arterial sistêmica, Mononuclear, Fibroblasto, Terapia celular

ABSTRACT

Systemic arterial hypertension (SAH), defined as a systolic blood pressure ≥ 140 mmHg and diastolic blood pressure ≥ 90 mmHg, affects around 1/5 of entire world population, being a huge public health problem. Although several advances have been achieved to understand the pathophysiological base of the essential arterial hypertension, which represents 90-95% of cases of SAH, the complete framework of pathogenesis is not completely understood, deserving yet several efforts of basic and clinical investigative research. Despite of several and successful therapeutic strategies based mainly in pharmacological approach, essential hypertension has not yet a definitive cure, making imperative new therapy searching. The aim of the present study was to investigate the effects of mononuclear cell cultivated in endothelial basal medium (EBM) on arterial pressure (AP) levels as a possible therapeutic strategy. Mononuclear cells (MNC) were extracted from tibiae and femurs of 16 syngeneic donor male 16-weeks old SHR, and then MNC were plated on culture dishes coated with human fibronectin and cultured in endothelial cell basal medium-2 supplemented with growth factors for two weeks. Fibroblast used like control cells were extracted from skin of the same male SHR used. EBM cultivated mononuclear cells ($n=14$) or fibroblast ($n=11$) labeled with CM-Dil cell tracker were injected intravenously (1×10^6 cells/rat, i.v.) in 16-weeks old female receptor SHR. Age-matched female SHR (control group; $n=14$) have received vehicle. Indirect AP was recorded before and after transplantation by means of tail occlusion method. At the 15^o day, after previous castration (24 hs), all animals had their AP recorded during one hour in a computerized data analysis system (sampling rate of 1000Hz). The direct arterial pressure signal was analyzed by mono- or bivariate autoregressive spectral analysis. At the end, under anesthesia, systemic endothelial function was assessed by measuring the vasodepressor responses to acetylcholine and sodium nitroprussiate. After sacrifice, absolute and relative heart weight was measured. No significant differences were observed in mean AP of distinct groups (151.12 ± 4.58 mmHg for EBM cultivated MNC group, 151.82 ± 4.23 mmHg for fibroblast group and 146.83 ± 3.91 mmHg for control group, $p = \text{non significant}$) as well as in spectral parameters. Interestingly, the baseline heart rate of animals transplanted with fibroblasts was lower than those observed in other groups (340.33 ± 10.67 bpm*# fibroblast group, 369.96 ± 4.57 bpm for EBM-cultivated MNC group and 374.47 ± 5.55 bpm for control group, $p < 0.05$ * fibroblast versus control e #fibroblast versus EBM-MNC group). Spontaneous baroreflex sensitivity measured by bivariate spectral analysis showed an improvement in the fibroblast group 0.85 ± 0.04 ms/mmHg# fibroblast group, 0.46 ± 0.03 ms/mmHg in control group and 0.41 ± 0.04 in EBM-MNC group, $p < 0.05$ #fibroblast versus EBM-MNC). However, systemic endothelial function did not differ between groups. Absolute and relative heart weight did not differ among groups. These results indicate that EBM-cultivated mononuclear cell transplantation is not effective to reduce arterial blood pressure and heart rate in SHR, even though fibroblasts improve heart rate and spontaneous baroreflex sensibility.

Keyword: Systemic arterial hypertension, Monocyte, Fibroblast, Celular Terapy

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1: Sinal digital obtido através do registro basal (A) e representação gráfica da análise espectral bivariada (B) demonstrando uma seqüência de 300 batimentos com coerência superior a 0,5 e desvio de fase menor que zero.38
- Figura 2: Gate da população segundo os valores FSC E SSC, Isotipo, CD31/KDR, CD14/CD45, CD34 E CD4 para células mononucleares de medula óssea isoladas a fresco.40
- Figura 3: Gate da população segundo os valores FSC E SSC, Isotipo, CD31/KDR, CD14/CD45, CD34 E CD4 para células mononucleares de medula óssea cultivadas em meio endotelial completo no 3° dia de cultura.41
- Figura 4: Gate da população segundo os valores FSC E SSC, Isotipo, CD31/KDR, CD14/CD45, CD34 E CD4 para células mononucleares de medula óssea cultivadas em meio endotelial completo no 7° dia de cultura.42
- Figura 5: Gate da população segundo os valores FSC E SSC, Isotipo, CD31/KDR, CD14/CD45, CD34 E CD4 para células mononucleares de medula óssea cultivadas em meio endotelial completo no 15° dia de cultura.43
- Figura 6: Fotomicrografias das células mononucleares cultivadas em meio endotelial no 3°, 7° e 15° dias de cultura respectivamente demonstrando sua morfologia fusiforme.44
- Figura 7 :Fotomicrografias das células mononucleares cultivadas em meio endotelial completo por 7 dias (à direita), demonstrando sua morfologia fusiforme e após cultivo sobre matrigel durante o teste de formação de tubos vasculares *in vitro*.....45
- Figura 8: Fotomicrografias dos monócitos submetidos ao teste de identificação de células progenitoras de endotélio (A) marcação com DAPI corante específico de núcleo;(B) Lectina BS-1 corante de membrana de endotélio; (C) Dil-Ac-LDL corante que demonstra a capacidade das células de fagocitar LDL acetilado; (D)Merge demonstrando as células triplo marcadas.46
- Figura 9: Fotomicrografia dos fibroblastos em cultura corados por Picrosirius. Note a coloração arroxeadada em torno e sobre os fibroblastos indicando a presença de colágeno secretado para o meio extra-celular.....47
- Figura 10: Fotomicrografias dos fibroblastos em contraste de fase (A) e submetidos à indução de diferenciação em linhagem osteogênica (B) e linhagem adipogênica (C).47
- Figura 11: Evolução temporal da pressão arterial sistólica (média±epm) medida indiretamente pelo método de pletismografia.....48
- Figura 12: Evolução temporal da frequência cardíaca (média±epm) medida indiretamente pelo método de pletismografia.*p<0.05 (Fibroblasto versus MNC+EBM)49
- Figura 13: Curvas dose-resposta (média±E.P.M.) da hipotensão arterial induzida por doses crescentes de acetilcolina (painel A) e nitroprussiato de sódio (painel B).53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores percentuais da cinética da cultura de células mononucleares de machos SHR cultivadas em placas recobertas com fibronectina durante 15 dias em meio EBM-2; os marcadores utilizados estão indicados na coluna à esquerda.	39
Tabela 2: Valores basais médios (\pm epm) dos parâmetros hemodinâmicos frequência cardíaca (FC), pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM).	50
Tabela 3: Valores médios (\pm epm) da pressão arterial diastólica (PAD), variância e dos componentes espectrais VLF, LF e HF da variabilidade da PAD nos grupos experimentais.	50
Tabela 4: Valores médios (\pm epm) da pressão arterial sistólica (PAS), variância e dos componentes espectrais VLF, LF e HF da variabilidade da PAS nos grupos experimentais.	50
Tabela 5: Valores médios (\pm epm) do intervalo de pulso (IP), da variância e dos componentes espectrais VLF, LF e HF dos grupos experimentais	51
Tabela 6: Valores médios das porcentagens de trechos coerentes (\pm epm) no registro basal de uma hora.....	51
Tabela 7: Valores médios (\pm epm) do alfa-índice, um índice de sensibilidade barorreflexa espontânea, calculados para a banda LF das oscilações de IP e PAS.	52
Tabela 8: Valores médios (\pm epm) do peso cardíaco absoluto e relativo que consiste na razão entre o peso cardíaco absoluto e o peso corpóreo do animal.	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	Antagonista de Canal de Cálcio
ac LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade Acetilada
Ach	Acetilcolina
ADSCs	Células troncos derivadas de tecido adiposo
AT1	Receptor de angiotensina 1
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BS-1	lectina Bandeira simpiforme-1
CD	Cluster de diferenciação
CEUA	Comitê de ética de uso de animais
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DIL CM	Cell Tracker DIL
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EBM-2	Meio de crescimento endotelial
EDHF	Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EPC	Células Progenitoras Endoteliais
epm	Erro padrão médio
FC	Frequência cardíaca
FC	Fração cristalizável de imunoglobulina
FITC	isotiocianato de fluoresceína
HA	Hipertensão Arterial
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HDL	Lipoproteína de alta densidade
hEGF	Fator de crescimento de endotélio humano
HF	Componente de Alta frequência
HF (nu)	Componente de alta frequência normalizado
i.p	Intraperitoneal
IP	Intervalo de pulso
IECA	Inibidor da enzima conversora de angiotensina
IGF-1	Fator de crescimento semelhante a insulina -1
ISCT	Sociedade Internacional de Terapia Celular
Kg	Kilogramas
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LF	Componente de Baixa frequência
LF (nu)	Componente de baixa frequência normalizado
LF/HF	Razão LF/HF
μl	Mililitro
μM	Milimolar
MNC	Mononuclear
MSC	Células Tronco mesenquimais
MΦ	Monócito
NIH	Instituto Nacional de Saúde

nM	Nanomolar
NO	Oxido Nitrico
NPS	Nitropussiato de Sódio
NTS	Núcleo do Trato Solitário
PA	Pressão Arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
PE	Ficoereitrina
PGH2	Prostaglandina H2
SBF	Soro bovino fetal
SHR	Ratos Espontaneamente Hipertensos
SHR-CON	Ratos Espontaneamente Hipertensos tratado com veículo
SHR-FIB	Ratos Espontaneamente Hipertensos tratado com fibroblasto
SHR-MNC+EBM	Ratos Espontaneamente Hipertensos tratado com mononuclear cultivada em meio basal de endotélio
SNC	Sistema Nervoso Central
VEGF	Fator de crescimento Endotélio Vascular
VEGFR	Receptor do Fator de Crescimento Endotélio Vascular
VLF (nu)	Componente de muito baixa frequência normalizado
vWF	fator de von Willebrand
µg	Miligrama
µl	Microlitro
µm	Micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 OBJETIVOS.....	28
2.1 OBJETIVO GERAL	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	29
3.1.2 Grupos Experimentais.....	29
3.2 ISOLAMENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA.....	29
3.3 ISOLAMENTO DE FIBROBLASTOS.....	30
3.4 PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS PARA TRANSPLANTE.....	31
3.5 CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA	31
3.6 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E FUNCIONAL DAS CÉLULAS CULTIVADAS	32
3.6.1 Identificação de células endoteliais	32
3.6.2 Ensaio de formação de tubo vascular <i>in vitro</i>	33
3.6.3 Identificação de fibroblastos secretoras de colágeno	33
3.6.4 Capacidade de diferenciação celular dos fibroblastos	33
3.6.4.1 Diferenciação osteogênica	33
3.6.4.2 Diferenciação adipogênica.....	34
3.7 PROTOCOLO EXPERIMENTAL	34
3.8 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	35
3.9 ANÁLISE DOS DADOS.....	35
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
4 RESULTADOS	39
4.1 CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DA POPULAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DERIVADAS DE MEDULA ÓSSEA, CULTIVADAS EM MEIO ENDOTELIAL COMPLETO SOBRE FIBRONECTINA DURANTE 15 DIAS	39
4.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLOGICA E FUNCIONAL DAS CÉLULAS MONONUCLEARES CULTIVADAS EM EBM-2 E DOS FIBROBLASTOS	44
4.3 EVOLUÇÃO TEMPORAL DA PRESSÃO ARTERIAL E DA FREQUÊNCIA CARDÍACA	48
4.4 VALORES HEMODINÂMICOS BASAIS	49
4.5 VARIABILIDADE CARDIOVASCULAR	50
4.6 ANÁLISE DA COERÊNCIA E ALFA ÍNDICE	51
4.7 FUNÇÃO ENDOTELIAL	52

4.9 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	54
5 DISCUSSÃO.....	55
6. CONCLUSÃO	63
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFIAS	64

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares são uma das maiores causas de óbito tanto no Brasil como em diversos países do mundo. Estudos publicados no início deste século mostraram forte relação existente entre hipertensão arterial (HA), doença coronária e insuficiência cardíaca, atingindo níveis de 27% nas mulheres e 37% nos homens, para eventos cardiovasculares (Borelli *et al.*, 2008). Mesmo quando não são fatais, as doenças cardiovasculares como o Acidente Vascular Cerebral (AVC – isquêmico e hemorrágico), doenças coronarianas, aneurisma de aorta, Insuficiência cardíaca, doenças de válvulas do coração, entre outras, levam muitas das vezes os pacientes à invalidez (parcial ou total) (Guyton *et al.*, 2002). Dados da VI Diretrizes Brasileira de Hipertensão (2010) colocaram a doença cerebrovascular como a principal causa de morte no Brasil, sendo a HA responsável por 40% desses óbitos.

A HA é dividida em hipertensão essencial, que corresponde a aproximadamente 95% dos casos de hipertensão e se caracteriza essencialmente por não possuir uma causa bem definida; e hipertensão secundária, a qual é resultante de alguma condição desencadeadora primária, como por exemplo doenças renais, feocromocitoma, administração de drogas, dentre outros (World Health Organization, 1999; Binder, 2007)

A hipertensão arterial é por definição a elevação crônica na média de 24 horas da pressão sanguínea (Guyenet, 2006), é uma síndrome clínica caracterizada por níveis de pressão sanguínea sistólica iguais ou superiores a 140 mmHg ou níveis de pressão sanguínea diastólica iguais ou superiores a 90 mmHg com maior prevalência no mundo, afetando 1/5 da população (Cooper *et al.*, 2008). Embora inicialmente assintomática esta síndrome está associada a inúmeras alterações em órgãos alvos como coração, rins, cérebro, vasos sanguíneos, etc; com profundo impacto na morbi-mortalidade nas populações do mundo ocidental.

O aumento da resistência vascular é a base hemodinâmica da anormalidade do estado hipertensivo crônico. Embora vários fatores estejam envolvidos na patogenia, dois mecanismos fundamentais podem delinear o aumento da resistência periférica na maioria dos estados hipertensivos: defeito na musculatura lisa, que aumenta a vasoconstrição associado a um tônus simpático aumentado. O defeito na musculatura lisa, a hiperativação do simpático ou ambos podem ser adquiridos ou serem de ordem genética (Francois *et al.*, 1982).

Neste contexto, o modelo de hipertensão espontânea em ratos (ratos espontaneamente hipertensos – “spontaneously hypertensive rats” - SHR), desenvolvido originalmente a partir de endo-cruzamentos seletivos de ratos da cepa Wistar em Kyoto no Japão em 1963 (Okamoto *et al.*, 1963), é o modelo mais estudado na literatura. A sua importância tem sido creditada à similaridade da sua patogenia com a hipertensão arterial essencial humana, embora algumas ressalvas devam ser feitas (Trippodo *et al.*, 1981).

Os mecanismos associados com o aumento da pressão arterial devem-se principalmente ao aumento da resistência periférica acompanhado de um débito cardíaco normal ou reduzido (Coleman *et al.*, 2008). Uma das causas mais importantes do aumento da resistência periférica total na hipertensão arterial é a hiperatividade do sistema nervoso simpático, que tem sido considerada um marco da hipertensão essencial nos seres humanos, bem como no modelo animal de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (Judy *et al.*, 1976). Além da hiperatividade simpática, várias outras alterações tem sido descritas na HAS, tais como hiperatividade do sistema renina-angiotensina, disfunção endotelial, rarefação microvascular e outros (Brooks, *et al.*, 2005).

Os mecanismos implicados na disfunção endotelial encontrada na hipertensão parecem depender do tipo de hipertensão desenvolvida, da sua duração e do leito vascular estudado. Os seguintes mecanismos foram propostos: 1) Diminuição na liberação de óxido nítrico (NO), prostaciclina e/ou EDHF (fator hiperpolarizante derivado do endotélio); 2) sensibilidade diminuída do músculo liso vascular ao NO, prostaciclina e/ou EDHF; 3) disfunção na via de transdução de sinais dos fatores relaxantes endoteliais; 4) aumento da produção de PGH₂, tromboxana A₂, endotelina-1 e/ou dos ânions superóxido (Carvalho *et al.*, 2001). Pacientes hipertensos e animais SHR demonstram aumento dos níveis plasmáticos de superóxido e peróxido hidrogênio, comprometendo o relaxamento dependente do endotélio.

A disfunção endotelial está diretamente relacionada com o agravamento da hipertensão devido ao aumento da resistência periférica total e lesões crônicas em órgãos alvos (Touyz *et al.*, 2004). A rarefação microvascular, que está associada a disfunção endotelial é uma característica importante nos animais SHR e na HAS em humanos. Esta rarefação resulta em uma perda significativa de vasos da microcirculação, contribuindo para a elevação da pressão sanguínea. Os

mecanismos responsáveis não foram completamente elucidados, mas parece envolver uma angiogênese defeituosa (Levy, 2001), ou seja, falha na formação de novos vasos por proliferação e migração de células endoteliais, um mecanismo mediado por fatores angiogênicos como o VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), angiopoietina 1 e 2, etc. (Wang, *et al.*, 2004).

Dadas as características deste modelo e a sua similaridade com a hipertensão essencial humana, estratégias terapêuticas anti-hipertensivas são normalmente estudadas em SHR. Inúmeros avanços têm sido realizados para o entendimento das bases fisiopatológicas da HAS, no entanto falta muito ainda por ser investigado para se conhecer bem a patogênese da hipertensão arterial, reconhecidamente de origem multifatorial. Um enorme arsenal terapêutico dotado de grande eficácia no tratamento da HAS e de suas conseqüências está atualmente disponível e podem ser divididos em: tratamentos não medicamentosos (consumo controlado de sódio e álcool, ingestão de potássio, combate ao sedentarismo, tabagismo e alimentação saudável associado com exercício físico) e tratamentos medicamentosos (utilização de diuréticos, betabloqueadores, inibidores da enzima conversora da angiotensina (IECA), bloqueadores do receptor AT1 e antagonistas dos canais de cálcio (ACC)), apresentando grande impacto na melhoria da qualidade de vida e redução da morbi-mortalidade de indivíduos hipertensos (Ganten *et al.*, 1994; VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2010).

O século XX foi marcado por inúmeros progressos na área médica, sendo o desenvolvimento de técnicas de transplante de órgãos sólidos e de medula óssea um dos mais fascinantes avanços. A restauração da hematopoiese através da infusão de células-tronco hematopoéticas conduziram ao emprego já bem estabelecido do transplante de medula óssea no tratamento de várias doenças hematológicas malignas e benignas (Gaziev *et al.*, 2005; Gluckman *et al.*, 1995; Child *et al.*, 2003; Holmberg *et al.*, 2003). A virada do século XXI foi marcada pelo uso de células-tronco para regenerar tecidos lesados outrora considerados irreparáveis. Por definição as células tronco são células indiferenciadas, não apresentam função específica nos tecidos e são capazes de se proliferar mantendo-se no estado indiferenciado por tempo indeterminado. As células tronco tem como principal característica a auto-regeneração e permite que o compartimento de células tronco seja mantido constante ao longo do tempo e também apresenta a capacidade de se diferenciar em células maduras, demonstrando atividades

funcionais normais como a de outras células do tecido em que se localizam, a este processo denomina-se diferenciação (Santos *et al.*, 2004). Resultados encorajadores de inúmeros estudos impulsionaram o início de estudos clínicos com transplante de células-tronco em várias doenças, particularmente as doenças cardiovasculares e neurológicas. Embora ainda distante do entendimento do mecanismo preciso pelo qual as células-tronco regeneram órgãos lesados, os estudos publicados, sendo vários destes envolvendo seres humanos, sugerem haver um benefício real com esta terapia até o presente momento (Mota *et al.*, 2005).

Até recentemente, pensava-se que as células tronco adultas (tecido específicas) somente poderiam se diferenciar em células do tecido de origem. Entretanto, vários estudos parecem indicar que células tronco adultas podem se diferenciar em outras linhagens que não a do tecido de origem, como por exemplo, células gliais e neurônios do SNC (Kopen *et al.*, 1999, Mezey *et al.*, 2000), músculo esquelético (Ferrari *et al.*, 1998), músculo cardíaco (Orlic *et al.*, 2001, Jackson *et al.*, 2001), hepatócitos (Theise *et al.*, 2000, Lagasse *et al.*, 2000), epitélio (Krause *et al.*, 2001).

Entre as células tronco adultas, aquelas derivadas de medula óssea têm sido as mais estudadas. A medula óssea de humanos e animais é um compartimento celular muito complexo composto por muitos constituintes celulares, dentre os quais existe uma fração de células mononucleares representadas por blastos, monócitos, linfócitos e várias outras linhagens celulares presentes. Dois grupos distintos de células tronco têm sido amplamente caracterizados: as células tronco hematopoiéticas e as células tronco mesenquimais (Verfaillie, 2002, Zubair *et al.*, 2002, Perin *et al.*, 2003). As células tronco hematopoiéticas apresentam a capacidade de auto-renovação e diferenciação, especificamente em todas as linhagens de células sanguíneas. Existem atualmente algumas moléculas bastante utilizadas para a identificação e o isolamento de células tronco hematopoiéticas, dentre elas encontram-se as moléculas c-Kit (receptor tirosina-quinase) e Sca-1 (antígeno 1 de célula tronco) (Orkin *et al.*, 2008). As células tronco mesenquimais por definição da International Society for Cellular Therapy apresentam a propriedade de aderência ao plástico sob condições de cultura padrão, capacidade de se diferenciar *in vitro* em osteoblastos, adipócitos e condroblastos; e expressam os marcadores de superfície CD105, CD73 e CD90; e não expressam os marcadores de superfície CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 ou CD19, e HLA-

DR (Keating, 2006). Um terceiro grupo celular é composto pelas células progenitoras endoteliais (EPC), identificadas também na fração de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos adultos, as quais apresentam alta expressão do marcador de superfície CD34 e podem se diferenciar após sete dias de cultura sobre fibronectina em células endoteliais CD31+, Tie-2+ e VEGFR2+ (receptor 2 para fator de crescimento endotelial vascular) (Schatteman *et al.*, 2007). Estas células demonstraram um papel importante na neovascularização pós-natal e na diferenciação endotelial (Asahara *et al.*, 1997, Shi *et al.*, 1998). A neovascularização é exclusivamente resultado da proliferação, migração e remodelamento das células endoteliais diferenciadas derivadas de vasos sanguíneos pré-existentes. Este processo é chamado de angiogênese (Folkman, 1971). Por outro lado, a vasculogênese é definida como a formação de vasos sanguíneos embrionários a partir de células progenitoras endoteliais ou angioblastos (Risau *et al.*, 1995). Com a descrição de EPC funcionais e circulantes no sangue periférico de indivíduos adultos, foi demonstrado que a formação de novos vasos parece não depender somente da angiogênese, mas inclui também o recrutamento de EPCs derivadas da medula óssea, um fenômeno denominado de vasculogênese pós-natal (Murasawa *et al.*, 2005).

Uma característica funcional marcante das EPCs é a sua capacidade de fagocitar lipoproteína de baixa densidade (LDL) acetilado (acLDL), se ligar a lectinas vegetais específicas (derivadas de *Ulex europeus* ou *Bandiera simplifolia*) e formar estruturas tubulares *in vitro* quando cultivadas sobre matrigel (Schatteman, *et al.*, 2007). Todas estas características são também encontradas em células endoteliais adultas, indicando o comprometimento das EPCs com a diferenciação endotelial.

As células progenitoras endoteliais encontram-se com número ou capacidade funcional reduzidas em situações clínicas, tais como, hipercolesterolemia, insuficiência cardíaca, envelhecimento, aterosclerose, diabetes mellitus. (Asahara *et al.*, 2004, Urbich *et al.*, 2004). Em um sub-grupo de pacientes hipertensos, Vasa *et al.*, (2001) verificaram uma atenuação da capacidade das células progenitoras endoteliais de formarem vasos sanguíneos *in vitro*. Mais recentemente, Hill *et al.*, (2004) verificaram uma forte correlação positiva entre disfunção endotelial e o número de células progenitoras endoteliais circulantes em pacientes com vários fatores de risco cardiovascular, inclusive, em hipertensos. A hipertensão está associada com a disfunção endotelial, que desempenha um papel

principal no desenvolvimento e progressão da arteriosclerose e complicações clínicas associadas. Uma série de estudos básicos e clínicos com células progenitoras endoteliais tem sido realizada no contexto da hipertensão arterial sistêmica e ainda que algumas controvérsias possam existir, o número ou a atividade funcional das EPCs está comprometido na hipertensão arterial sistêmica (Magen *et al.*, 2010).

Aparentemente todas as modalidades de células tronco de medula óssea acima descritas apresentam uma elevada capacidade de diferenciação em células endoteliais, contribuindo de forma marcante para a neo-vascularização pós isquemia ou neo-endotelização pós lesão. Assim, tomando-se em consideração que 1) a disfunção endotelial e a rarefação microvascular são alterações marcantes na patogenia da hipertensão (McIntyre *et al.*, 1999, Touyz, 2004), 2) que as mesmas participam no mecanismo fisiopatológico das manifestações crônicas da hipertensão arterial (Prewitt, *et al.*, 1982) e que 3) o número ou a capacidade funcional das células tronco e/ou progenitoras de medula óssea está reduzido na hipertensão arterial (Werner, *et al.*, 2005), pode-se inferir que a reposição e/ou mobilização das mesmas poderia trazer algum benefício terapêutico na hipertensão arterial.

De fato, Dias da Silva e cols. (2005) demonstraram que a administração de 10^7 células mononucleares extraídas de medula óssea de SHR machos injetadas por via endovenosa em SHR fêmeas receptoras reduziu a pressão arterial em cerca de 25-30 mmHg por cerca de duas semanas consecutivas, além de melhorar a função endotelial avaliada pela resposta vasodilatadora à acetilcolina na circulação renal in vivo. Como os SHR são animais isogênicos, tal redução da pressão arterial muito provavelmente não pode ser atribuída a uma eventual reação de rejeição imunológica. Ainda que estes dados mostrem a eficácia do transplante de células de medula óssea no contexto da hipertensão arterial, eles não permitem identificar qual tipo celular presente na medula óssea estaria exercendo este efeito. Dados preliminares de Dias da Silva e cols. (2009) parecem sugerir que células progenitoras endoteliais CD133+/KDR+, isoladas a fresco por imunoadsorção magnética da fração mononuclear da medula óssea, podem exercer algum efeito anti-hipertensivo, com redução da pressão arterial em torno de 15 mmHg por cerca de 14 dias em ratos SHR. Entretanto, dado o baixo percentual destas EPCs (CD133+/KDR+) na medula óssea (menos que 0,25%), a separação a fresco por imunoadsorção magnética resultou num número muito baixo de células isoladas, o

que, num contexto translacional para uma situação clínica real, tornaria todo o processo de isolamento muito pouco eficiente e muito dispendioso. Uma alternativa extremamente atrativa seria o cultivo *in vitro* das EPCs, no intuito de aumentar o número final de células disponíveis para o transplante.

Ainda que o fenótipo clássico descrito originalmente por Asahara e cols. (1997), com a expressão dos marcadores de superfície CD34, KDR e mais recentemente CD133, seja bem aceito para a caracterização das EPCs, vários trabalhos científicos recentes têm identificado outros tipos celulares derivados da medula óssea com propriedades vasculogênicas (Seta *et al.*, 2007 e 2010), dentre estes tipos celulares, fibrócitos, linfócitos e mais comumente monócitos têm sido descritos (Seta *et al.*, 2007 e 2010).

Os fibrócitos são uma população de células circulantes com propriedades de fibroblasto e foram descritos em 1994 por Bucala e colaboradores. Este tipo celular apresenta fenótipo distinto CD45, CD34 e colágeno tipo I positivos e apresenta uma série de receptores de quimiocinas, como CCR7 CXCR4, CCR2 contribuindo na cicatrização (Moore *et al.*, 2005 e Phillips *et al.*, 2004). Fibrócitos podem ser enriquecidos através da cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) em placas recobertas por fibronectina ou colágeno tipo I (Bucala *et al.*, 1994). São células importantes na formação de novos vasos durante os primeiros estágios da cicatrização com base em sua presença precoce dentro do tecido lesado e a capacidade de induzir fenótipo angiogênico em cultura de células endoteliais e promover angiogênese *in vivo* (Hartlapp *et al.*, 2001).

Os linfócitos são um tipo de leucócito e apresentam papel crucial na resposta imune, estão presentes no sangue e se originam das células estaminais hematopoiéticas da medula óssea, através das células-tronco linfóides que se diferenciam em células pré B e pró-timócitos. Os pró-timócitos dão origem aos Linfócitos T que por sua vez vão amadurecer nos tecidos linfóides; já as células pré B dão origem aos Linfócitos B. Por sua aparência ao microscópio, há duas categorias de linfócitos: os grandes, que em sua maioria são granulares e podem ser denominados de Natural Killer (células NK ou exterminadoras naturais) e pequenos com núcleo redondo, cromatina condensada e citoplasma escasso denominados de linfócitos T e B (Abbas *et al.*, 2008). Hur e colaboradores em 2007 relataram pela primeira vez a presença de uma nova subpopulação de células T (CD3+, CD31+, CXCR4+) cruciais na formação e manutenção de colônias de

EPC, apresentando influência na diferenciação e angiogênese desse tipo celular. Linfócitos CD3+/CD31+ representam uma população restrita com grande capacidade de migração, liberação de fatores de crescimento angiogênicos, maior suscetibilidade a apoptose quando comparada com células CD3+/ CD31- (Kushner *et al.*, 2010); além de suas propriedades angiogênicas e vasculogênicas desempenhando um papel importante na prevenção de doenças cardiovasculares, prevendo a ocorrência de placas de trombose em camundongos knockout para ApoE (Caligiuri *et al.*, 2005) e clinicamente células T CD31+ circulantes estão inversamente relacionada com o tamanho da lesão aterosclerótica em pacientes com aneurisma da aorta abdominal artereosclerótica (Caligiuri *et al.*, 2006).

Os monócitos são leucócitos assim como os linfócitos e apresentam papel importante na imunidade, participando de processos inflamatórios, remodelamento tecidual através da fagocitose, processamento e apresentação de antígenos e também pela produção de citocinas (Swirski *et al.*, 2006). A plasticidade dos monócitos é um fenômeno bem documentado. Monócitos isolados de diferentes sítios anatômicos apresentam fenótipos e capacidades distintas (Cline *et al.*, 1978 e Godon, 1995). A função do monócito é dependente em parte dos sinais recebidos do micro-ambiente, sugerindo que a heterogeneidade dos monócitos surge de uma condição única dentro de um tecido específico (Miyamoto *et al.*, 2001).

Harraz e colaboradores (2001) comprovaram a capacidade dos monócitos de atuarem como células progenitoras de endotélio, considerando que os monócitos apresentam a capacidade de atravessar a parede de vasos frente a uma lesão e compartilham antígenos de superfície com as células endoteliais e são responsivos ao fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Outros estudos comprovaram que células mononucleares CD14+ (um marcador de monócitos) podem se desenvolver em células parecidas a endotélio na presença de fatores de crescimento angiogênicos. Nas primeiras 24 horas de cultura as células CD14+ são relativamente aderentes e com o tempo de cultura as células apresentam transformações morfológicas como núcleos excêntricos e células ovaladas. Após uma semana as células expressam marcadores de endotélio, incluindo fator de von Willebrand (vWF), CD144 (VE-caderina), CD105 (endogлина), receptor de lipoproteína de baixa densidade acetilado (LDL-Ac), CD36 (receptor da trombospondina), FLT-1 (receptor VEGF-1), e KDR (receptor VEGF -2) (Fernandez-Pujol *et al.*, 2000 e Moldovan *et al.*, 2000).

Um eventual efeito do transplante de células mononucleares derivadas de medula óssea cultivados em ambiente estimulador de diferenciação endotelial sobre os aspectos hemodinâmicos e funcionais no contexto da hipertensão arterial sistêmica ainda não foi testado até o presente momento. Considerando que as células monoclueras são compostas por uma variedade de células com capacidade de diferenciação em células endoteliais quando devidamente estimuladas com fatores de crescimento angiogênicos, nosso grupo lançou a hipótese de que células mononucleares derivadas de medula óssea cultivadas em meio basal endotelial poderiam apresentar efeitos anti-hipertensivos benéficos no contexto da hipertensão arterial sistêmica.

Para testar a hipótese acima, o desenho experimental clássico prevê a comparação do grupo de animais hipertensos que receberá as células com um grupo hipertenso controle que receberá somente o veículo de suspensão das células. Entretanto, para descartar um eventual efeito inespecífico das células transplantadas cultivadas em meio basal de endotélio, no presente trabalho incluímos um terceiro grupo experimental formado por animais hipertensos que receberam células mais maduras, como os fibroblastos da derme, cultivados em meio sem fatores de crescimento para endotélio os quais reconhecidamente são células muito pouco capazes de se diferenciarem em endotélio e formarem tubos capilares.

Os fibroblastos são classificados como células mesenquimais maduras e são predominantemente encontrados em tecidos conectivos ou danificados, são importantes nos mecanismos de reparação tecidual e na fase de remodelamento dos tecidos (Pan, *et al.*, 2006). Os fibroblastos apresentam a capacidade de sintetizar as fibras colágenas e elásticas, as glicoproteínas (tenascinas e fibronectina) e as proteoglicanas da matriz extracelular, sendo considerados uma célula ativa (Minor, 1988). Morfologicamente os fibroblastos têm prolongamentos citoplasmáticos irregulares, seu núcleo é claro, grande, de forma ovóide, com cromatina fina e nucléolo evidente. O citoplasma é rico em retículo endoplasmático rugoso e o aparelho de Golgi é desenvolvido (Heathcote *et al.*, 1981). No tecido conjuntivo adulto os fibroblastos não se dividem com frequência, entrando em mitose apenas quando estimulados, por exemplo, nas lesões do tecido conjuntivo (Stites *et al.*, 1992). Os fibroblastos são frequentemente um fenótipo contaminante em sistemas de culturas, sendo muito difícil aplicar técnicas que eliminem com êxito

esse tipo celular, outra propriedade notável dos fibroblastos é que eles são morfológicamente indistinguíveis de MSC, ambos se proliferam muito bem em cultura e compartilham os mesmos marcadores de superfície. A melhor maneira de distinguir fibroblastos de MSC até o presente momento baseia-se em análises das propriedades funcionais, sendo que as MSC possuem capacidades de diferenciação e auto-renovação maior que os fibroblastos (Lorenz *et al.*, 2008). Blasi e colaboradores (2011) relataram que células mesenquimais derivadas de tecido adiposo (AD-MSCs) apresentam um potencial angiogênico e anti-inflamatório muito maior quando comparado com fibroblastos normais da derme humana (HNDFs) e na presença de TNF- α AD-MSCs melhoram a atividade anti-inflamatória enquanto os HNDFs aumentam o processo inflamatório.

Oliveira (2010) relatou um déficit funcional nas células tronco mesenquimais de SHR, evidenciado pelos ensaios de proliferação celular, de expansão até a senescência e diferenciação osteogênica e adipogênica, os quais se encontram significativamente alterados em comparação a ratos normotensos WKY. Tais disfunções podem estar relacionadas a modificações genéticas existentes no modelo de hipertensão do SHR, ou então ser uma consequência da exposição das MSCs ao micro-ambiente hipertensivo dos SHRs por tempo prolongado. Embora exista um déficit funcional não só das células MSC mas como de vários outros tipos celulares na hipertensão, resultados promissores de redução da pressão e melhora da função endotelial foram encontrados pelo grupo de (2005) após a administração isogênica por via endovenosa de 10^7 células mononucleares extraídas de medula óssea de SHR machos em SHR fêmeas receptoras.

Considerando a síndrome clínica descrita em hipertensos que prevê um aumento da resistência periférica total (RPT), decorrente de uma intensa vasoconstrição e da rarefação microvascular, definida como uma reduzida densidade espacial de vasos de pequeno calibre, sendo decorrente de destruição vascular e de angiogênese deficiente associado aos resultados prévios do nosso grupo de pesquisa Dias da Silva e cols., o presente estudo avaliou os efeitos terapêuticos da administração de células mononucleares cultivadas em meio basal de endotélio dada a facilidade de isolamento e expansão em cultura, além de selecionar um tipo celular com capacidade de neovascularização, e em paralelo avaliamos o potencial terapêutico de células maduras, como os fibroblastos que são reconhecidos pela sua baixa capacidade de diferenciação em vasos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos da terapia com células mononucleares de medula óssea cultivadas em meio basal de endotélio EBM-2 em ratos com hipertensão arterial sistêmica espontânea.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar os efeitos da terapia com células mononucleares de medula óssea cultivadas em meio basal de endotélio EBM-2, em ratos espontaneamente hipertensos, comparando com ratos hipertensos controles recebendo veículo ou fibroblastos, sobre:

- os níveis de pressão arterial e frequência cardíaca basais, medido repetidas vezes pelo método de oclusão da artéria caudal ou diretamente via cateter arterial.

- a modulação autonômica cardiovascular, por meio de análise espectral da variabilidade da FC e PA.

- a sensibilidade barorreflexa espontânea, quantificada por meio do cálculo do índice alfa, mediante aplicação da análise espectral autorregressiva bivariada (cruzada).

- a função endotelial sistêmica através da medida das respostas vasodepressoras endotélio-dependente e endotélio-independente, induzidas respectivamente pela acetilcolina e nitroprussiato de sódio.

- o peso cardíaco absoluto e relativo medido ao final do protocolo experimental.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados ratos espontaneamente hipertensos (“Spontaneously Hypertensive Rats - SHR) machos (n=16) e fêmeas (n=39), isogênicos, com idade inicial de 16 semanas, fornecidos pelo biotério da Disciplina de Fisiologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Os animais foram mantidos em condições estáveis em biotério (temperatura 22° C, umidade de 40-70% e ciclo claro-escuro de 12/12horas), onde tiveram livre acesso à água e ração. Todos os procedimentos experimentais empregados neste projeto 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). O protocolo experimental de manuseio dos animais e coleta dos ossos longos para extração de medula foram aprovados pelo Comitê de ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (CEUA), protocolo no 17/2005.

3.1.2 Grupos Experimentais

As fêmeas SHR foram divididas em três grupos experimentais de acordo com o tratamento recebido:

- a) grupo controle (SHR-CON, administração endovenosa de veículo, n=14),
- b) grupo de células mononucleares cultivadas em meio basal endotelial-EBM (SHR-MNC+EBM, administração endovenosa de 10^6 células extraídas de medula óssea de SHR machos, cultivadas em meio endotelial basal e marcadas com Dil CM celltracker, n=14).
- c) Grupo de fibroblasto (SHR-FIB, administração endovenosa 10^6 células de fibroblasto e marcadas com Dil CM celltracker, n=11)

3.2 ISOLAMENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA

Ratos SHR machos, isogênicos (n= 16), de 16 semanas de idade foram sacrificados, tendo os fêmures e tíbias sido removidos. Em seguida, a medula óssea foi extraída, cortando-se as epífises dos ossos e centrifugando a 350g por 5 minutos. A suspensão de medula óssea foi ressuspensa em PBS/EDTA filtrada em filtro de nylon especial com poros de 70 μ m (Miltenyi Biotech. Germany), para a remoção de

agregados celulares e coágulos. As células em suspensão foram plaqueadas em placas recobertas com fibronectina com meio EBM-2 suplementado por fatores de crescimento endoteliais como fator de crescimento epidérmico humano (hEGF), hidrocortisona, gentamicina e anfotericina, soro fetal bovino, VEGF, fator de crescimento básico de fibroblasto humano (hFGF-b), fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), ácido ascórbico e heparina (Lonza,USA) e incubadas a 5% CO₂, 37°C por 72 horas. Ao final deste período, células suspensas não aderentes na placa de cultura foram removidas e as células aderentes cultivadas em 2 mL de meio de crescimento endotelial completo em incubadora de CO₂ a 5% a 37°C por duas semanas com troca do meio a cada dois dias. Após as duas semanas de cultura, as células aderentes foram lavadas com PBS e despregadas da parede do frasco de cultura pela incubação em 1 mL de tripsina 0,25% em EDTA 1mM por 2 minutos a 37°C. A tripsina foi neutralizada em seguida pela adição de 2 mL de meio de de crescimento endotelial completo, e então as células forma suspensas e contadas em câmara de Neubauer. A seguir as células foram diluídas para uma concentração final de 1 x10⁶ cel./mL. A viabilidade das células foi avaliada pela coloração das mesmas com azul de Tripán 0,4%. Utilizaram-se somente suspensões com mais de 99% de viabilidade.

Em seguida, a suspensão de células progenitoras endoteliais foram marcadas com o corante fluorescente Dil CM celltracker, conforme descrito a seguir.

3.3 ISOLAMENTO DE FIBROBLASTOS

Pedaços de pele (1cm²) da região abdominal dos animais utilizados na extração de medula foram processados com tripsina 0,25% em EDTA 1mM para obtenção de fibroblastos. Este material foi colocado em meio de cultura de Dulbecco Modificado (DMEM) com alta concentração de glicose, suplementado com soro bovino fetal a 10%, penicilina a 100U/mL e estreptomicina a 100U/mL. Cerca de 72 horas após o plaqueamento, foi realizado a troca do meio de cultura, desprezando-se as células que não aderiram à superfície plástica das garrafas de cultura. A troca do meio de cultura das células foi realizada a cada 3-4 dias.

As células obtidas a partir do isolamento e plaqueadas foram consideradas P0, e a cada replaqueamento as células avançavam uma passagem, prosseguindo para P1, depois para P2 e assim sucessivamente. Todos os procedimentos realizados utilizaram fibroblastos entre a 3^a e a 5^a passagens

3.4 PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS PARA TRANSPLANTE

Para verificar a distribuição tecidual das células MNC+EBM ou dos fibroblastos na ratos com hipertensão arterial sistêmica, as células foram marcadas com o corante fluorescente vermelho de membrana Dil-CM Celltracker (Molecular Probes Inc., USA). Para tal procedimento, a suspensão celular foi incubada com o corante (5µl de Dil-CM Celltracker para cada 2×10^6 células) por 05 minutos a 37°C e 15 minutos a 4°C conforme especificações do fabricante (Molecular Probes Inc., USA). As células marcadas foram submetidas a procedimentos de lavagem (centrifugação à 200g por 10 minutos à 4°C) e subsequente ressuspensão em PBS/EDTA num total de 10^6 células/mL. A seguir, as células 1ml da suspensão foi injetada na veia jugular de ratas SHR de 16-22 semanas.

3.5 CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA

As células mononucleares cultivadas em EBM foram removidas das placas de cultura por meio da digestão com tripsina/EDTA e submetidas à centrifugação de 200g por 5 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet homogeneizado e suspenso em 5 ml de PBS-SBF (PBS + soro bovino fetal 1%) e centrifugado a 350g por 5 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e o pellet homogeneizado em outros 5 ml de PBS-SBF 1%. A seguir, as células foram quantificadas na câmara de Neubauer e, após a contagem, as células foram submetidas a concentração ou diluição em PBS-SBF 1% + 1µl de Fc Block (0,5µg/µl), a fim de se obter uma concentração celular igual a 5000 células/µl.

As células foram submetidas à marcação com anticorpos monoclonais anti-CD14, anti-CD31, anti-CD34, anti-CD45 (BD-Biosciences In., San Jose, CA, e Biosciences, San Diego, CA, USA), anti-CD4 (AbD Serotec) e anti-KDR (R&D Systems) conjugados a isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou ficoeritrina (PE), os quais reagem com antígenos homólogos de rato.

Cada “pool” de células foi dividido em seis amostras e submetido à marcação com anticorpos, sendo que cada um continha:

- **Tubo 1** (controle negativo) - 50 µl de células MNC+EBM e diferenciadas em meio endotelial; 49µl de PBS-SBF gelado; 1µl de Fc Block (0,5 µg/µl).

- **Tubo 2** (isotipos) - 50 µl de células MNC+EBM; isotipos controles PE anti - IgG1κ mouse; FITC anti - IgG1κ mouse (BD-Biosciences); 45µl de PBS-SBF gelado; 1µl de Fc Block (0,5µg/µl).
- **Tubo 3** - 50 µl de células MNC+EBM; anticorpos marcadores de CD45 PE e CD14 FITC; 37µl de PBS-SBF gelado, 1µl de Fc Block (0,5 µg/µl).
- **Tubo 4.** - 50 µl de células MNC+EBM; anticorpos marcadores de CD31 FITC e KDR PE; 40µl de PBS-SBF gelado, 1µl de Fc Block (0,5 µg/µl).
- **Tubo 5** - 50 µl de células MNC+EBM; anticorpos marcadores de CD34 FITC; 45µl de PBS-SBF gelado, 1µl de Fc Block (0,5 µg/µl).
- **Tubo 6** - 50 µl de células MNC+EBM; anticorpos marcadores de CD4 PE; 48µl de PBS-SBF gelado, 1µl de Fc Block (0,5 µg/µl).

Após a marcação, todos os tubos foram submetidos à incubação por 40 minutos no escuro em temperatura de 4° C. Em seguida, o material foi lavado em PBS-SBF por 3 vezes (centrifugação de 200g por 5 minutos). O anticorpo secundário do marcador CD31 foi adicionado ao tubo 4 que foi novamente submetido à incubação por 40 minutos nas mesmas condições da primeira. Após esse período, o material foi lavado por duas vezes da mesma forma citada acima e, em seguida, levado à leitura.

A análise dos fenótipos celulares foi feita em citômetro de fluxo FACSCalibur com o “software” CELLQUEST (Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA), sendo que em cada amostra, 20.000 eventos foram adquiridos para análise.

3.6 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E FUNCIONAL DAS CÉLULAS CULTIVADAS

3.6.1 Identificação de células endoteliais

Para verificar as características das células mononucleares cultivadas em meio basal endotelial, as células aderentes nas placas revestidas com fibronectina (BD BioCoat™) foram incubadas com 3µl/ml 1.1'-V-dioctadecyl-3,3', 3'-tertamethylindocarbocyanine-labeled acetylated low-density lipoprotein (Dil-Ac-LDL, Invitrogen, USA) a 37°C por 3h na estufa com CO₂ a 5%. Em seguida lavou-se a placa 2 vezes com PBS e paraformaldeído 4% foi adicionado por 10 min, e novamente a placa foi lavada com PBS e acrescentou-se 10µl/ml FITC-conjugated BS1-lectin (Sigma-Aldrich Chemie, Zwijndrecht, The Netherlands). Finalmente

acrescenta-se 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Molecular Probes, Leiden, The Netherlands; diluição: 1:20,000). Cada poço da placa de seis poços foi então escaneado em microscópio de fluorescência invertido (Axioobserver Z1, Carl Zeiss, Alemanha) e as células triplo marcadas (DAPI, Dil-Ac-LDL e lectina) foram consideradas positivas e contadas como células com características de endotélio.

3.6.2 Ensaio de formação de tubo vascular *in vitro*

Matrigel (BD Biosciences) foi adicionado em placa de 24 poços (300 µl/poço), e esperou sua solidificação à 37 °C por 30 min. Após o Matrigel solidificado, fibroblastos e células mononucleares cultivadas em EBM foram adicionados em poços separadamente 6×10^4 células em 500 µl de meio de crescimento. As células foram incubadas a 37 °C e 5% CO₂ por 24 h. As redes de tubos foram fotografadas microscópio invertido (Axioobserver Z1, Carl Zeiss, Alemanha)

3.6.3 Identificação de fibroblastos secretoras de colágeno

Os fibroblastos foram plaqueados por 24 horas e então corados com picosirius red, que cora moléculas de colágeno.

3.6.4 Capacidade de diferenciação celular dos fibroblastos

Os fibroblastos em cultura foram estimulados, mediante protocolo específico, a se diferenciar em osteoblastos e adipócitos. O protocolo de diferenciação celular baseou-se em Neuhuber e cols. (2008), conforme descrito abaixo:

3.6.4.1 Diferenciação osteogênica

Para a indução de diferenciação osteogênica, os fibroblastos na quarta passagem (P4) foram plaqueados em placas de cultura contendo 6 poços, numa densidade de 3.000 células/cm². Dois dias após o plaqueamento, o meio de cultura foi substituído por meio de indução osteogênico, constituído por DMEM acrescido de 15% FBS, 1% penicilina/estreptomicina, 100 nM dexametasona, 50 µM ascorbato-2-fosfato e 10 mM de glicerol-fosfato. O meio de indução osteogênica foi substituído a cada 3-4 dias e, no 18^o dia, foi feita a análise da diferenciação.

A análise da diferenciação consistiu de remoção do meio de indução osteogênica, fixação das células na placa através da utilização de paraformaldeído

4% (20 minutos), seguido pela aplicação do corante Alizarin-Red (SIGMA), o qual cora a matriz óssea em vermelho, por 5-10 minutos e análise microscópica.

Cada poço da placa foi então escaneado em microscópio invertido (Axioobserver Z1, Carl Zeiss, Alemanha) e áreas de cada campo visual ocupada pela coloração avermelhada do Alizarin Red foi quantificada e expressa em valores relativos como percentual da área total do campo estudado.

3.6.4.2 Diferenciação adipogênica

Para a indução de diferenciação adipogênica, os fibroblastos em P4 foram plaqueadas em placas de cultura contendo 6 poços, numa densidade de 20.000 células/cm², e cultivadas até próximo da confluência de 100%, quando o meio de cultura foi substituído por meio de indução adipogênico, constituído por DMEM acrescido de 15% FBS, 1% penicilina/estreptomicina, 1µM dexametasona, 0,5mM isobutil-metil-xantina, 10µg/mL insulina e 100µM indometacina. Após 03 dias, o meio de indução adipogênica foi substituído por meio de manutenção adipogênica, constituído por DMEM acrescido de 15% FBS, 1% penicilina/estreptomicina e 10µg/mL insulina. Após 24 horas, o meio de manutenção adipogênica foi novamente substituído por meio de indução adipogênico por 03 dias, quando foi substituído por meio de manutenção adipogênica por mais 24 horas. Completando-se 03 ciclos de troca de meios de indução e manutenção, as células permaneceram por 05 dias com o meio de manutenção, quando foi realizada a análise da diferenciação.

A análise da diferenciação consistiu de remoção do meio de indução adipogênica, fixação das células na placa através da utilização de paraformaldeído 4% (60 minutos), aplicação do corante Oil-Red, o qual cora lipídios em vermelho, por 5-10 minutos e análise microscópica. A análise da diferenciação adipogênica foi realizada de maneira semelhante à descrita para a diferenciação osteogênica.

3.7 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os animais em estado de vigília quieta foram monitorizados e observados nas 2 semanas prévias e seguintes ao transplante, avaliando-se a pressão arterial caudal e frequência cardíaca, pelo método de oclusão da artéria caudal usando um sistema automatizado (Digital Blood Pressure Meter LE-5000, Letica S.I., Barcelona, Espanha). Para o procedimento de transplante de células, os animais foram anestesiados via intraperitoneal com Tri-bromo-etanol (250 mg/kg, i.p.).

Quinze dias após o transplante, após a monitorização diária da pressão arterial e frequência cardíaca, os animais foram re-anestesiados (Tri-bromo-etanol, 250 mg/kg, i.p.) e submetidos à implantação de cateter na artéria femoral para aferir diretamente a pressão arterial. Após 24 horas da recuperação cirúrgica, todos os animais foram submetidos a um registro direto de pressão arterial por 1 hora, seguido pelo teste da função endotelial pela implantação de um cateter na artéria carótida comum direita. Este último protocolo foi realizado sob anestesia com tiopental sódico (40 mg/kg, i.p.). Após um registro basal de 05 minutos, acetilcolina (3,125; 6,25; 12,5 e 25 ng/Kg) ou nitroprussiato de sódio (0,5; 1; 2 e 4 µg/Kg) foram administrados endovenosamente em doses alternadas e aleatórias para a avaliação das respostas vasodilatadoras dependente (acetilcolina) e independente (nitroprussiato) de endotélio. Ao final do protocolo experimental, os animais foram sacrificados, o peso cardíaco avaliado e coração, pulmões, rins, baço, aorta e músculo esquelético removidos e congelados a -80° C para posteriores avaliações bioquímicas e histológicas.

3.8 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Fragmentos congelados dos diferentes tecidos foram seccionados em cortes de 5 micrômetros no criostato e avaliados para a presença de células marcadas com cell tracker.

3.9 ANALISE DOS DADOS

Os valores médios de FC e de PA sistólica (PAS), média (PAM) e diastólica (PAD) foram calculados para o período basal de uma hora a partir do sinal digital representado pela figura 1A.

Para o estudo da variabilidade cardiovascular, o sinal de PA, 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), PAS e PAD. A variância dos valores de IP, PAS e PAD dentro do período basal foi tomada como um índice de variabilidade no domínio do tempo.

A variabilidade do IP, PAS e PAD foi também avaliada no domínio da frequência, empregando-se o método de análise espectral autoregressivo. Os procedimentos teóricos e analíticos estão completamente descritos em publicações

prévias (Malliani, 1991; Task Force, 1996). Brevemente, séries temporais batimento a batimento de IP, PAS e PAD, coletadas no registro basal foram divididas em segmentos seriados de 300 batimento, sendo que todo segmento sucessivo sobrepunha-se em 50% (100 batimentos) no segmento anterior (método de Welch). Usando segmentos estacionários das séries temporais, parâmetros autoregressivos 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 LA24, gentilmente cedido pela engenheiro Dr. Alberto Porta, Universidade de Milão, Itália). Este procedimento permite automaticamente quantificar a frequência central e a potência de cada componente espectral relevante em unidades absolutas, bem como em unidades normalizadas.

Para a avaliação da sensibilidade barorreflexa espontânea do controle da FC, um modelo matemático baseado na análise espectral autorregressiva bivariada (análise espectral cruzada) foi aplicado a ambas as series temporais de variabilidade do intervalo de pulso (IP) e pressão arterial sistólica (PAS), conforme descrito na literatura (De Boer *et al.*, 1987; Pagani *et al.*, 1986). Com o uso desta abordagem, quantificou-se a coerência entre os sinais, a qual descreve a relação linear entre as variabilidades do IP e da PAS em cada frequência de oscilação e apresenta valores variando entre 0 (nenhuma relação linear) e 1 (relação linear máxima) e o desvio de fase (expresso em radianos), o qual estima o retardo de tempo entre os dois sinais nas diversas bandas de frequência espectral (bandas de baixa-LF e alta-HF frequências) (De Boer *et al.*, 1987; Pagani *et al.*, 1986). Baseado em estudos prévios (PAGANI *et al.*, 1986), a sensibilidade barorreflexa espontânea foi quantificada como índice alfa que é representado pela seguinte fórmula:

$$\alpha = \frac{\text{LF IP}}{\text{LF PAS}}$$

Esta equação foi aplicada somente para os componentes de baixa frequência (LF) que apresentaram coerência maior que 0.5 e o desvio de fase fosse menor que zero radianos conforme demonstrado na figura 1B (Pagani *et al.*, 1986).

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os parâmetros coletados foram expressos como média (\pm erro padrão). Os dados foram analisados empregando-se ANOVA “one way” seguido de teste de Tukey ou ANOVA de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dun, de acordo com os requisitos estatísticos de normalidade da distribuição e homogeneidade da variância. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

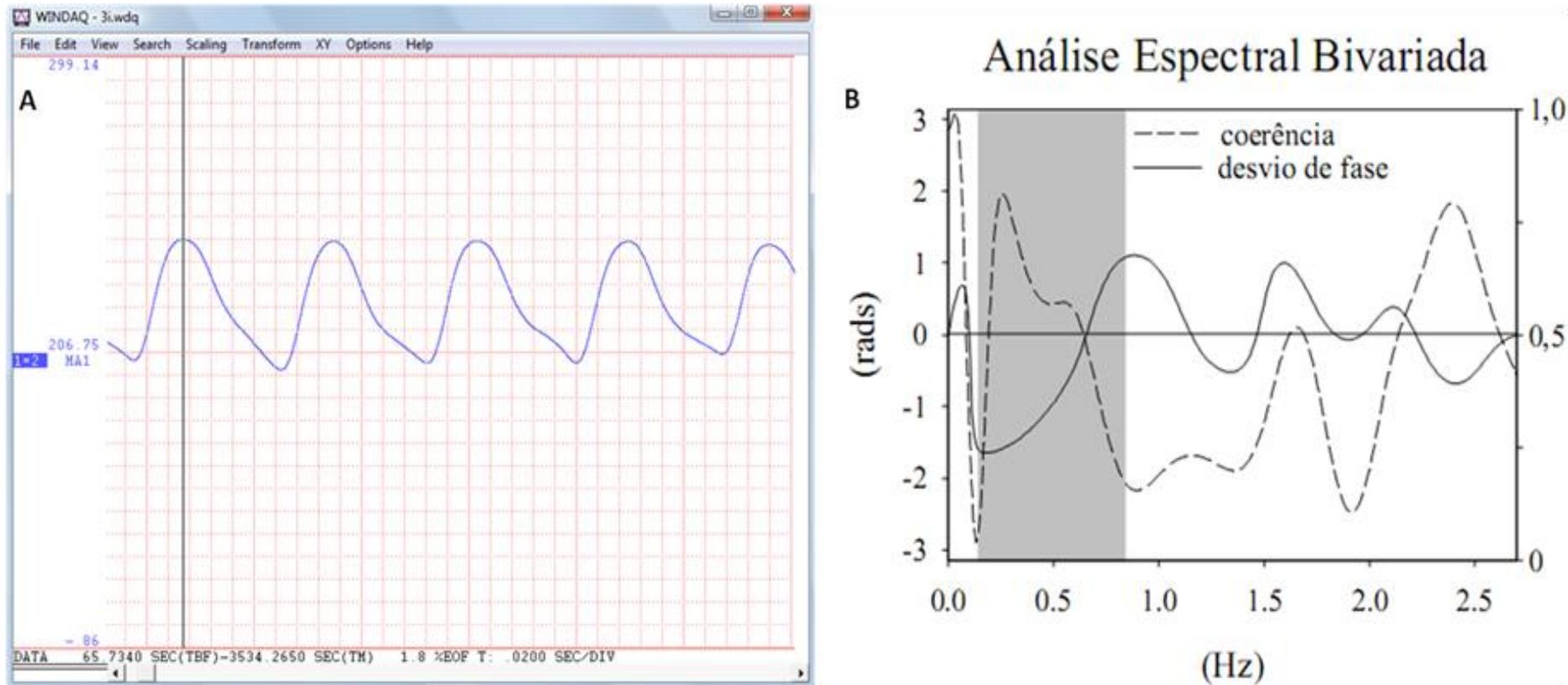


Figura 1: Sinal digital obtido através do registro basal (A) e representação gráfica da análise espectral bivariada (B) demonstrando uma seqüência de 300 batimentos com coerência superior a 0,5 e desvio de fase menor que zero.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DA POPULAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DERIVADAS DE MEDULA ÓSSEA, CULTIVADAS EM MEIO ENDOTELIAL COMPLETO SOBRE FIBRONECTINA DURANTE 15 DIAS

Realizou-se uma análise de citometria para células mononucleares derivadas da medula óssea de ratos SHR machos, e de células cultivadas em placas recobertas com fibronectina em meio EBM-2 completo no 3º, 7º e 15º dias de cultura. As culturas apresentaram marcações para KDR+;CD31+;CD45+;CD14+ e CD4+, apresentando um aumento da expressão dos mesmos ao longo do tempo de cultura. No entanto, o marcador CD34 apresentou-se com baixa expressão em todos os dias avaliados, como demonstrado na tabela 1 e nas figuras 1 a 4.

Tabela 1: Valores percentuais da cinética da cultura de células mononucleares de machos SHR cultivadas em placas recobertas com fibronectina durante 15 dias em meio EBM-2; os marcadores utilizados estão indicados na coluna à esquerda.

	Mononuclear	3 dias	7 dias	15 dias
KDR+	9.45	4.51	27.7	42.15
CD31+	31.65	27.25	34.765	45.85
KDR+/CD31+	4.46	2.38	21.8	37.4
CD34+	0.35	0.29	0.4425	0.201
CD45+	75.7	49.7	56.6	80.45
CD45+/CD14+	6.39	27.2	26.6	43.7
CD4+	4.61	9.26	28.05	65.2

Tomando-se em consideração estes resultados, a população de células transplantadas após 15 dias de cultura parece ser enriquecida predominantemente por monócitos (CD45+, CD14+), os quais também expressam abundantemente CD4+ e marcadores e diferenciação endotelial (KDR+ e CD31+).

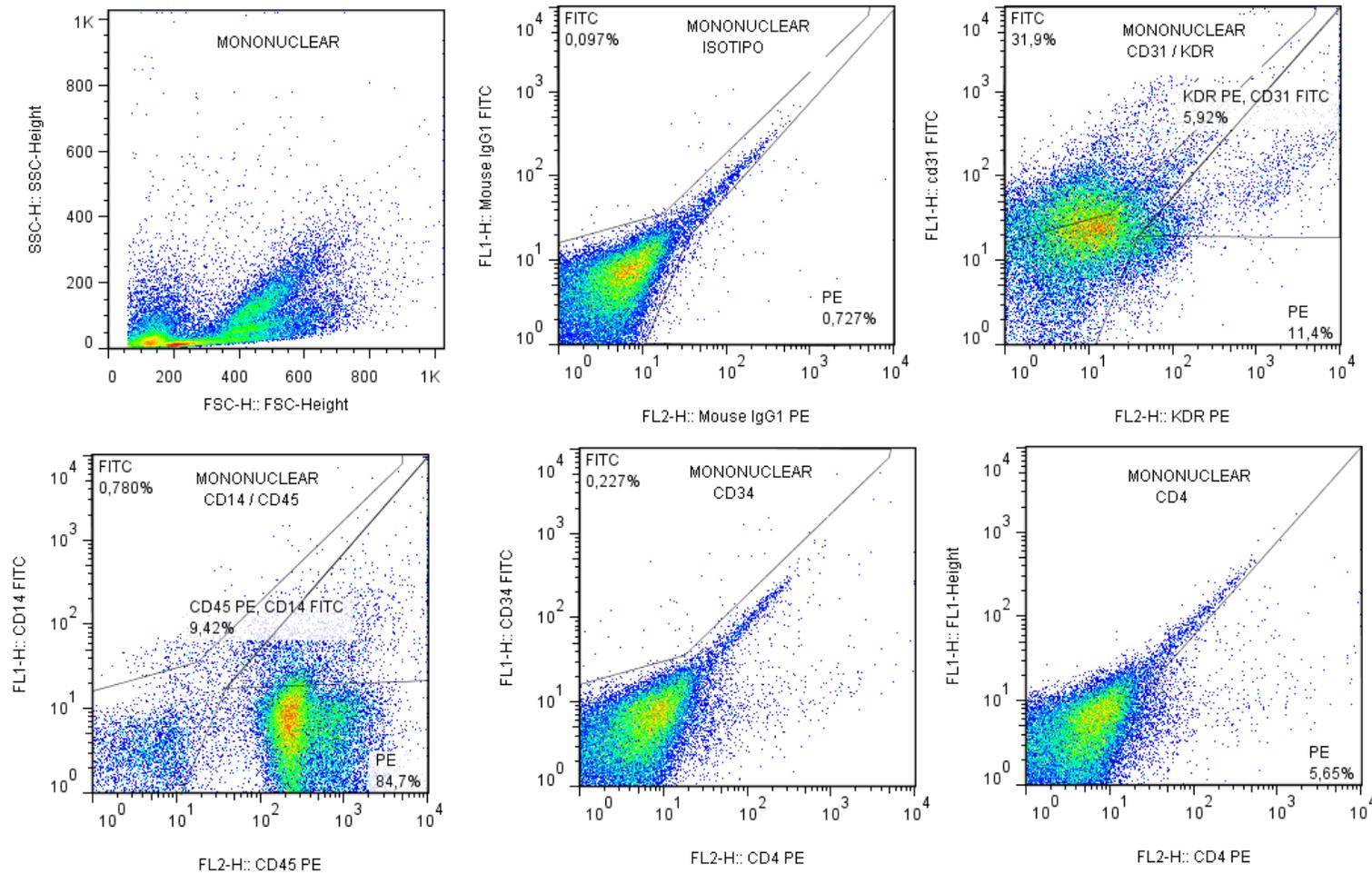
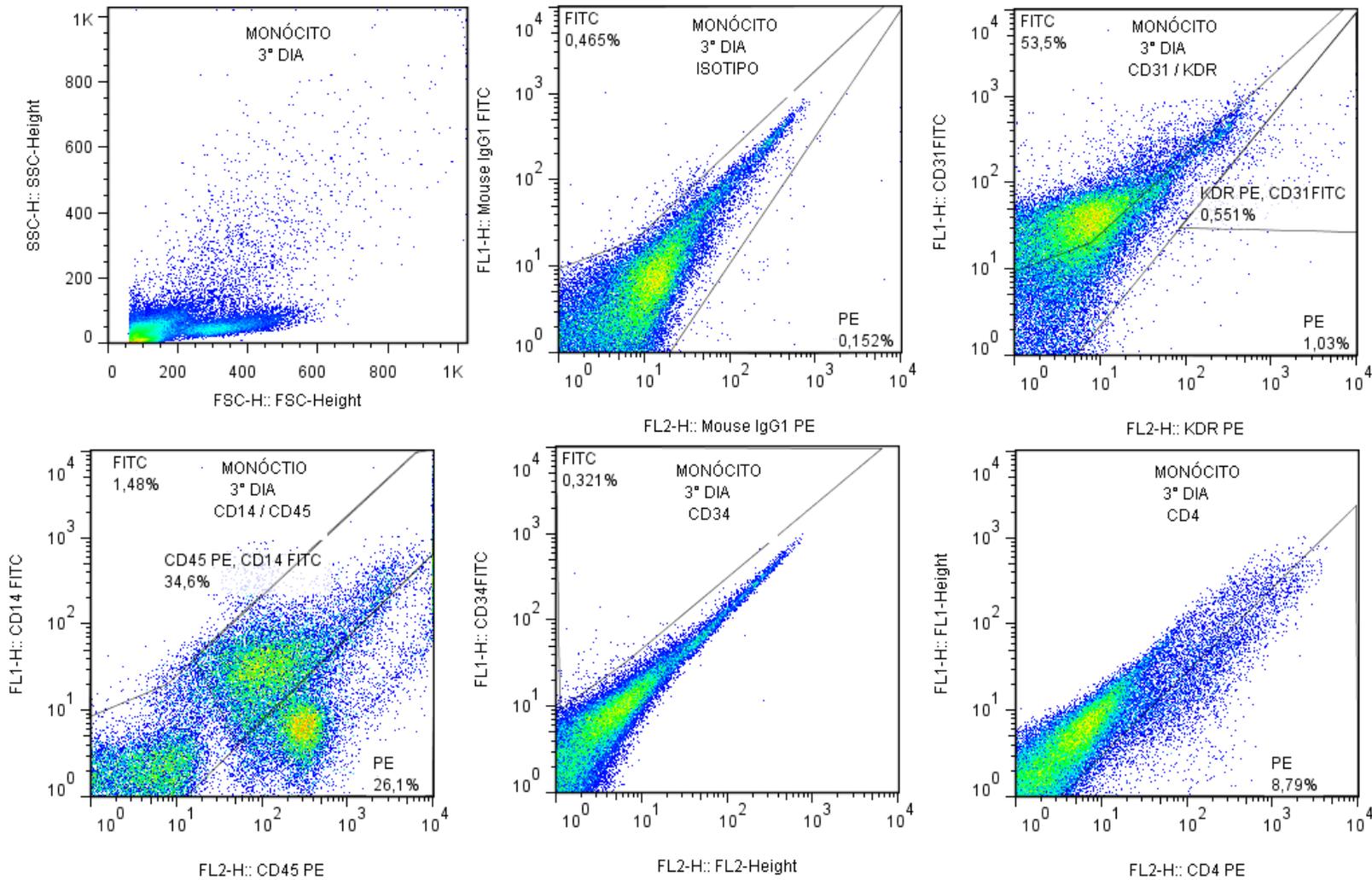


Figura 2: Gate da população segundo os valores FSC E SSC, Isotipo, CD31/KDR, CD14/CD45, CD34 E CD4 para células mononucleares de medula óssea isoladas a fresco.



Figura

Gate da população segundo os valores FSC E SSC, Isotipo, CD31/KDR, CD14/CD45, CD34 E CD4 para células mononucleares de medula óssea cultivadas em meio endotelial completo no 3° dia de cultura.

3:

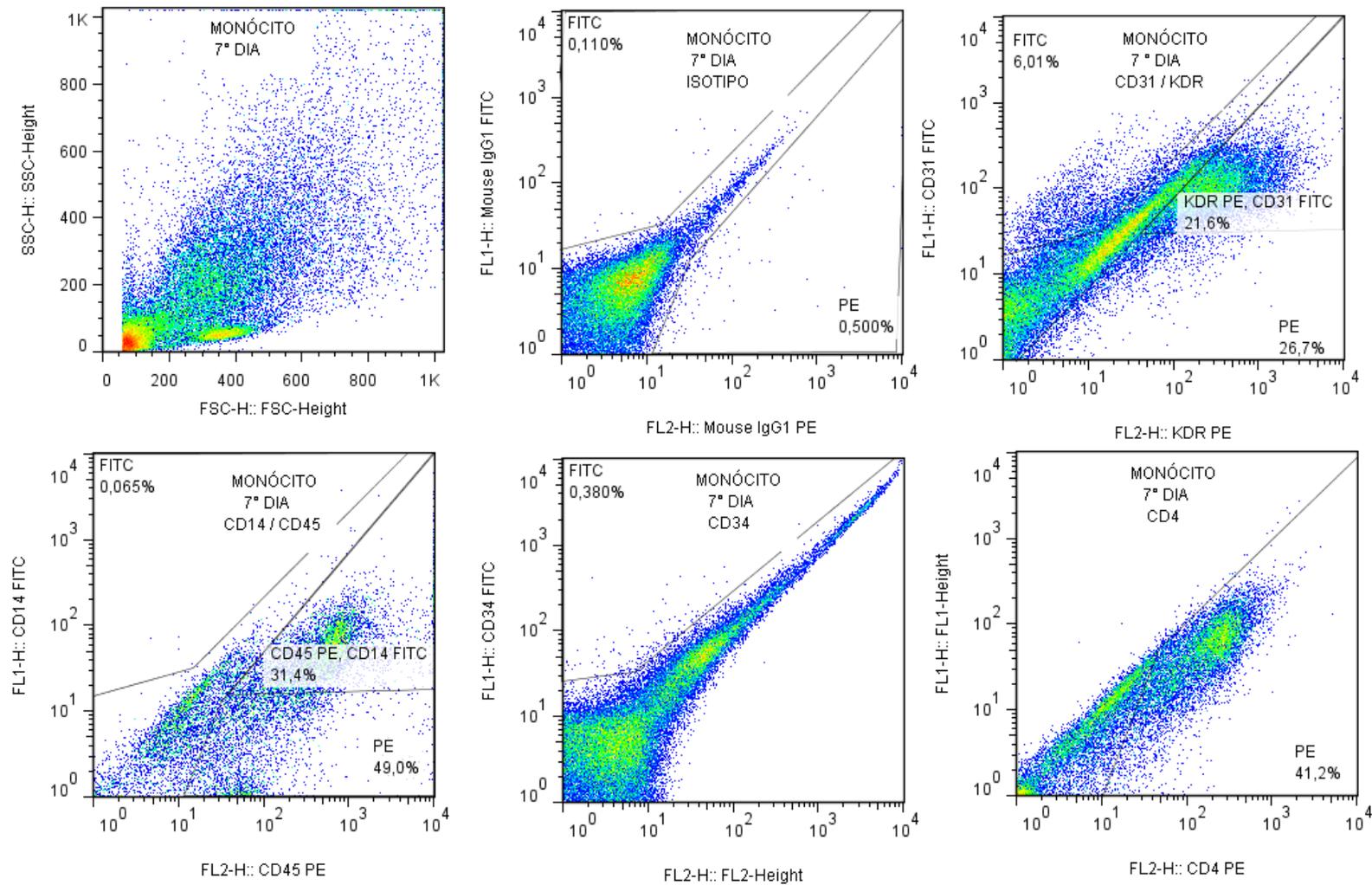


Figura 4: Gate da população segundo os valores FSC E SSC, Isotipo, CD31/KDR, CD14/CD45, CD34 E CD4 para células mononucleares de medula óssea cultivadas em meio endotelial completo no 7° dia de cultura.

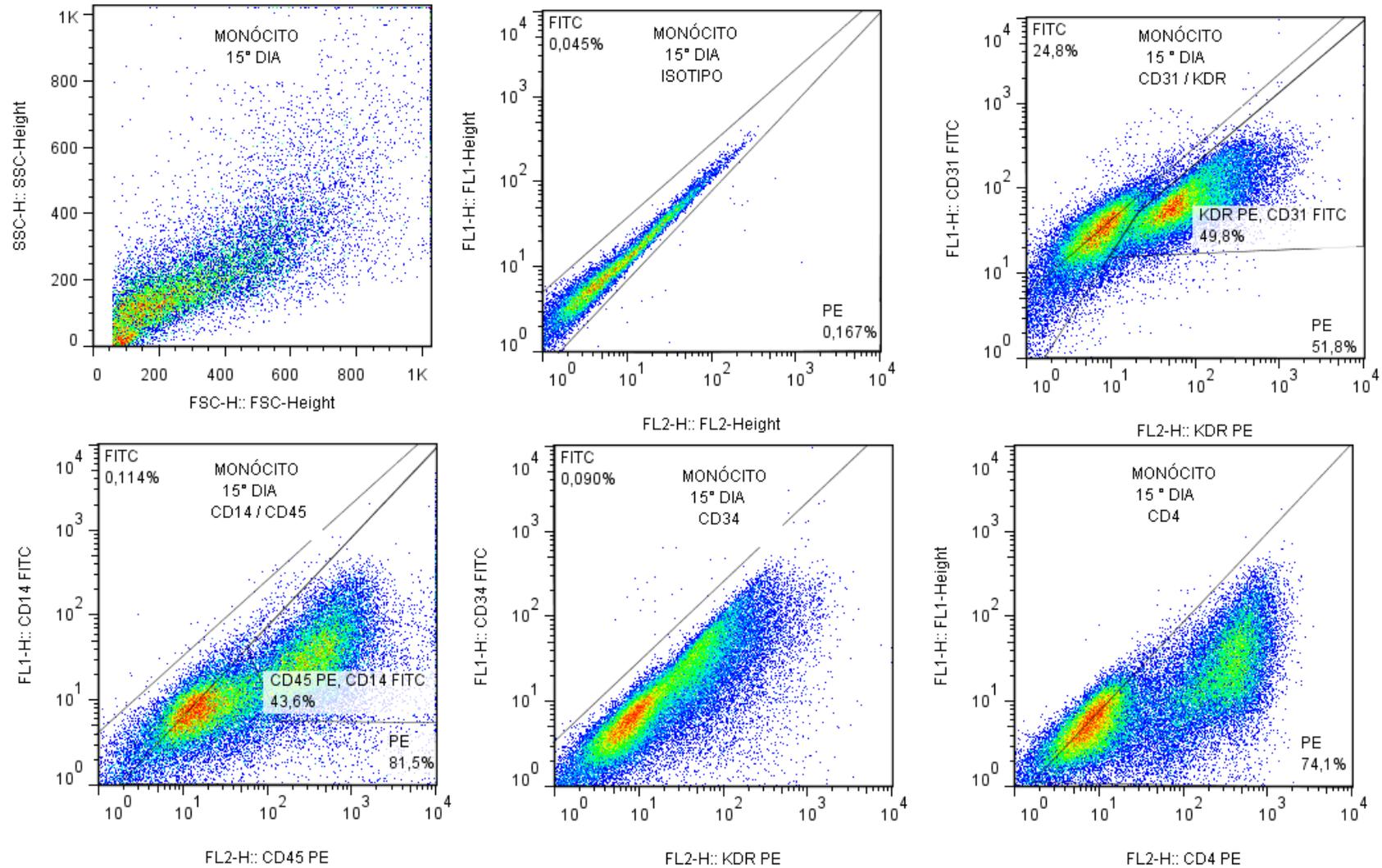


Figura 5: Gate da população segundo os valores FSC E SSC, Isotipo, CD31/KDR, CD14/CD45, CD34 E CD4 para células mononucleares de medula óssea cultivadas em meio endotelial completo no 15° dia de cultura.

4.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLOGICA E FUNCIONAL DAS CÉLULAS MONONUCLEARES CULTIVADAS EM EBM-2 E DOS FIBROBLASTOS

A morfologia fusiforme característica de células endoteliais pode ser evidenciada ao longo dos dias de cultivo (figura 5) e a capacidade de formação de vasos foi demonstrada através do ensaio com matrigel (figura 6).

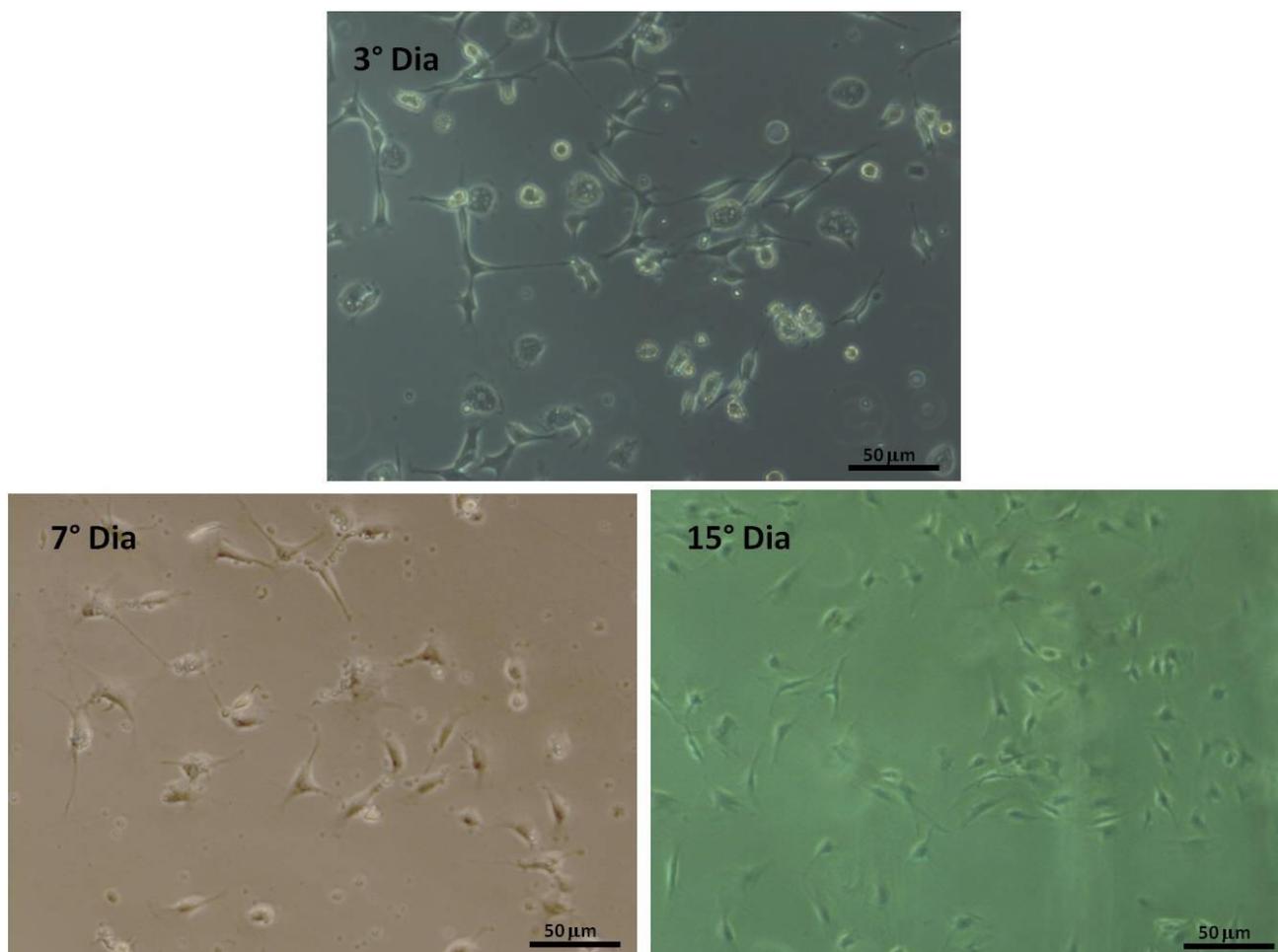


Figura 6: Fotomicrografias das células mononucleares cultivadas em meio endotelial no 3°, 7° e 15° dias de cultura respectivamente demonstrando sua morfologia fusiforme.

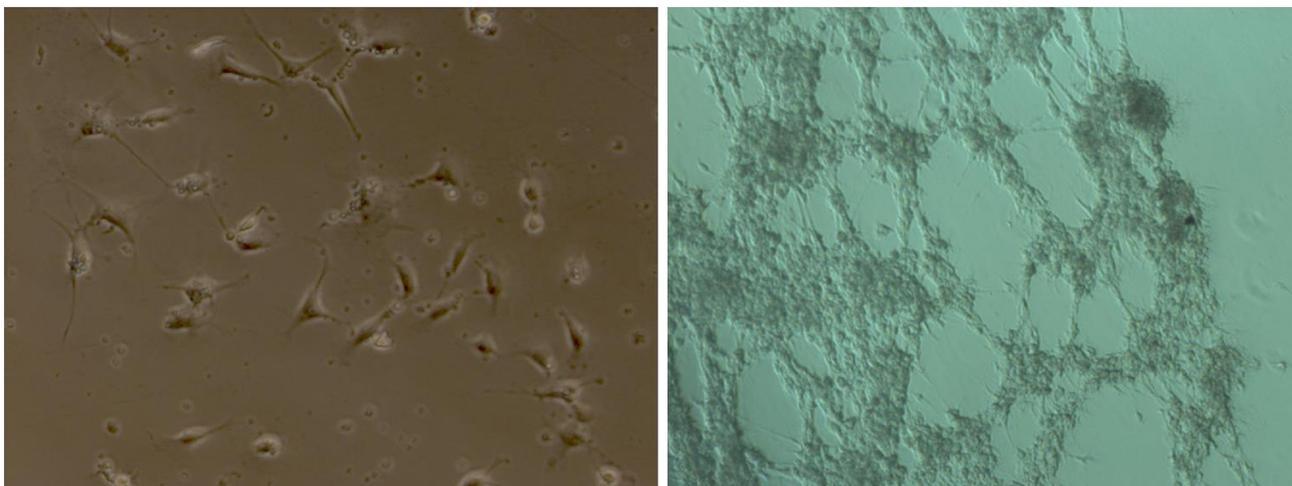


Figura 7 :Fotomicrografias das células mononucleares cultivadas em meio endotelial completo por 7 dias (à direita), demonstrando sua morfologia fusiforme e após cultivo sobre matrigel durante o teste de formação de tubos vasculares *in vitro*.

Para verificar a existência de células com características endoteliais avaliou-se também a capacidade de marcação das células com a lectina BS-1(figura 7B) que é um ligante específico das células de endotélio e a capacidade de fagocitar o Dil-Ac-LDL em cultura (figura 7C).

Para melhor evidenciar as células os núcleos foram marcados com DAPI (figura 7A) e utilizando o método de sobreposição de imagens (Merge) podemos observar uma predominância de células triplo marcadas (figura 7D).

Os fibroblastos são células grandes, com prolongamentos e núcleo evidente (figura 9A) e não apresentaram a mesma capacidade de formação de tubo observado pelas células mononucleares cultivadas em EBM e foram caracterizados pela sua capacidade de secretar colágeno em cultura (figura 8) e pela capacidade de diferenciação em outros tipos celulares, como osteócitos e adipócitos em cultura *in vitro* (figura 9B e 9C). A visualização de vesículas de gordura, bem como depósitos de cálcio, comprova a capacidade de diferenciação dos fibroblastos em tecido adiposo e ósseo, respectivamente (figura 9B e 9C).

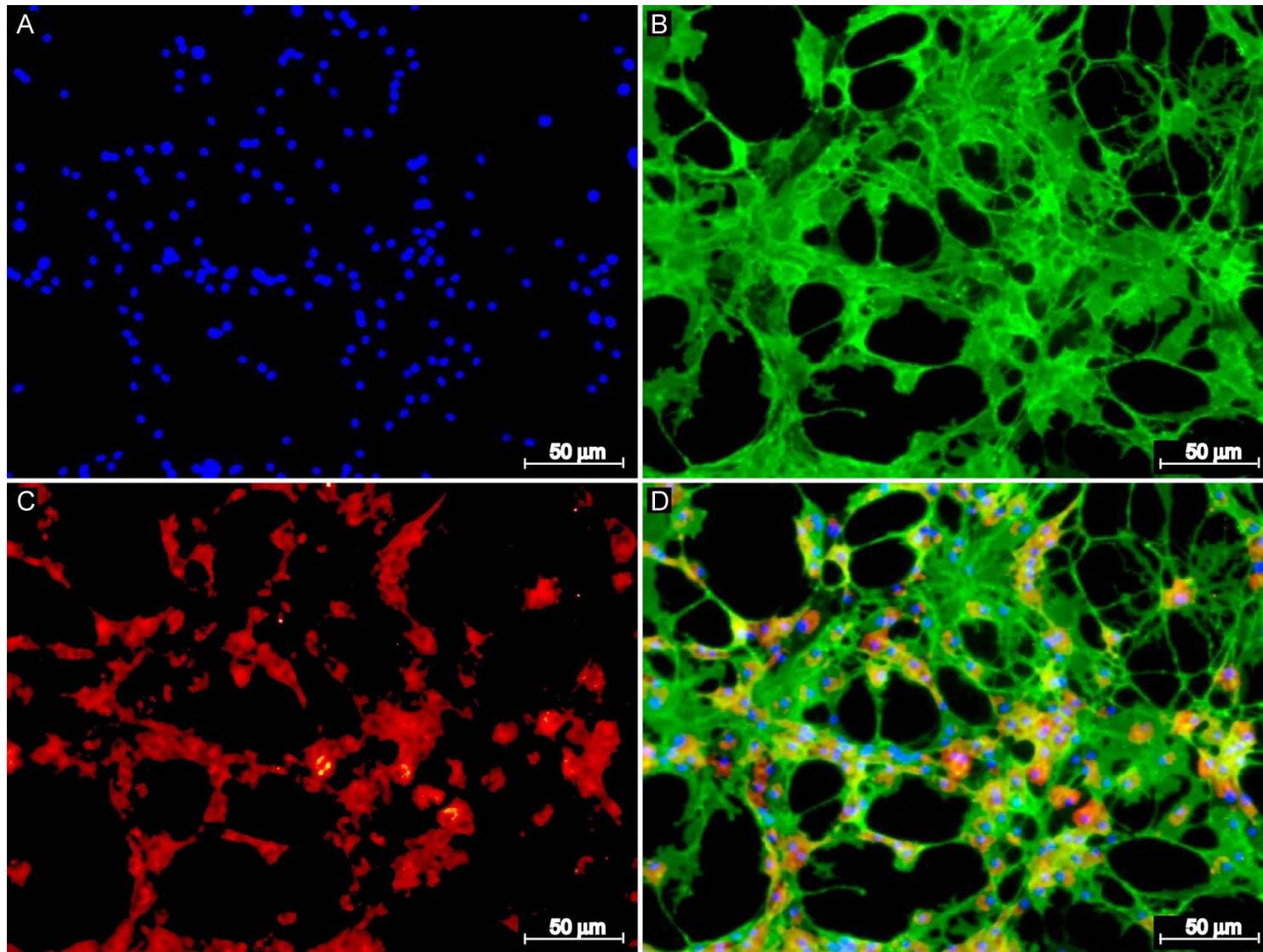


Figura 8: Fotomicrografias dos monócitos submetidos ao teste de identificação de células progenitoras de endotélio (A) marcação com DAPI corante específico de núcleo;(B) Lectina BS-1 corante de membrana de endotélio; (C) Dil-Ac-LDL corante que demonstra a capacidade das células de fagocitar LDL acetilado; (D)Merge demonstrando as células triplamente marcadas.

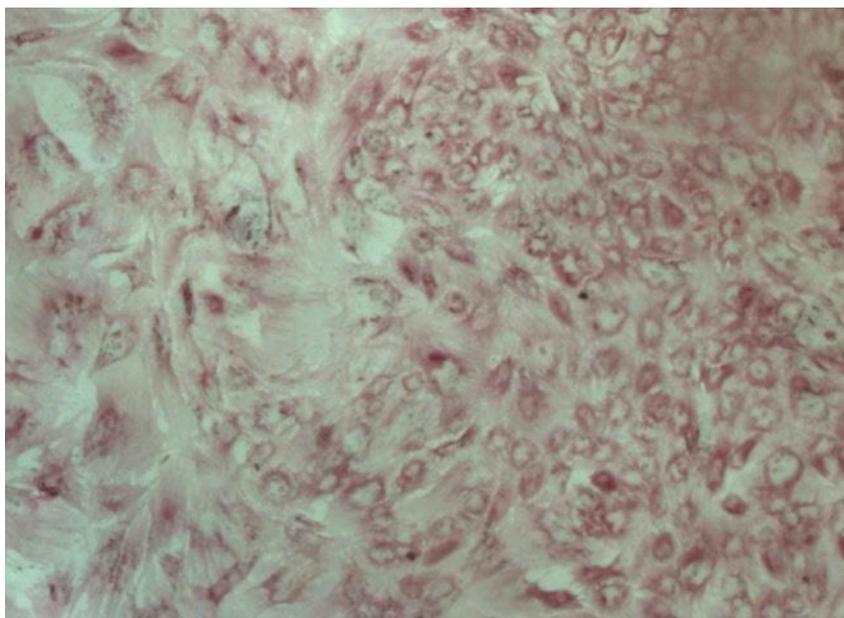


Figura 9: Fotomicrografia dos fibroblastos em cultura corados por Picrosirius. Note a coloração arroxeadada em torno e sobre os fibroblastos indicando a presença de colágeno secretado para o meio extra-celular.

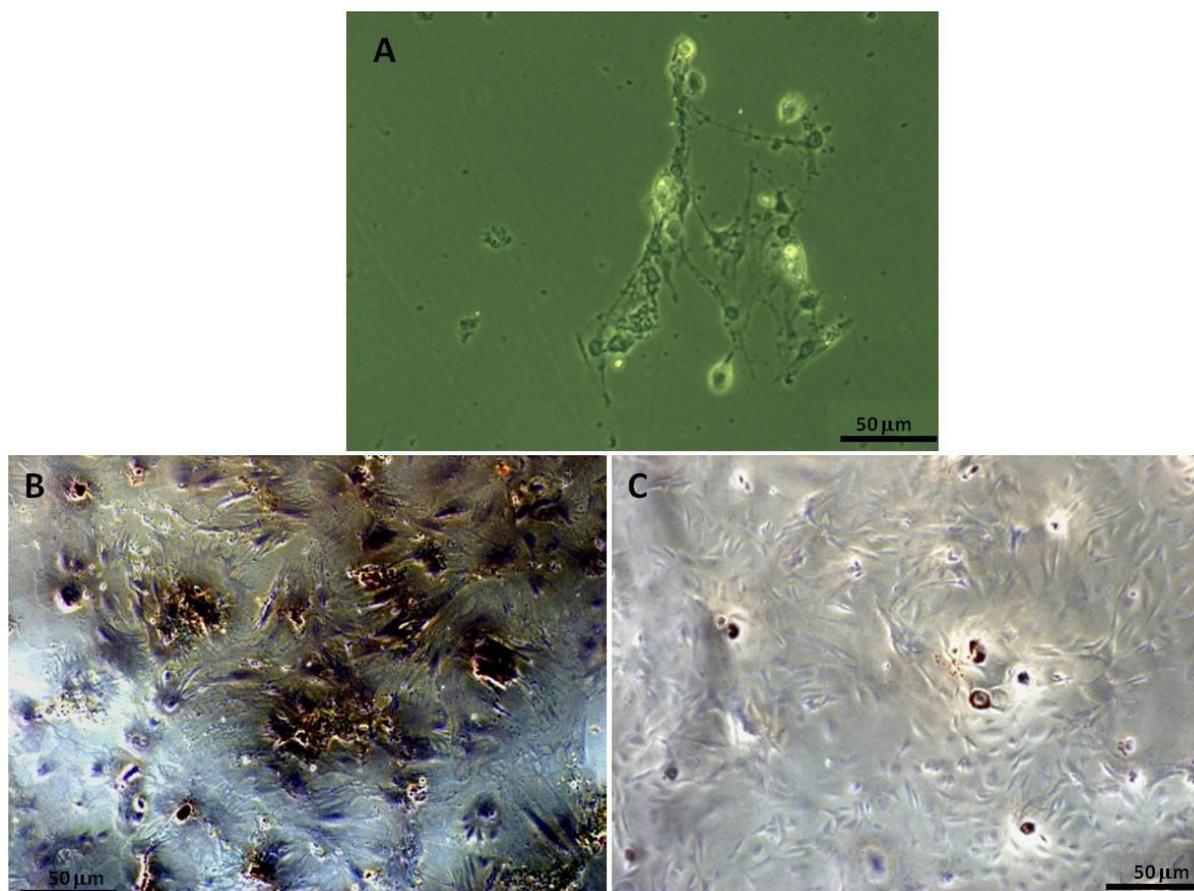


Figura 10: Fotomicrografias dos fibroblastos em contraste de fase (A) e submetidos à indução de diferenciação em linhagem osteogênica (B) e linhagem adipogênica (C).

4.3 EVOLUÇÃO TEMPORAL DA PRESSÃO ARTERIAL E DA FREQUÊNCIA CARDÍACA

Os animais utilizados no protocolo experimental foram avaliados através do método de pletismografia de cauda na semana anterior ao transplante e quinze dias após. Os valores da pressão arterial sistólica (PAS) e frequência cardíaca (FC), medidas indiretamente pelo método de oclusão da artéria caudal, estão demonstrados nas figuras 10 e 11, respectivamente. A análise dos dados de pressão arterial demonstra que os tratamentos não afetam o comportamento da pressão arterial em nenhum dos três grupos experimentais (figura 10). Por outro lado, a análise da frequência cardíaca evidenciou uma diferença significativa no décimo primeiro dia e uma tendência de redução no décimo quinto na frequência cardíaca nos animais tratados com fibroblastos em relação aos tratados com monócitos (Figura 11).

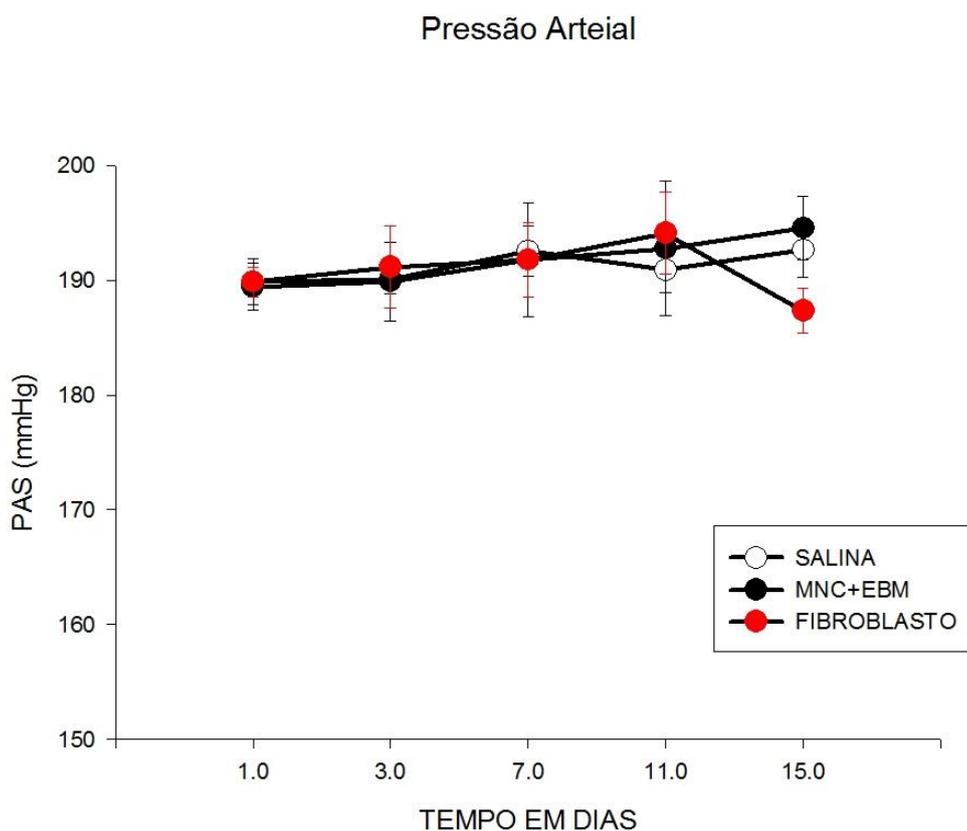


Figura 11: Evolução temporal da pressão arterial sistólica (média \pm epm) medida indiretamente pelo método de pletismografia.

FREQUÊNCIA CARDÍACA

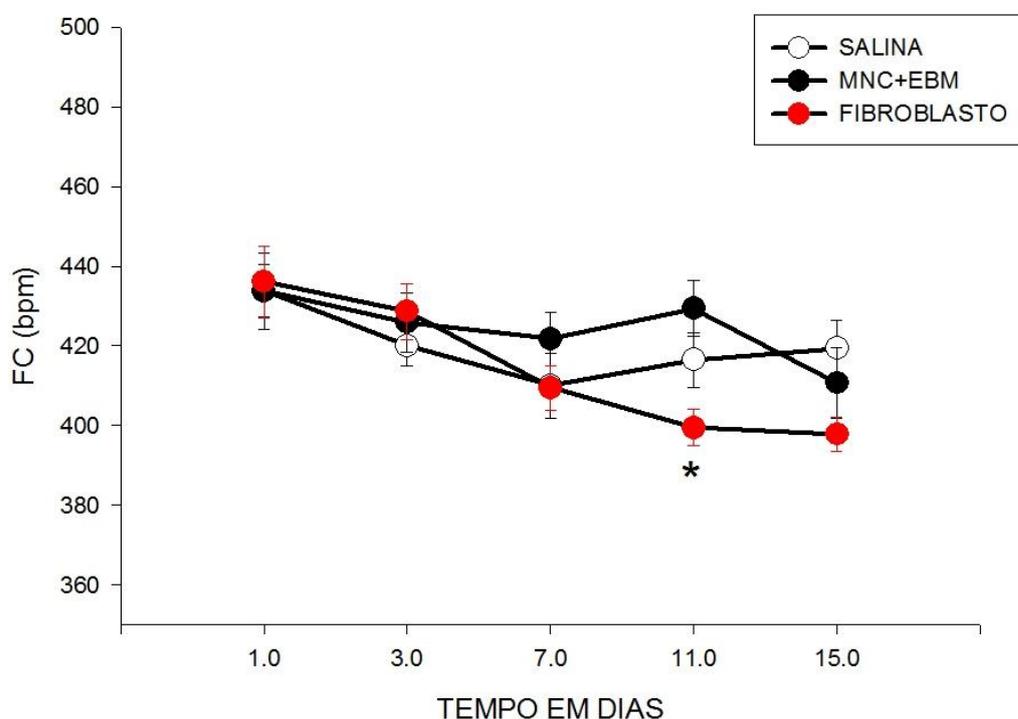


Figura 12: Evolução temporal da frequência cardíaca (média±epm) medida indiretamente pelo método de pletismografia. * $p < 0.05$ (Fibroblasto versus MNC+EBM)

4.4 VALORES HEMODINÂMICOS BASAIS

Os valores basais médios (\pm epm) dos parâmetros hemodinâmicos incluindo pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM) e frequência cardíaca (FC) estão descritos na tabela 2. Níveis pressóricos superiores a 140/90 mmHg indicam um quadro hipertensivo, os animais utilizados apresentaram valores superiores a 170/13 mmHg. Através destes dados, foi possível observar uma redução da frequência cardíaca significativa nos animais tratados com fibroblastos em relação aos outros dois grupos. Os demais parâmetros hemodinâmicos analisados não apresentaram diferença significativa.

Tabela 2: Valores basais médios (\pm epm) dos parâmetros hemodinâmicos frequência cardíaca (FC), pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM).

	SHR + PBS-EDTA (n = 14)	SHR + MNC+EBM (n = 14)	SHR + Fibroblasto (n = 11)
PAS (mmHg)	173.65 \pm 4.27	176.02 \pm 3.43	186.23 \pm 5.92
PAD (mmHg)	133.42 \pm 4.30	138.66 \pm 5.9	137.94 \pm 2.76
PAM (mmHg)	146.83 \pm 3.91	151.12 \pm 4.58	151.82. \pm 4.23
FC (bpm)	374.47 \pm 5.55	369.96 \pm 4.57	340.33 \pm 10.67 * #

p<0,05 (*Fibroblasto versus PBS-EDTA e # Fibroblasto versus MNC+EBM)

4.5 VARIABILIDADE CARDIOVASCULAR

Em relação à variabilidade da pressão arterial, os parâmetros espectrais da PAD e PAS estão representados nas tabelas 3 e 4 respectivamente. Os parâmetros relacionados a PAD não apresentaram diferença entre os grupos, no entanto, na PAS foi possível observar que o grupo tratado com fibroblastos apresentou o HF elevado em relação aos demais grupos.

Tabela 3: Valores médios (\pm epm) da pressão arterial diastólica (PAD), variância e dos componentes espectrais VLF, LF e HF da variabilidade da PAD nos grupos experimentais.

	SHR + PBS-EDTA (n=14)	SHR + MNC+EBM (n = 14)	SHR + Fibroblasto (n =11)
Valor Médio (mmHg)	133.42 \pm 4.27	138.66 \pm 2.54	138.16 \pm 2.89
Variância (mmHg)	17.05 \pm 2.15	19.58 \pm 2.54	15.58 \pm 1.64
VLF	5.33 \pm 0.48	6.17 \pm 0.66	5.41 \pm 0.75
LF	8.59 \pm 1.24	8.35 \pm 1.28	6.41 \pm 1.02
HF	2.38 \pm 0.38	3.27 \pm 0.56	3.69 \pm 0.86
LF/HF	4.33 \pm 0.35	4.85 \pm 1.24	3.19 \pm 0.58

Tabela 4: Valores médios (\pm epm) da pressão arterial sistólica (PAS), variância e dos componentes espectrais VLF, LF e HF da variabilidade da PAS nos grupos experimentais.

	SHR + PBS-EDTA (n = 14)	SHR + MNC+EBM (n = 14)	SHR + Fibroblasto (n = 11)
Valor Médio (mmHg)	173.65 \pm 4.30	176.02 \pm 3.43	180.06 \pm 2.31
Variância (mmHg)	26.46 \pm 2.32	36.56 \pm 10.62	28.41 \pm 4.03
VLF	8.23 \pm 1.15	7.95 \pm 0.90	10.77 \pm 2.10
LF	13.55 \pm 1.34	14.68 \pm 2.87	10.93 \pm 2.03
HF	4.05 \pm 1.11	4.76 \pm 0.57	6.61 \pm 1.05*#
LF/HF	4.28 \pm 0.49	3.41 \pm 0.85	3.51 \pm 0.77

*p<0,05 (Fibroblasto versus PBS-EDTA e #Fibroblasto versus MNC+EBM)

Os valores médios (\pm epm) do intervalo de pulso (IP), bem como dos parâmetros de variabilidade no domínio do tempo (variância) e no domínio da frequência (análise espectral) são demonstrados na tabela 5. Nota-se o aumento do intervalo de pulso no grupo tratado com fibroblasto em relação aos outros grupos. Os demais parâmetros avaliados não demonstraram diferença significativa.

Tabela 5: Valores médios (\pm epm) do intervalo de pulso (IP), da variância e dos componentes espectrais VLF, LF e HF dos grupos experimentais

	SHR + Salina (n = 14)	SHR + MNC+EBM (n = 14)	SHR + Fibroblasto (n = 11)
Valor Médio (ms)	160.74 \pm 2.36	162.52 \pm 1.89	179.15 \pm 3.12*#
Variância (ms²)	23.04 \pm 3.28	19.27 \pm 3.27	38.15 \pm 6.67
VLF	8.14 \pm 0.97	8.40 \pm 1.26	10.98 \pm 1.86
LF	3.81 \pm 0.48	3.34 \pm 0.86	5.23 \pm 1.71
LF (nu)	17.73 \pm 2.10	15.87 \pm 2.81	19.77 \pm 2.78
HF	10.14 \pm 1.57	8.71 \pm 2.82	11.97 \pm 3.96
HF (nu)	75.69 \pm 1.75	72.79 \pm 6.82	77.16 \pm 2.59
LF/HF	0.38 \pm 0.03	0.38 \pm 0.06	0.41 \pm 0.07

IP = Intervalo de pulso; VLF = Componente de muito baixa frequência; LF = Componente de baixa frequência; LF (nu) = Componente de baixa frequência normalizado HF = Componente de alta frequência; HF (nu) = Componente de alta frequência normalizado. *p<0,05 (Fibroblasto versus salina e Fibroblasto versus MNC+EBM)

4.6 ANÁLISE DA COERÊNCIA E ALFA ÍNDICE

Na avaliação da coerência entre os sinais de variabilidades do IP e da PAS, através da análise espectral bivariada, onde se observa a relação direta entre o sinal de IP e PAS, os segmentos (300 batimentos) com mais de 50% de coerência e desvio de fase negativos foram computados e não se observou diferenças nas porcentagens de trechos coerentes em relação a quantidade de batimentos total entre os grupos estudados (tabela 6).

Tabela 6: Valores médios das porcentagens de trechos coerentes (\pm epm) no registro basal de uma hora

	SHR + PBS_EDTA (n = 14)	SHR + MNC+EBM (n = 14)	SHR + Fibroblasto (n = 11)
% coerência	37.26 \pm 2.71	32.86 \pm 4.21	32.79 \pm 6.93

O controle barorreflexo espontâneo da frequência cardíaca é baseado na identificação de seqüências de batimentos consecutivos nos quais aumentos progressivos da pressão sistólica são seguidos por aumentos progressivos do intervalo de pulso ou diminuições progressivas de pressão sistólica são seguidas por diminuições progressivas de intervalo de pulso. O controle barorreflexo cardíaco, avaliado pelo alfa-índice pode ser observado na tabela 7. Somente séries temporais de IP e PAS que apresentaram na análise espectral bivariada, coerência acima de 0,5 e desvio de fase negativo, foram incluídas no cálculo do alfa-índice. Foi possível avaliar que os animais tratados com fibroblastos tiveram os valores de alfa-índice superior aos demais grupos, sugerindo uma melhora no controle autônomo do grupo SHR + Fibroblasto.

Tabela 7: Valores médios (\pm epm) do alfa-índice, um índice de sensibilidade barorreflexa espontânea, calculados para a banda LF das oscilações de IP e PAS.

	SHR + PBS_EDTA (n = 14)	SHR + MNC+EBM (n = 14)	SHR + Fibroblasto (n = 11)
Alfa-Índice	0.46 \pm 0.03	0.41 \pm 0.04	0.85 \pm 0.04*#

p<0,05 (*Fibroblasto versus PBS-EDTA e #Fibroblasto versus Monócitos)

4.7 FUNÇÃO ENDOTELIAL

A disfunção endotelial está relacionada com o agravamento da hipertensão devido ao aumento da resistência periférica total e lesões crônicas em órgãos alvos. Neste estudo nós avaliamos a função endotelial através da administração aleatória de drogas vasodilatadoras dependentes e independentes de endotélio, ou seja, acetilcolina (Ach) e nitroprussiato de sódio (NPS), respectivamente. Os painéis A e B da figura 12, referentes a administração de Ach e NPS, respectivamente, demonstraram que não houve diferença significativa entre os grupos independente da dose administrada. Em um tratamento eficaz espera-se que a resposta a Ach melhore com o tratamento, no entanto, nenhuma alteração foi observada neste estudo.

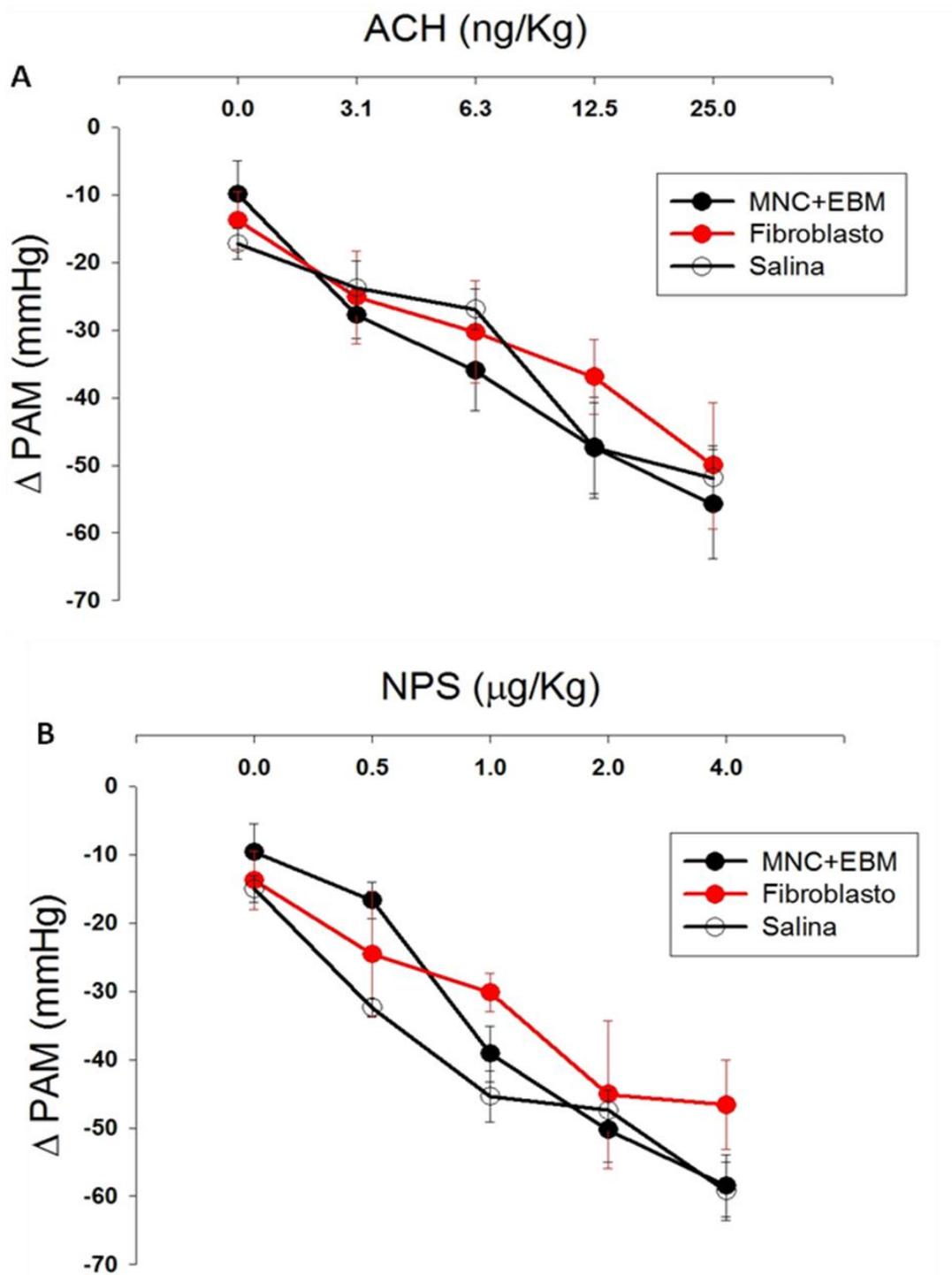


Figura 13: Curvas dose-resposta (média±E.P.M.) da hipotensão arterial induzida por doses crescentes de acetilcolina (painel A) e nitroprussiato de sódio (painel B).

4.8 PESO CARDÍACO RELATIVO E ABSOLUTO

Os valores do peso cardíaco relativo e absoluto é um parâmetro importante na hipertensão arterial, considerando que na hipertensão existe um espessamento da parede e aumento da massa do ventrículo esquerdo como ação compensatória causada pela pressão elevada. Os valores dos pesos cardíacos dos três grupos experimentais podem ser observados na tabela 8.

Tabela 8: Valores médios (\pm epm) do peso cárdico absoluto e relativo que consiste na razão entre o peso cardíaco absoluto e o peso corpóreo do animal.

	SHR + Salina (n = 14)	SHR + MNC+EBM (n = 14)	SHR + Fibroblasto (n = 11)
Peso cardíaco absoluto (gr.)	0.83 \pm 0.02	0.86 \pm 0.02	0.84 \pm 0.01
Peso cardíaco relativo (gr/gr)	4x10 ⁻³ \pm 1x10 ⁻³	4x10 ⁻³ \pm 1x10 ⁻³	3x10 ⁻³ \pm 1x10 ⁻³

4.9 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Os órgãos foram congelados e seccionados em 5 μ m e em seguida analisados no microscópio invertido (Axioobserver Z1, Carl Zeiss, Alemanha), para avaliar a presença de células marcadas com cell tracker, uma vez que todas as células antes de serem utilizadas no transplante fora marcadas com esse traçador molecular. Nenhuma evidência de células transplantadas foi encontrada no baço, pulmão, coração, aorta, rim e músculo esquelético, no entanto estes dados precisam ser confirmados devido ao alto nível de auto-fluorescência detectado nos tecidos dos três grupos avaliados, o que dificultou a análise.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo baseou-se em resultados prévios de Dias da Silva e colaboradores (2005) que administrou células mononucleares derivadas da medula óssea de ratos SHR machos em fêmeas SHR receptoras, e observou a redução dos níveis pressóricos e a melhora da função endotelial descartando um eventual efeito de rejeição imunológica uma vez que utilizaram-se células de animais singênicos. Dessa forma utilizamos células mononucleares de animais hipertensos após cultivo celular em placas recobertas com fibronectina e em meio EBM-2 suplementado com fatores de crescimento endoteliais, com o intuito de observar o efeito terapêutico das mesmas. Essas condições de cultura descritas são propícias para o cultivo de células progenitoras endoteliais e células endoteliais adultas. No entanto, a imunofenotipagem por citometria de fluxo das células cultivadas demonstrou uma população pobre em CD34+ que é um dos principais marcadores de identificação das EPCs juntamente com CD133+. Em contrapartida, os marcadores endoteliais KDR e CD31 apresentaram-se abundantes e aumentaram sua expressão ao longo do tempo de cultivo (tabela 1). A presença de CD45, CD14 e CD4 em cerca de 60-70% das células ao final de 15 dias de cultura evidenciou uma população de células com características fenotípicas de leucócitos, endotélio e monócitos. Os monócitos são uma população celular com potencial de originar endotélio quando estimulada (Harraz e cols., 2001), assim como os linfócitos vasculogênicos (CD31+/CD3+) (Kushner *et al.*, 2010).

Eggermann e colaboradores (2003) relataram que o cultivo de mononucleares derivados de cordão umbilical humano em placas tratadas com fibronectina e meio de crescimento endotelial (EGM) demonstrou baixa expressão de CD34 e CD133, e no terceiro dia de cultura apresentou características de monócito com expressão de CD14 e CD45 e ao logo do sexto e nono dias a cultura apresentou características de endotélio expressando VEGFR-2 e VE-caderina, aumentando também a expressão de CD45 e CD14, corroborando com o resultado encontrado no presente estudo. Outro ponto relevante é que animais hipertensos apresentam leucocitose, ou seja, uma produção elevada de leucócitos o que poderia explicar a abundancia de células expressando CD45 que é um marcador pan leucocitário na cultura (Ohmori *et al.*, 2000).

Características como marcação da superfície celular com lectina vegetal e capacidade de fagocitar LDL acetilado estão relacionadas a células endoteliais e progenitoras endoteliais (Asahara *et al.*, 1997). Entretanto, as células estudadas no presente trabalho apresentaram estas mesmas características (figura 7), de modo que as mesmas poderiam ser denominadas de células mononucleares com potencial de formação de endotélio, dadas as suas características imunofenotípicas de expressão de marcadores de superfície de monócitos, linfócitos e endotélio.

As células cultivadas apresentaram formato fusiforme se assemelhando morfológicamente a EPCs, além de apresentarem a capacidade de formação de vasos *in vitro* quando cultivadas com matrigel por 24 horas. Todas essas características descritas demonstram que as células estudadas se assemelham morfológicamente e funcionalmente a células endoteliais.

Os fibroblastos extraídos da pele de animais hipertensos foram utilizados como um controle positivo de células sem característica de tronco ou progenitoras, para descartar um eventual efeito inespecífico do transplante celular. A cultura de fibroblastos foi submetida ao protocolo de diferenciação adipogênica e osteogênica e apresentaram a capacidade de se diferenciar em adipócitos e em osteócitos respectivamente, sugerindo uma semelhança com as células mesenquimais tanto morfológicas quanto funcionais podendo ser denominadas de células mesenquimais fibroblastoídes ou células mesenquimais maduras. Oliveira (2010) relatou que células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de animais hipertensos apresentaram uma capacidade reduzida de diferenciação. Este mesmo fato pode ser observado nos nossos resultados, onde as imagens referentes às diferenciações (figura 9) demonstraram uma baixa taxa de diferenciação.

Blasi e colaboradores (2011) relataram que fibroblastos derivados da derme humana não apresentavam capacidade angiogênica quando cultivados na presença de matrigel *in vitro*, o mesmo pode ser observado neste estudo, onde os fibroblastos não formaram vasos em cultura, assim os fibroblastos demonstraram ser uma população celular ideal para o controle do tratamento, uma vez que são células maduras com baixo potencial de diferenciação e incapazes de formar vasos *in vitro*.

Os fibroblastos podem apresentar alta capacidade proliferativa e uma certa capacidade de diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica quando devidamente estimulados, assemelhando-se morfológicamente e funcionalmente às células tronco mesenquimais (MSC) (Lysy *et al.*; 2007). Em nossos estudos foi

possível comprovar a capacidade dessas células se diferenciarem em osteoblastos e adipócitos (figura 10 B e C), além de serem capazes de secretar colágeno em cultura (figura 9). As MSC são definidas pela sua capacidade de aderência ao plástico, multipotência e expressão de CD73, CD105 e ausência de marcadores hematológicos CD14, CD34 e CD45, mas estas propriedades e marcadores são características compartilhadas pelos fibroblastos (Horwitz *et al.*, 2005).

A atual definição dada pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) é que as células MSC são indistinguíveis dos fibroblastos (Horwitz *et al.*, 2005). Estudos recentes envolveram marcadores SSEA-1, SSEA-4 e GD2, e estabeleceram uma hierarquia entre as células mesenquimais (Lysy *et al.*, 2007 e Martinez *et al.*, 2007). Apesar destas limitações alguns estudos defendem que MSC constituem um único tipo celular distinto dos fibroblastos (Horwitz *et al.*, 2005), outros trabalhos definem os fibroblastos com capacidade de diferenciação como células tronco mesenquimais fibroblásticas (MSCs fibroblásticas). MSCs fibroblásticas derivadas da derme são foco de aplicações terapêuticas em transplante para apoiar a formação óssea (Hirata *et al.*; 2003 e Ruthenford *et al.*, 2002).

Lorenz e colaboradores (2008) demonstraram que os fibroblastos derivados da derme humana apresentam *in vitro* características comuns a células troncos derivadas de tecido adiposo (ADSCs), com fenótipo e potencial de diferenciação similares. Dadas essas características de potencial de proliferação, diferenciação e facilidade da obtenção das MSCs fibroblásticas, uma vez que a pele é o maior órgão humano e é dissecado diariamente em cirurgias plásticas e reparativas, este tipo celular pode se tornar uma ótima ferramenta nas pesquisas de medicina regenerativa.

Para verificar a hipertensão dos animais utilizados no estudo, todos os animais foram submetidos ao método de pletismografia de cauda alguns dias antes do transplante, e ao longo do protocolo experimental os animais foram submetidos a este protocolo a fim de monitorar a pressão arterial sistólica e a frequência cardíaca. A pressão arterial sistólica não apresentou alterações significativas nos grupos estudados. No entanto, a frequência cardíaca nos animais tratados com fibroblastos apresentou-se reduzida por volta do décimo primeiro dia pós transplante quando comparado ao grupo transplantado com MNC+EBM.

O reflexo pressorreceptor é considerado um sistema de controle de alto ganho que mantém a pressão arterial dentro de limites normais em períodos de

segundos a minutos. Assim como o diagnóstico e tratamento da hipertensão arterial focado no nível basal da pressão sanguínea determina grande redução da morbimortalidade da população, a variabilidade momento a momento da pressão arterial por si, cujo controle é função do barorreflexo, é também de importante significado clínico (Santos *et al.*, 2001). Estudos clínicos têm mostrado, por exemplo, que uma reduzida sensibilidade do barorreflexo está associada com a morte súbita que se segue ao infarto agudo do miocárdio. Os fibroblastos apresentaram redução da frequência cardíaca através de medidas diretas da hemodinâmica basal, este fato foi associado a um aumento significativo da sensibilidade barorreflexa espontânea, sugerindo que os fibroblastos poderiam estar agindo diretamente ou indiretamente no controle autonômico cardíaco dos animais transplantados. Os mecanismos envolvidos neste efeito não são conhecidos, mas poderiam envolver efeitos parácrinos secretores destas células ou efeitos locais por incorporação destas células em núcleos do sistema nervoso central, como por exemplo o núcleo do trato solitário (NTS) que controla as variações de atividade de vários centros cardiovasculares; alterando tônus simpático e parassimpático destes. Em apoio a um possível efeito em núcleos do SNC, estudo recente demonstrou que células mononucleares transplantadas sistemicamente possuem a capacidade de atravessar a barreira hematocefálica e agir diretamente no NTS, promovendo alterações no controle simpatotônico (Paton, 2009). Outra hipótese plausível é que os fibroblastos poderiam estar interagindo diretamente no nodo sinusal retardando o processo de despolarização diastólica lenta e assim conseqüentemente retardando a geração do impulso cardíaco e dessa forma diminuindo o ritmo da frequência cardíaca. As alterações observadas na FC não foram acompanhadas por mudanças na pressão arterial avaliada seja indiretamente pelo método de oclusão da artéria caudal, seja pelo método direto via cateter intra-arterial.

Os dados obtidos através da medida indireta na PAS e FC foram confirmados a partir do processamento de medidas diretas obtidas após implantação de cateteres intra-arteriais e registro basal de cada animal. De fato, as medidas hemodinâmicas diretas da pressão arterial sistêmica confirmaram os achados da pletismografia de um estado bradicárdico dos animais tratados com fibroblastos, sem alterações na PAS, além da ausência de efeitos sobre a PAS e FC no grupo tratado com células mononucleares cultivadas em EBM.

O sistema cardiovascular sofre influências de vários outros sistemas e pode apresentar alterações de diversos parâmetros, em especial o sistema nervoso autonômico que age diretamente na pressão arterial e na frequência cardíaca que são os parâmetros primordiais relacionados à síndrome hipertensiva. Nós avaliamos a variabilidade da FC (intervalo de pulso) e da PA por meio da análise no domínio do tempo (via quantificação da variância) e no domínio da frequência (através da análise espectral). Indivíduos hipertensos apresentam predominância da atividade simpática, sendo este uma das causas do quadro hipertensivo (Wyss, 1993). Tendo em vista esta característica, nós avaliamos a variabilidade da FC (intervalo de pulso) e da PA por meio da análise no domínio do tempo (determinação da variância) e no domínio da frequência (através da análise espectral). A variabilidade da pressão arterial diastólica não demonstrou diferenças estatísticas de nenhum dos parâmetros entre os grupos, no entanto no estudo da pressão arterial sistólica demonstrou diferença estatística entre o grupo transplantado com fibroblasto versus grupo PBS-EDTA para o parâmetro de alta frequência HF, o que pode sugerir que os animais transplantados com fibroblastos estavam com hiperventilação, pois o HF na pressão arterial está relacionado diretamente com o controle respiratório.

Fibroblastos são células grandes e quando são transplantadas via jugular eles passam pelo pulmão e muitas deles não conseguem atravessar os capilares e obstruem a passagem de sangue promovendo micro-êmbolos na circulação pulmonar, que pode ser responsável pela morte celular de muitas das células transplantadas, outras células conseguem fazer diapedese e se localizam entre os vasos, no pericito auxiliando nas funções e reparo tecidual (Toma *et al.*, 2009). No nosso estudo acreditamos que as células possam estar permanecendo no pulmão e promovendo uma obstrução de microcapilares e conseqüentemente diminuindo a capacidade respiratória, promovendo a hiperventilação nos animais transplantados.

Na análise da variabilidade da frequência cardíaca podemos observar que os animais tratados com fibroblastos apresentaram-se bradicárdicos comparados aos outros grupos. Os demais parâmetros não apresentaram nenhuma diferença. Este resultado corrobora com os resultados de pletismografia de cauda que mostrou que os animais do grupo fibroblasto estavam com a frequência cardíaca menor que os outros dois grupos.

Vários trabalhos científicos recentes têm identificado diversos tipos celulares derivados da medula óssea com propriedades vasculogênicas, como os fibrócitos,

linfócitos e monócitos, além das células reconhecidamente tronco (Seta e Kuwana, 2007 e 2010). Os dados de citometria revelaram que a cultura de células mononucleares em EBM seleciona uma população rica em CD14+, CD45+, CD31+, CD4+ e KDR+ e pobre em CD34-. Os monócitos são células com capacidade angiogênica (Harras *et al.*, 2001), assim como os linfócitos CD3+ e CD31+ (Kushner *et al.*, 2010) e podem estar constituindo essa cultura. Desta forma monócitos e linfócitos poderiam estar envolvidos diretamente na produção de novos vasos promovendo uma melhora da rarefação microvascular e melhorando a resposta ao óxido nítrico (NO), diretamente via incorporação na parede endotelial ou poderiam estar agindo de forma indireta produzindo citocinas e fatores angiogênicos. Baseado nisso, avaliamos a função endotelial dos animais transplantados através da administração aleatória de drogas vasodilatadoras com ação dependente e independente do endotélio (acetilcolina e nitroprussiato de sódio, respectivamente). Nossos resultados não demonstraram melhora na função endotelial de nenhum dos grupos avaliados, sugerindo que as terapias celulares com células mononucleares cultivadas em EBM ou fibroblasto não são alternativas viáveis para o tratamento da hipertensão arterial sistêmica.

A sensibilidade dos barorreceptores é uma excelente medida de função autonômica (Ferrer *et al.*, 1991), a análise espectral cruzada entre duas variáveis de interesse pode ser realizada para determinar a coerência (relação de dependência linear entre as variabilidades de dois sinais) e o desvio de fase (relação temporal entre as variabilidades de dois sinais) (Ando *et al.*, 1998). O índice alfa, calculado a partir da relação entre as oscilações do intervalo de pulso (IP) e da pressão arterial sistólica (PAS) nas regiões de baixa frequência, tem sido usado como um índice aceitável de estimativa do controle barorreflexo espontâneo da frequência cardíaca. Assim, a sensibilidade do controle reflexo da frequência cardíaca pode ser avaliada dentro do registro basal de pressão arterial, sendo denominado de barorreflexo espontâneo. Nossos resultados demonstraram um aumento significativo do alfa índice nos animais tratados com fibroblastos, o que sugere uma melhor modulação do controle autonômico parassimpático vagal cardíaco nesses animais. Tendo em vista que na hipertensão existe uma super estimulação do sistema nervoso simpático, promovendo um quadro taquicárdico, esta melhora na sensibilidade barorreflexa espontânea poderia ser benéfica para o coração destes animais. Protegendo-os contra arritmias cardíacas e morte súbita. Os dados de coerência

avaliados não demonstraram significância em relação à porcentagem de trechos coerentes entre os animais sugerindo que a melhora do alfa índice não está associada a um aumento de trechos coerentes, mas sim a uma melhora na resposta do barorreflexo espontâneo.

Considerando que a terapia celular com fibroblastos promoveu uma diminuição na frequência cardíaca e associando a melhora do barorreflexo espontâneo estimado pelo alfa índice podemos dizer que os fibroblastos apresentam a capacidade de melhorar a modulação vagal cardíaca e ou reduzir a modulação simpática, com reflexos positivos sobre a função do coração.

Em pacientes hipertensos a elevação da pressão arterial produz um aumento na tensão da parede do ventrículo esquerdo, o qual pode levar a uma resposta caracterizada por aumento da massa ventricular e espessamento da parede, essa alteração é considerada compensatória (Lorell *et al.*, 2000). Em nosso estudo avaliamos o peso cardíaco absoluto e relativo para observar se a terapia celular com células mononucleares cultivadas em EBM ou com fibroblastos melhoraria a hipertrofia cardíaca. Nossos resultados, no entanto, mostram que não houve diferença significativa entre os grupos, o que indica que o tratamento proposto não é eficaz em reduzir a hipertrofia cardíaca, provavelmente por também não ser capaz de reduzir a pressão arterial sistêmica.

Nossos dados mostraram uma completa incapacidade das células mononucleares de medula óssea cultivadas em meio endotelial de exercerem qualquer efeito anti-hipertensivo nos animais SHR. As razões para tal ineficiência poderiam residir no fato de que estas células, com características monocíticas, de linfócitos e de endotélio podem apresentar modificações funcionais decorrentes do fundo genético hipertensivo próprio dos SHRs. De fato, trabalhos de Imanishi e cols. (2005) e Oliveira (2010) tem evidenciado déficits funcionais em outros tipos celulares com características multipotentes como células progenitoras endoteliais e células tronco mesenquimais, respectivamente.

A comparação entre os grupos celulares com capacidade de formação de endotélio e células maduras sem capacidade angiogênica demonstrou que o cultivo de células mononucleares em meio basal de endotélio reduz o efeito terapêutico sobre a hipertensão observado no trabalho de Dias da Silva (2005), onde se utilizou mononucleares da medula óssea a fresco. Embora seja notável que o número de células administradas neste trabalho seja inferior, dados não demonstrados

confirmam a ineficiência do efeito terapêutico das MNC+EBM mesmo com o aumento do número de células transplantadas, o que confirma um possível defeito funcional das células. Os fibroblastos são células maduras e em situação normal não apresentam capacidade proliferativa e de diferenciação, no entanto, o cultivo das mesmas parecem estimular essas propriedades, e quando utilizadas como possível terapia anti-hipertensiva surpreendeu demonstrando melhora nos parâmetros como redução da frequência cardíaca e aumento da sensibilidade barorreflexa. Entretanto não alterou os níveis pressóricos dos animais tratados, sendo assim não se pode afirmar que os fibroblastos sejam um alvo terapêutico ideal para o tratamento da hipertensão uma vez que por definição a hipertensão é a elevação dos níveis pressóricos mantidos durante 24 horas (Guyenet, 2006).

6. CONCLUSÃO

Em conclusão, o transplante de células mononucleares cultivadas em meio basal endotelial não apresentou efeitos anti-hipertensivos significativos quando aos parâmetros de hemodinâmica e de variabilidade cardiovascular avaliados no modelo de hipertensão arterial sistêmica espontânea em ratos.

Em contrapartida a utilização de fibroblastos como células controle obtidos da derme de animais espontaneamente hipertensos demonstrou uma melhora significativa na frequência cardíaca e do barorreflexo espontâneo nos ratos espontaneamente hipertenso. No entanto, não se pode afirmar que a utilização deste tipo celular seja uma alternativa terapêutica, uma vez que os parâmetros de variabilidade cardíaca e os valores de pressão arterial sistólica e diastólica não demonstraram diferença entre os grupos estudados.

Acreditamos que a ineficiência terapêutica das MNC+EBM e fibroblastos utilizados está relacionada ao déficit funcional das células dos animais com hipertensão arterial sistêmica evidenciados em estudos anteriores.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS

1. I Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. Sociedade Brasileira de Cardiologia / Sociedade Brasileira de Hipertensão / Sociedade Brasileira de Nefrologia. Arq Bras Cardiol 2010; 95(1 supl.1): 1-51
2. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Imunologia celular e molecular. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 564 p.
3. Ando S, Dajani HR, Senn BL, Newton GE, Floras JS. Sympathetic alternant. Evidence for arterial baroreflex control of muscle sympathetic nerve activity in congestive heart failure. Circulation 1997; 95:316-319.
4. Asahara T, Kawamoto A. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. Am J Physiol Cell Physiol. 2004, 287(3): C572-C579.
5. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science. 1997, 275(5302):964-967.
6. Blasi A, Martino C, Balducci L, Saldarelli M, Soletti A, Navone SE, Canzi L, Cristini S, Parati EA, Alessandri G. Dermal fibroblasts display similar phenotypic and differentiation capacity to fat-derived mesenchymal stem cells, but differ in anti-inflammatory and angiogenic potential. Vascular Cell. 2011, 3:5.
7. Binder A. A review of the genetics of essential hypertension. Curr. Opin. Cardiol 2007, 22:176-184.
8. Borelli FAO, Sousa MG, Passarelli O, Pimenta E, Gonzaga C, Cordeiro A, Lotaif L, Amodeo C. Hipertensão arterial no idoso: importância em se tratar. Rev Bras Hipertens. 2008;15(4): 236-239.

9. Brooks VL, Haywood JR, Johnson AK. Translation of salt retention to central activation of the sympathetic nervous system in hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2005, 32(5-6):426-432.
10. Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, Hogan M Cerami A: Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med* 1994; 1: 71–81
11. Caligiuri G, Groyer E, Khallou-Laschet J, Zen AH, Urbain D, Gaston A, Nicoletti A, Lafont A. Reduced Immunoregulatory CD31+T Cells in the Blood of Atherosclerotic Mice with Plaque Thrombosis. Oxford Univ Press. 2005, p. 1069.
12. Caligiuri G, Rossignol P, Julia P, Groyer E, Mouradian D, Urbain D, Misra N, Ollivier V, Sapoval M, Boutouyrie P, Kaveri SV, Nicoletti A, Lafont A, Reduced Immunoregulatory CD31(+) T cells in patients with atherosclerotic abdominal aortic aneurysm, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2006,26:618–623.
13. Carvalho MHC, Nigro D, Lemos VS, Tostes RCA, Fortes ZB. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. *Rev Bras Hipertens*. 2001, 8(1): 76-88.
14. Child JA, Morgan GJ, Davies FE, Owen RG, Bell SE, Hawkins K, Brown J, Drayson MT, Selby PJ. High-dose chemotherapy with stem-cell rescue for multiple myeloma. *N Eng J Med* 2003;348(19):1875-83.
15. Cline MJ, Lehrer RI, Territo MC, Golde DW. UCLA Conference. Monocytes and macrophages: functions and diseases. *Ann Intern Med*. 1978, 88:78–88.
16. Coleman TG, Hall JE. Systemic hemodynamics and regional blood flow regulation. In: *Hypertension Primer: The Essentials of High Blood Pressure*. Izzo, JL, Sica DA, Black HR (Ed.). 4th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, 129-132, 2008.

17. Cooper RS, Tayo B. Geographic patterns of hypertension: a global perspective. *In: Hypertension Primer: The Essentials of High Blood Pressure*. Izzo, JL, Sica DA, Black HR (Ed.). 4th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, 239-241, 2008.
18. De Boer RW, Karemaker JM, Strackee j. Hemodynamic fluctuations and baroreflex sensitivity in humans. *American Journal of Physiology Heart Circulation*. 1987, 253(22):H680-H689.
19. Dias da Silva VJ, Machado MP, Rocha AM et al. Bone marrow stem/progenitor cells reduce arterial blood pressure and ameliorate endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *FASEB Journal (Abstract) FASEB J*. 2005, 19: 7439-7439.
20. Dias Da Silva VJ; Machado MPR; Voltarelli JC. Current Status Of Cell Therapy For Systemic Arterial Hypertension. *Expert Review Of Cardiovascular Therapy*. 2009; 7:1307-1311.
21. Durbin, J."The fitting of time series models." *Rev. Inst. Int. Stat.* 1960, 28:233-243.
22. Eggermann j, Kliche S, Jarmy G , Hoffmann K, Mayr-Beyrle U, Debatin KM, Waltenberger J, Beltinger C. Endothelial progenitor cell culture and differentiation in vitro: a methodological comparison using human umbilical cord blood. *Cardiovascular Research*. 2003, 58:478-486.
23. Fernandez-Pujol B, Lucibello FC, Gehling UM, Lindermann k, Weidner N, Zuzarte ML, Adamkierwicz J, Elsasser HP, Muller R, Havemann K. Endothelial-like cells derived from human CD14 positive monocytes.*Differentiation* 2000;65:287-300.
24. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*. 1998, 279:1528-1530.

25. Ferrer MT, Kennedy WR, Sahinen F. Baroreflexes in patients with diabetes mellitus. *Neurology* 1991; 41:1462-1466
26. Francois M, Abboud MD. The Sympathetic System in Hypertension. *Hypertension*. 1992, 4: 208-225.
27. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285:1182– 6.
28. Ganten D, Jong W. *In: Handbook of Hypertension*. Elsevier Science, 1994.
29. Gaziev J, Lucarelli G. Stem cell transplantation for thalassemia. *Reprod Biomed Online* 2005;10(1):111-5
30. Gluckman E, Auerbach AD, Horowitz MM, Sobocinski KA, Ash RC, Bortin MM, Butturini A, Camitta BM, Champlin RE, Friedrich W, Good RA, Gordon-Smith EC, Harris RE, Klein JP, Ortega JJ, Pasquini R, Ramsay NK, Speck B, Vowels MR, Zhang MJ, Gale RP. Bone marrow transplantation for Fanconi's anemia. *Blood* 1995, 86(7):2.856-62.
31. Godon S. The macrophage. *Bioessays* 1995;17:977–986.
32. Guyenet PG. The sympathetic control of blood pressure. *Nature Reviews Neuroscience*. 2006, 7: 335-346.
33. Guyton AC, HALL JE. *Tratado De Fisiologia Médica*. 10. Ed. Rj . Guanabara Koogan, 2002.
34. Hartlapp I, Abe R, Saeed RW, Peng T, Voelter W, Bucala R, Metz CN. Fibrocytes induce an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and promote angiogenesis in vivo. *The FASEB Journal*. 2001,15: 2215-2224.
35. Harraz M, Jiao C, Hanlon HD, Hartley RS, Schatteman GC. CD34 blood-derived human endothelial cell progenitors. *Stem Cells*. 2001, 19: 304–312.

36. Heathcote, J.G.; Grant, M.E. The molecular organization of basement membranes, *Int Rev Connect Tissue Res.*1981, 9.
37. Hill, JM, Finkel T, Quyyumi AA. Endothelial progenitor cells and endothelial dysfunction. *Vox Sanguinis.* 2004 87(suppl.): S31-S37.
38. Hirata K, Tsukazaki T, Kadowaki A, Furukawa K, Shibata Y, Moriishi T, Okubo Y, Bessho K, Komori T, Mizuno A, Yamaguchi A. Transplantation of skin fibroblasts expressing BMP-2 promotes bone repair more effectively than those expressing Runx2. *Bone* 2003; 32: 502–512.
39. Holmberg LA, Stewart FM. Hematopoietic stem cell transplantation for non Hodgkin's lymphoma. *Oncology (Huntingt)* 2003, 17(5):627-32.
40. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005;7:393-5
41. Hur J, Yang HM, Yoon CH, Lee CS, Park KW, Kim JH, Kim TY, Kim JY, Kang HJ, Chae IH, Oh BH, Park YB, Kim HS. Identification of a novel role of T cells in postnatal vasculogenesis—characterization of endothelial progenitor cell colonies, *Circulation* 116 (2007) 1671–1682
42. Imanishi T, Kobayashi K, Hano T, Nishio I. Effect of estrogen on differentiation and senescence in endothelial progenitor cells derived from bone marrow in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res.* 2005, 28(9):763-72.
43. Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, Goodell MA. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest.* 2001, 107:1395-1402.

44. Judy WV, Watanabe AM, Henry DP, Besch HR Jr, Murphy WR, Hockel GM. Sympathetic nerve activity: role in regulation of blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Circ. Res.* 1976, 38(6):21-29.
45. Keating A. Mesenchymal stromal cells. *Curr Opin Hematol* 2006, 13:419-425.
46. Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96:10711-10716.
47. Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell.* 105:369-377, 2001.
48. Kushner EJ, MacEneaney OJ, Morgan RG, Engelenburg AMV, Guilder GPV, De Souza CA. CD31+ T cells represent a functionally distinct vascular T cell phenotype. *Blood Cells, Molecules, and Diseases.* 2010, 44:74–78.
49. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med.* 2000; 6:1229-1234.
50. Levinson, N. "The Wiener RMS error criterion in filter design and prediction." *J. Math. Phys.* 1947, 25: 261-278.
51. Levy BI, Ambrosio G, Pries AR et al. Microcirculation in hypertension: a new target for treatment? *Circulation.* 2001;104:735-740.
52. Lysy PA, Smets F, Sibille C, Najimi M, Sokal EM. Human skin fibroblasts: From mesodermal to hepatocyte-like differentiation. *Hepatology* 2007;46:1574-85.
53. Lorell BH, Carabello BA. Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation* 102: 470-9, 2000

54. Lorenz, K.; Sicker, M.; Schmelzer, E.; Rupf, T.; Salvetter, J.; Schulz-Siegmund, M.; Bader, A. Multilineage differentiation potential of human dermal skin-derived fibroblasts. *Experimental Dermatology*. 2008, 17: 925–932.
55. Magen E, Feldman A, Cohen Z, Alon DB, Minz E, Chernyavsky A, Linov L, Mishal J, Schlezinger M, Stoeber Z. Circulating Endothelial Progenitor Cells, Th1/Th2/Th17-Related Cytokines, and Endothelial Dysfunction. Resistant Hypertension. *The American Journal of the Medical Sciences*. 2010,339(2).
56. Malliani A, Pagani M, Lombardi F, Cerutti S. Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. *Circulation*, 1991; 81:537-547.
57. Martinez C, Hofmann TJ, Marino R, Dominici M, Horwitz EM. Human bone marrow mesenchymal stromal cells express the neural ganglioside GD2: a novel surface marker for the identification of MSCs. *Blood* 2007; 109:4245-8.
58. McIntyre M, Bohr DF, Dominiczak AF. Endothelial function in hypertension: the role of superoxide anion. *Hypertension*. 1999, 34:539-545.
59. Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKeffer SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science*. 2000, 290:1779-1782.
60. Miyamoto T, Ohneda O, Arai F, Iwamoto K, Okada S, Takagi K et al. Bifurcation of osteoclasts and dendritic cells from common progenitors. *Blood* 2001;98:2544–2554
61. Minor, R.R. Collagen metabolism. *An J Pathol*, 98:255, 1988.
62. Moldovan NI, Goldschmidt-Clermont PJ, Parker-Thornburg J et al. Contribution of monocytes/macrophages to compensatory neovascularization: the drilling of metalloelastase-positive tunnels in ischemic myocardium. *Circ Res*. 2000, 87:378-384.

63. Moore BB, Kolodsick JE, Thannickal VJ, Cooke K, Moore TA, Hogaboam C, Wilke CA, Toews GB: CCR2-mediated recruitment of fibrocytes to the alveolar space after fibrotic injury. *Am J Pathol* 2005; 166: 675–684.
64. Mota ACA, Soares MBP, Santos RR. Uso de terapia regenerativa com células-tronco da medula óssea em doenças cardiovasculares – perspectiva do hematologista. *Rev. bras. hematol. hemoter.* 2005; 27(2):126-132.
65. Murasawa S, Asahara T. Endothelial progenitor cells for vasculogenesis. *Physiology (Bethesda)*. 2005, 20:36-42.
66. Neuhuber B, Swanger SA, Howard L, et al. Effects of plating density and culture time on bone marrow stromal cell characteristics. *Experimental Hematology*. 2008, 36:1176-1185.
67. Ohmori M, Kitoh Y, Harada K, Sugimoto. K, Fugimura. A Polimorphonuclear leukocytes (PMN) functions in SHR, L-NAME ans DOCA/salt-induced hypertensive rats. *Journal Hypertension*. 2000, 18: 703-707.
68. Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jap. Cir. J.* 1963; 27: 282-293.
69. Oliveira LF de. Avaliação das células tronco mesenquimais de medula óssea em ratos normotensos Wistar-Kyoto (WKY) e espontaneamente hipertensos (SHR) [dissertação]. Uberaba: Universidade Federal do Triângulo Mineiro; 2010.
70. Orkin S, Zon L. Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell. *Biology Cell*. 2008, 132: 631–644.
71. Orlic, D; Kajstura, J; Chimenti, S; Jakoniuk, I; Anderson, SM; Li, B; Pickel, J; McKay, R; Nadal-Ginard, B; Bodine, DM; Leri, A; Anversa, P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001, 410: 701 – 705.

72. Pagani M, Lombardi F, Guzzetti S, Rimoldi O, Furlan R, Pizzinelli P, Sandrone G, et al. Power spectral analysis of heart rate and arterial pressure variabilities as a marker of sympatho-vagal interaction in man and conscious dog. *Circ Res.* 1986;59:178-3.
73. Pan H, Jiang HL, Chen WL. Interaction of dermal fibroblast with electrospun composite polymer scaffolds prepared from dextran and poly lactide-co-glycolide. *Biomaterials.* 2006, 27(17): 3209-3220
74. Paton JF, Waki H. Is neurogenic hypertension related to vascular inflammation of the brainstem? *Neurosci Biobehav.* 2009,33(2):89-94.
75. Perin EC, Geng YJ, Willerson JT. Adult stem cell therapy in perspective. *Circulation.* 2003, 107:935-938.
76. Phillips RJ, Burdick MD, Hong K, Lutz MA, Murray LA, Xue YY, Belperio JA, Keane MP, Strieter RM: Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis. *J Clin Invest* 2004; 114: 438 – 446
77. Prewitt RL, Chen II, Dowell R. Development of microvascular rarefaction in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol.* 1982, 243:H243-H25.
78. Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995;11:73– 91.
79. Rutherford R B, Moalli M, Franceschi R T, Wang D, Gu K, Krebsbach P H. Bone morphogenetic protein-transduced human fibroblasts convert to osteoblasts and form bone in vivo. *Tissue Eng.* 2002, 8: 441–452.
80. Santos RR, Soares MBP, Carvalho ACC. Transplante de células da medula óssea no tratamento da cardiopatia chagásica crônica. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2004,37(6):490-495.

81. Schatteman, G. C; Dunnwald, M.; Jiao, C. Biology of bone marrow-derived endothelial cell precursors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007, 292: H1–H18.
82. Seta N; Kuwana M. Human circulating monocyte as multipotential progenitors. *The Keio J. Med*. 2007, 56: 41-47.
83. Seta N; Kuwana M. Derivation of multipotent progenitors from human circulating CD14 monocytes. *Experimental Hematology*. 2010;38:557–563.
84. 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.
85. Stites DP, Terr AI. *Imunologia Básica*. Rio de Janeiro: Editora Prentice –Hall do Brasil Ltda, 1992.
86. Swirski FK, Pittet MJ, Kircher MF, Aikawa E, Jaffer FA, Libby P et al. Monocyte accumulation in mouse atherogenesis is progressive and proportional to extent of disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006, 103:10340–10345
87. TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY; THE NORTH AMERICAN SOCIETY OF PACING AND ELECTROPHYSIOLOGY. Guidelines: Heart Rate Variability: Standards of Measurement, Physiological Interpretation, and Clinical Use. *Eur Heart J* 1996;17:354-81.
88. Theise ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM, Krause DS. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology*. 2000, 31:235-240.
89. Toma C, Wagner WR, Bowry S, Schwartz A, Villanueva F. Fate Of Culture-Expanded Mesenchymal Stem Cells in The Microvasculature: In Vivo Observations of Cell Kinetics. *Circ. Res*. 2009, 104: 398-402.

90. Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension*. 2004, 44:248-252.
91. Trippodo NC, Frohlich ED. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat. *Circ Res*. 1981, 48:309-319.
92. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res*. 2004, 95:343-353.
93. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Number and Migratory Activity of Circulating Endothelial Progenitor Cells Inversely Correlate With Risk Factors for Coronary Artery Disease. *Circulation Research*. 2001;89:1-7
94. Verfaillie CM. Hematopoietic stem cells for transplantation. *Nat Immunol*. 2002, 3:314-317.
95. Wang QR, Yan ZJ, Wolf NS. Dissecting the hematopoietic microenvironment. VI. The effects of several growth factors on the growth of murine bone marrow CFU-F. *Exp Hematol* 1990, 18:341-347.
96. Welch, PD; "The Use of Fast Fourier Transform for the Estimation of Power Spectra: A Method Based on Time Averaging Over Short, Modified Periodograms", *IEEE Transactions on Audio Electroacoustics*. 1967,15:70–73.
97. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Bohm M, Nickenig G. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med*. 2005, 353:999-1007.
98. Wyss JM. The role of sympathetic nervous system in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1993, 2(2):265-273

99. World Health Organization. International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension: Guidelines Subcommittee. *J. Hypertens.* 1999, 17: 151-183.
100. Zubair AC, Silberstein L, Ritz J. Adult hematopoietic stem cell plasticity. *Transfusion.* 2002, 42:1096-1101.