

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Patrícia de Carvalho Ribeiro

**CÉLULAS TRONCO CARDÍACAS NA HIPERTENSÃO ARTERIAL
ESPONTÂNEA EM RATOS**

Uberaba

2016

Patrícia de Carvalho Ribeiro

Células Tronco Cardíacas na Hipertensão Arterial Espontânea em Ratos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, área I: Bioquímica, Farmacologia e Fisiologia, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva

Uberaba

2016

Patrícia de Carvalho Ribeiro

CÉLULAS TRONCO CARDÍACAS NA HIPERTENSÃO ARTERIAL
ESPONTÂNEA EM RATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, área I: Bioquímica, Farmacologia e Fisiologia, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre.

_____ de _____ de _____.

Banca Examinadora:

Dr. Valdo José Dias da Silva – Orientador
Universidade Federal do Triângulo Mineiro – Uberaba, MG

Dra. Roseli Aparecida da Silva Gomes
Universidade Federal do Triângulo Mineiro – Uberaba, MG

Dra. Heloisa Cristina Caldas
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – São José do Rio Preto, SP

Dedico aos meus pais, Carlos e Marisa,
fontes de apoio e sabedoria.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por Sua presença durante toda esta jornada.

Agradeço aos meus pais, Carlos e Marisa, pelo amparo e incentivo. Obrigada pelo apoio e pelas palavras sempre tão repletas de sabedoria. À minha irmã Priscila e meu cunhado Júlio, obrigada por toda compreensão, incentivo e amparo. Ao meu namorado Rafael, obrigada pela paciência, carinho, conselhos e apoio durante esta caminhada.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva, pela oportunidade e confiança ao me orientar. Obrigada pelas palavras, sempre repletas de muito conhecimento, pela paciência, pelo incentivo e por ser o excelente pesquisador e professor que é. Sou muito grata por todos os momentos de aprendizado durante esta trajetória.

Agradeço ao Dr. Lucas Felipe de Oliveira, funcionário e amigo do laboratório de Fisiologia, pelos ensinamentos e ajuda de bancada, pelo incentivo e por acompanhar cada etapa deste trabalho. Agradeço aos amigos, Dra. Angélica Cristina Alves e Daniel Mendes Filho, pelo apoio e auxílio na realização dos experimentos. Agradeço também ao Me. Thalles Ramos Almeida e à Ma. Thaís Soares Farnesi, pelos conselhos e motivação. Ao Dr. Jiyuan Sun e ao Dr. Marcos Vinícius da Silva, agradeço pelo auxílio na realização deste trabalho.

À Elisabete Perez Caramori Ambrosio, Me. Glauco Rocha Finholdt, Ma. Gleice Kelly de Sousa, Ma. Livia Alves Martins, Ma. Lígia Carolina da Silva Prado, Prof. Dr. Aldo Rogelis Aquiles Rodrigues, funcionário Donizete Ponciano e a todos do laboratório de Fisiologia, muito obrigada pela convivência e ajuda sempre que necessitei. Agradeço também aos funcionários e professores dos laboratórios de Histologia e Imunologia da UFTM pelo auxílio durante esta trajetória.

Agradeço à CAPES, pela concessão da bolsa de Mestrado.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o número de células tronco cardíacas c-Kit⁺-CD45^{neg} e Sca-1⁺-CD45^{neg}, por meio de citometria de fluxo, e células tronco mesenquimais cardíacas, por meio do ensaio de unidades formadoras de colônias semelhantes a fibroblastos (“Colony Forming Unit-Fibroblasts”-CFU-F), no coração de ratos espontaneamente hipertensos (SHR), comparando com ratos normotensos (WKY). Para tal, ratos SHR e WKY jovens (de 4 semanas de idade) e adultos (de 14 e 30 semanas de idade) foram avaliados tendo seus corações removidos após eutanásia para extração de células tronco via fragmentação mecânica, digestão enzimática (com colagenase tipo I ou Tripsina-EDTA) e filtração diferencial (em 40µm ou 70µm). A suspensão de células cardíacas resultante foi então analisada por citometria de fluxo, a fim de quantificar o número de células tronco cardíacas c-Kit⁺-CD45^{neg} e Sca-1⁺-CD45^{neg} ou semeadas em baixa densidade em placas de cultura, a fim de quantificar o número de CFU-Fs, as quais se originam clonalmente de células tronco mesenquimais cardíacas individuais. Os animais SHR apresentaram-se hipertensos e com hipertrofia cardíaca a partir da 14^a semana de idade. A quantidade das células tronco cardíacas c-Kit⁺-CD45^{neg} no coração de SHR foi maior na 4^a semana de idade (0,74±0,09% versus 0,46±0,09% nos ratos WKY, p<0,05) e menor entre a 14^a e 30^a semana de idade (0,43±0,10% versus 0,78±0,12% em WKY, p<0,05). O número de células tronco cardíacas Sca-1⁺-CD45^{neg} e de células tronco mesenquimais cardíacas, contadas como CFU-Fs/200.000 células cultivadas, não foi diferente entre as duas linhagens de animais em qualquer das idades estudadas. O menor número de células tronco c-Kit⁺-CD45^{neg} no coração de SHRs observado na fase estabelecida da hipertensão arterial (14-30 semanas), com hipertrofia cardíaca vigente, sugere que a redução numérica possa ser uma consequência do processo hipertensivo e hipertrófico cardíaco. Dada a importância funcional das células c-Kit⁺-CD45^{neg} na homeostase do tecido cardíaco, a redução numérica destas células na fase hipertensiva sugere que as mesmas podem ter alguma implicação na patogênese da hipertrofia cardíaca associada à hipertensão arterial. Estudos adicionais fazem-se necessários para estabelecer um real papel destas células tronco no contexto da hipertensão arterial sistêmica e hipertrofia cardíaca.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate in the heart of spontaneously hypertensive rats (SHR) compared to normotensive rats (WKY) the number of cardiac stem cells c-Kit⁺-CD45^{neg} and Sca-1⁺-CD45^{neg}, by flow cytometry, and the number of cardiac mesenchymal stem cells through the Colony Forming Unit-fibroblasts (CFU-F) assay. Therefore, young (4 weeks old) and adult (14 to 30 weeks old) SHRs and WKY rats had their hearts removed after euthanasia for the extraction of stem cells via mechanical fragmentation, enzymatic digestion (collagenase type I or trypsin-EDTA) and differential filtration (at 40 μ m or 70 μ m). The resulting suspension of cardiac cells was then analyzed by flow cytometry, in order to quantify the number of cardiac stem cells c-Kit⁺-CD45^{neg} and Sca-1⁺-CD45^{neg}, or seeded at low density in culture plates, in order to quantify the number of CFU-Fs, which clonally originate from individual cardiac mesenchymal stem cells. The SHRs were hypertensive and exhibited cardiac hypertrophy after the 14th week of age. The number of c-Kit⁺-CD45^{neg} cardiac stem cells in the heart of SHRs was higher at 4 weeks of age ($0.74 \pm 0.09\%$ versus $0.46 \pm 0.09\%$ in WKY rats, $p < 0.05$) and lower between the 14th and 30th week of age ($0.43 \pm 0.10\%$ versus $0.78 \pm 0.12\%$ in WKY rats, $p < 0.05$). The number of Sca-1⁺-CD45^{neg} cardiac stem cells and the number of cardiac mesenchymal stem cells, counted as CFU-Fs / 200,000 plated cells were not different between the two strains of animals at any age studied. The lower number of c-Kit⁺-CD45^{neg} cardiac stem cells in the heart of SHRs in the established phase of hypertension (14-30 weeks), with ongoing cardiac hypertrophy, suggests that this numerical reduction may be a consequence of hypertension and cardiac hypertrophic process. Given the functional significance of c-Kit⁺-CD45^{neg} cells in the homeostasis of heart tissue, the reduced number of these cells in hypertensive phase suggests that they may have some implication in the pathogenesis of cardiac hypertrophy associated with hypertension. Additional studies are required in order to establish a real role of these stem cells in the context of hypertension and cardiac hypertrophy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Curva do débito urinário em relação ao aumento da pressão arterial sistêmica.	15
Figura 2 - Relação entre função vascular e pressão sanguínea sistêmica.....	17
Figura 3 - Classificação da geometria do ventrículo esquerdo.....	20
Figura 4 - Valores médios (\pm erro padrão) do peso corporal dos animais SHR e WKY nas diferentes idades estudadas.....	39
Figura 5 - Valores médios (\pm erro padrão) da pressão arterial sistólica (PAS) medida na artéria caudal dos animais SHR e WKY nas diferentes idades estudadas.....	40
Figura 6 - Valores médios (\pm erro padrão) da frequência cardíaca (FC) medida na artéria caudal dos animais SHR e WKY nas diferentes idades estudadas.....	41
Figura 7 - Valores médios (\pm erro padrão) do peso cardíaco absoluto (painel A) e da razão peso cardíaco (em mg) pelo peso corporal (em gramas) (peso cardíaco relativo) (painel B) dos animais SHR e WKY nas diferentes idades estudadas..	42
Figura 8 - Valores médios (\pm erro padrão) do percentual de células tronco cardíacas c-kit ⁺ -CD45 ^{neg} dos animais SHR e WKY em 4 semanas e em 14 – 30 semanas de idade.	43
Figura 9 - Valores médios (\pm erro padrão) do percentual de células tronco cardíacas Sca-1 ⁺ -CD45 ^{neg} dos animais SHR e WKY em 4 semanas e em 14 – 30 semanas de idade.	44
Figura 10– Painéis gráficos com dados de citometria de fluxo de um rato do grupo WKY-4 semanas.....	44
Figura 11 – Painéis gráficos com dados de citometria de fluxo de um rato do grupo SHR-4 semanas.....	45
Figura 12– Painéis gráficos com dados de citometria de fluxo de um rato do grupo WKY-14-30 semanas..	46
Figura 13 – Painéis gráficos com dados de citometria de fluxo de um rato do grupo SHR-14-30 semanas.	47
Figura 14 -Valores médios (\pm erro padrão) do número de células tronco mesenquimais cardíacas (cMSC), expressas como unidades formadoras de colônias similares a fibroblastos (CFU-F) por 200.000 células cultivadas dos corações dos animais SHR e WKY em 4 semanas e em 14 – 30 semanas de idade.	48

Figura 15– Visão macroscópica de placas de cultura correspondentes aos ensaios de CFU-F dos animais de 4 semanas (Painel A) e de 14-30 semanas de idade (Painel B)..... 49

Figura 16- Visão microscópica de dois poços de placa de cultura correspondente ao ensaio CFU-F de animais WKY (imagem A) e SHR (imagem B) de 16 semanas de idade, em aumento de 50x..... 50

Figura 17- Visão microscópica de dois poços de placa de cultura correspondente ao ensaio CFU-F de animais WKY (imagem A) e SHR (imagem B) de 16 semanas de idade, em aumento de 100x..... 51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HAS – Hipertensão arterial sistêmica

PA – Pressão arterial sistêmica

SNS – Sistema nervoso simpático

IL-17 – Interleucina-17

IFN- γ – Interferon-gama

TNF α – Fator de necrose tumoral-alfa

IC – Insuficiência cardíaca

NO – Óxido nítrico (*Nitric Oxide*)

SHR – Ratos espontaneamente hipertensos

HVE – Hipertrofia do ventrículo esquerdo

iPS – Célula tronco pluripotente induzida

Abcg2 – Transportador de cassete de ligação ao ATP, subfamília G

MSCs – Células tronco mesenquimais

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade

VCAM-1 – Molécula de adesão celular vascular-1

IGF – Fator de crescimento semelhante à insulina

VEGF – Fator de crescimento vascular endotelial

HGF – Fator de crescimento de hepatócito

bFGF – fator de crescimento fibroblástico básico

GM-CSF – fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

TGF β – fator de crescimento transformante beta

FGF-2 – fator de crescimento fibroblástico-2

FGF-7 – fator de crescimento fibroblástico-7

PDGF – fator de crescimento derivado de plaqueta

PIGF – fator de crescimento placentário

MCP-1 – proteína quimiotática de monócitos-1

cMSCs – células tronco mesenquimais cardíacas

WKY – Ratos Wistar-Kyoto

PAS – Pressão arterial sistólica

FC – Frequência cardíaca

DMEM – Meio Eagle Modificado por Dulbecco

CFU-F – Unidades formadoras de colônias similares a fibroblastos (*Colony forming unit – fibroblast*)

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA	14
1.2 RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS	18
1.3 HIPERTROFIA CARDÍACA DECORRENTE DA HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA	19
1.4 CÉLULAS TRONCO	21
1.5 CÉLULAS TRONCO CARDÍACAS C-KIT+-CD45NEG	23
1.6 CÉLULAS TRONCO CARDÍACAS SCA-1+-CD45NEG	24
1.7 CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS	25
1.7.1 Células tronco mesenquimais cardíacas.....	28
1.8 CÉLULAS TRONCO E HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA	30
2 JUSTIFICATIVA	32
3 OBJETIVOS.....	33
3.1 OBJETIVO GERAL	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4 METODOLOGIA.....	34
4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	34
4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS	34
4.3 ESTUDO HEMODINÂMICO	35
4.4 PROCESSAMENTO DO TECIDO CARDÍACO E QUANTIFICAÇÃO POR CITOMETRIA DE FLUXO	35
4.5 ISOLAMENTO DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS CARDÍACAS E ENSAIO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS SEMELHANTES FIBROBLASTOS	37
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
5 RESULTADOS	39

6 DISCUSSÃO.....	52
7 CONCLUSÃO.....	57
8 REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

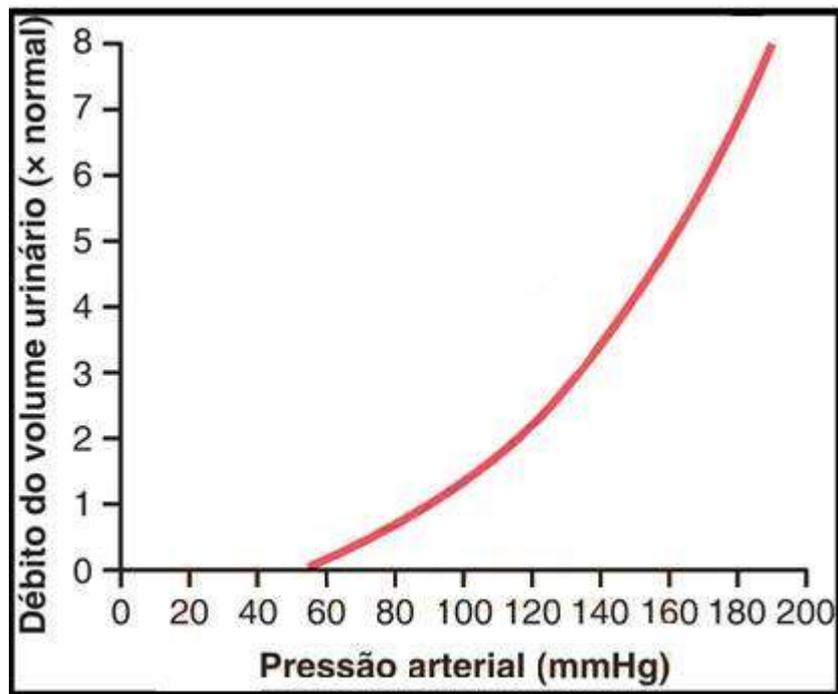
1.1 HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma síndrome clínica na qual os níveis de pressão arterial sistêmica (PA) encontram-se cronicamente elevados e sustentados para valores acima daqueles considerados normais (pressão sistólica ≥ 140 mmHg e pressão diastólica ≥ 90 mmHg). A HAS afeta mais de um bilhão de pessoas no mundo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2011) e sua prevalência autorreferida no Brasil é de 21,4%, apresentando a menor prevalência na região Norte do país (14,5%) e a maior na região Sudeste (23,3%) (ANDRADE et al, 2015).

A HAS pode ser classificada em hipertensão primária, ou essencial, a qual ocorre isolada de qualquer outra doença pré-existente, e em hipertensão secundária, a qual está relacionada com alterações patológicas antecedentes. A HAS é uma doença multifatorial, apresentando como fatores de risco: idade, gênero, alto consumo de álcool (MARTINEZ, LATORRE, 2006), etnia (SACKS et al, 2001), excesso de peso (BRANDÃO, 2004), sedentarismo (PESCATELLO, 2004), fatores socioeconômicos (CESARINO et al, 2008), genética (OLIVEIRA, 2008) e dieta hipersódica (SACKS et al, 2001).

O valor da PA é diretamente proporcional ao produto do débito cardíaco pela resistência periférica, e o seu aumento crônico e conseqüente surgimento da HAS ocorre à medida que os mecanismos regulatórios falham em manter os níveis pressóricos dentro de valores normais. A regulação a curto prazo da PA ocorre, principalmente, pelos barorreflexos e hormônios vasoativos (GUYTON et al, 1991). Já a longo prazo, a regulação do volume urinário promovida pelos rins é a que apresenta maior relevância (BOLÍVAR, 2013). Arthur Guyton e colaboradores foram os primeiros a discorrer sobre a importância que os rins apresentam no controle da PA, controlando tanto a diurese quanto a natriurese em resposta a variações pressóricas (GUYTON, 1991). Tal mecanismo tem seu funcionamento baseado em alterações no volume sanguíneo, mantendo níveis pressóricos regulados em um feedback conhecido como “quase infinito”. Na Figura 1 é possível observar a curva de diurese pressórica, na qual níveis de PA elevados resultam em diurese aumentada com diminuição conseqüente do volume sanguíneo e restauração a valores normais de pressão.

Figura 1 - Curva do débito urinário em relação ao aumento da pressão arterial sistêmica. O débito urinário desempenha um papel central no controle a longo prazo da PA.



Fonte: Guyton, 2011.

Ainda no que diz respeito à alteração da volemia sanguínea, o alto consumo de sódio é fator de grande relevância na discussão sobre HAS. A dieta rica em sal predispõe a aumentos pressóricos, conforme evidenciado em estudos epidemiológicos (BEEVERS, 2002; HOLLENBERG, 2006), através do aumento do volume sanguíneo ocasionado pela alta retenção de sódio (COFFMAN, 2011). O mecanismo mais eficiente em controlar a perda de sódio pela urina é o sistema renina-angiotensina-aldosterona, responsável por controlar a sua reabsorção tubular renal (TAKAHASHI, 2011). Além do sódio, a ingestão de potássio também tem sido descrita como importante fator na HAS. Baixo consumo de potássio ocasiona elevação da retenção de sódio pelo organismo, elevando a PA (KRISHNA, 1990); ao passo que o aumento de seu consumo, tem o efeito oposto (SMITH; KLOTMAN; SVETKEY, 1992).

Também na discussão sobre HAS, merece destaque o sistema nervoso autonômico, principalmente simpático. Diversos medicamentos anti-hipertensivos têm ação como antagonistas do sistema nervoso simpático (SNS) (BOLÍVAR, 2013). O SNS atua nos rins através do aumento da secreção de renina, aumento da reabsorção tubular de sódio e vasoconstrição (BOLÍVAR, 2013). O tônus vascular, regulado principalmente pelo SNS e por

hormônios, apresenta papel fundamental no controle pressórico (COFFMAN, 2011), através da elevação ou diminuição da resistência periférica, resultando em aumento ou decréscimo da PA, respectivamente. Dessa forma, hiperatividade simpática vascular crônica, bem como hiperativação a longo prazo do sistema renina-angiotensina têm sido implicados na patogênese da HAS (COFFMAN, 2011).

Em adição, estudos também demonstram que o sistema imune apresenta relevância na patogênese dos níveis pressóricos elevados. Em 2007, Guzik e colaboradores, através de estudos com ratos, sugeriram que a ausência de linfócitos T e B leva à resistência ao desenvolvimento da HAS (GUZIK et al, 2007). Infiltrado de células imunes na gordura adventícia e peri-adventicial, assim como ativação de células T que secretam citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-17 (IL-17), interferon-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF α), foram associados à HAS (GUZIK et al, 2007; MADHUR et al, 2010). A ativação do sistema imune causada por *stress* oxidativo vascular, presente na doença, leva à ativação de células T, que se infiltram na camada adventícia vascular e liberam citocinas, as quais induzem depósito de colágeno, ocasionando rigidez aórtica, disfunção e inflamação renal, e hipertensão (WU et al, 2016).

Ainda no que diz respeito aos fatores associados com a elevação crônica da PA, relevância fundamental se atribui ao fator genético, evidenciado em estudos epidemiológicos relacionados à HAS (COFFMAN, 2011). Porém os genes e alterações fenotípicas relacionadas ainda não estão bem descritos.

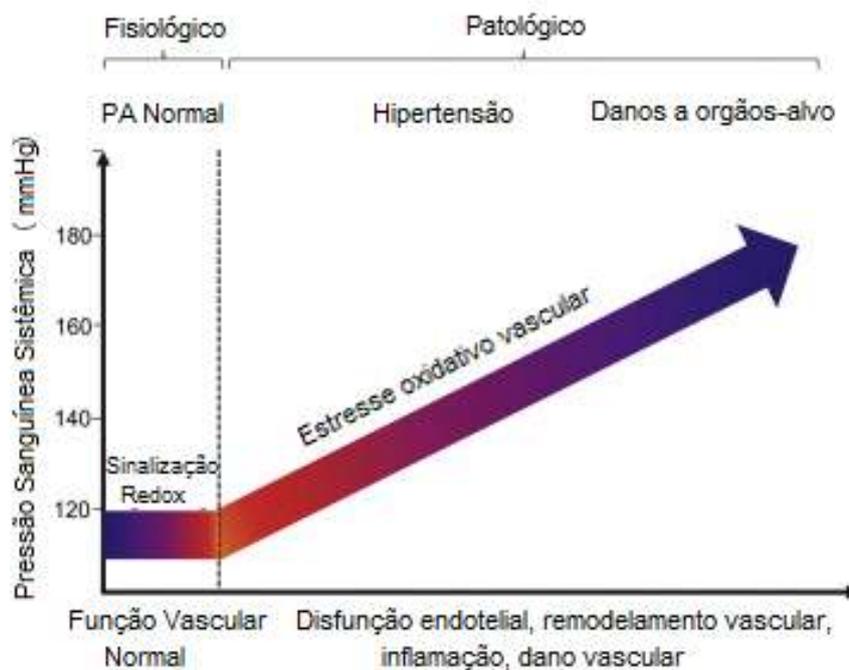
Em relação as mudanças estruturais ocorridas com a elevação dos níveis pressóricos a longo prazo, observam-se alterações tanto cardíacas quanto vasculares, devido à alta pressão sanguínea a qual o organismo é submetido (PATRASCU, 2013).

Como consequência cardíaca, observa-se hipertrofia patológica do ventrículo esquerdo, a qual engloba cardiomiócitos e inderstício, com aumento de fibrose intersticial (VERDECCHIA et al, 1996), levando cronicamente à insuficiência cardíaca (IC).

No que diz respeito às alterações vasculares, ocorrem mudanças estruturais de remodelamento, caracterizadas por alteração no diâmetro do lúmen dos vasos (HEAGERTY et al, 1998), e mudanças funcionais, as quais resultam em disfunção endotelial (CESENA; CHAGAS, 2001), ocasionando o surgimento de um ambiente vascular pró-inflamatório, pró-trombótico, e de reduzida vasodilatação (ENDERMANN; SCHIFFRIN, 2004). Na HAS ocorre

déficit na capacidade vasodilatadora dependente do endotélio de vasos coronários e epicárdicos submetidos à acetilcolina ou aumento do fluxo (CESENA; CHAGAS, 2001), do mesmo modo que são encontradas alterações na secreção de moléculas vasoativas, como o óxido nítrico (NO), o qual tem sua síntese e biodisponibilidade prejudicadas em indivíduos hipertensos (BRUNNER et al, 2005). Na HAS, observa-se ainda aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (MONTEZANO et al, 2015), as quais ativam o sistema imune, ocasionando resposta inflamatória, dano vascular e elevação da PA (Figura 2).

Figura 2 - Relação entre função vascular e pressão sanguínea sistêmica. A PA aumenta concomitantemente ao *stress* oxidativo vascular, assim como tem-se aumento no agravamento da disfunção endotelial, remodelamento vascular, inflamação e danos aos vasos sanguíneos e aos órgãos-alvo.



Fonte: Adaptado de Montezano et al, 2015.

Elevados valores crônicos de PA, portanto, resultam em danos aos vasos sanguíneos, e aumento do risco de desenvolvimento e progressão da aterosclerose (OLAFIRANYE et al, 2011). Dessa forma, tem-se elevação nas taxas de infarto agudo do miocárdio, IC, acidente vascular encefálico e doenças renais entre pacientes hipertensos (COFFMAN, 2011).

O tratamento da HAS envolve medidas não medicamentosas, as quais englobam hábitos de vida saudáveis, e medidas medicamentosas (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010). Alguns dos fármacos utilizados para o tratamento medicamentoso são: diuréticos (PSATY et al, 1977), inibidores da enzima conversora da angiotensina (NEAL, MACMAHON, CHAPMAN, 2000), bloqueadores do receptor AT1 da angiotensina (DAHLOF et al, 2002), betabloqueadores (PSATY et al, 1977), e inibidores dos canais de cálcio (NEAL, MACMAHON, CHAPMAN, 2000). Porém, devido à limitação do conhecimento sobre a patogênese da HAS e do reduzido número de terapias disponíveis, os resultados clínicos nos indivíduos hipertensos nem sempre tornam-se satisfatórios (COFFMAN, 2011). Tal fato justifica a necessidade tanto de pesquisas envolvendo a busca da elucidação dos mecanismos relacionados à HAS, quanto o aperfeiçoamento e descoberta de novas metodologias para o tratamento de pacientes hipertensos.

1.2 RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS

Modelos animais são ferramentas fundamentais para o estudo da fisiopatogenia e do tratamento de doenças (LEONG, NG, JAARIN, 2015). Devido às limitações na elucidação dos mecanismos envolvidos na HAS humana, tais ferramentas são de extrema importância para a pesquisa envolvendo a doença. Nesse contexto, foram desenvolvidos diversos tipos de modelos experimentais, sendo eles: renovascular, dietético, endócrino, neurogênico, psicogênico, genético, entre outros (BADYAL, LATA, DADHICH, 2003).

Dentre todos os tipos citados e englobados na categoria de hipertensão genética, os mais estudados são os ratos espontaneamente hipertensos (“spontaneously hypertensive rats” - SHR) (FRAZAN JR.; DIAS DA SILVA; SALGADO, 2001). Tais animais foram desenvolvidos em 1963 (OKAMOTO; AOKI, 1963) por meio de endocruzamentos seletivos de ratos Wistar que apresentavam espontaneamente valores pressóricos elevados. Os SHRs iniciam a elevação da PA com 5 semanas de idade; entre a 7ª e 15ª semanas de vida os animais já são considerados hipertensos; e atingem um platô de hipertensão ente 20ª e 28ª semanas de vida (YAMORI, 1984). Posteriormente a este período, conjuntamente a um aumento da resistência periférica total e débito cardíaco normal ou diminuído (POTTS; MCKEOWN; SHOUKAS, 1998), a hipertensão se estabiliza até aproximadamente 1 a 1,5 anos de idade, quando os SHRs começam

a desenvolver um quadro de insuficiência cardíaca congestiva, a qual é associada com uma elevada taxa de mortalidade (YAMORI, 1984).

Embora algumas ressalvas possam ser feitas, devido à natureza multifatorial da hipertensão essencial, os SHRs são utilizados na pesquisa devido às similaridades com a doença humana (TRIPPODO, FROHLICH, 1981). A rarefação microvascular, característica da HAS, é observada tanto nesses animais quanto nos humanos (LE NOBLE et al, 1998), além do desenvolvimento da hipertensão nas fases precoces de vida, com aumento lento e progressivo da resistência periférica total, a qual demanda alterações vasculares e cardíacas (TRIPPODO, FROHLICH, 1981). As complicações relacionadas à HAS (lesões renais, cardíacas e neurológicas), assim como susceptibilidade a mecanismos capazes de agravar a hipertensão, também são observadas tanto nos SHRs quanto em humanos (TRIPPODO, FROHLICH, 1981).

1.3 HIPERTROFIA CARDÍACA DECORRENTE DA HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA

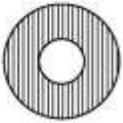
A HAS é responsável por mais da metade de todas as mortes por eventos cardiovasculares (LAWES, VANDER HOORN, RODGERS, 2008), tornando o coração um órgão-alvo de grande interesse para o estudo da doença. As alterações cardíacas observadas em indivíduos hipertensos englobam hipertrofia do ventrículo esquerdo (HVE) e disfunção sistólica e diastólica, os quais estão relacionados como relevantes fatores de risco para a IC e arritmias (GEORGIPOULOU et al, 2010).

A HVE observada na HAS é um mecanismo adaptativo do coração à sobrecarga de PA. O tipo de hipertrofia clássica observada em indivíduos hipertensos é a concêntrica (Figura 3D), caracterizada por aumento da espessura relativa da parede ventricular e da massa cardíaca (GROSSMAN, JONES, MCLAURIN, 1984). Porém, têm sido demonstrado que devido à pós-carga aumentada na HAS, o ventrículo esquerdo pode sofrer dilatação, característica da hipertrofia excêntrica (Figura 3C), a qual engloba aumento da massa cardíaca conjuntamente a uma espessura ventricular normal (DRAZNER, 2011; SANTOS, SHAH, 2014). Os pacientes hipertensos podem ainda apresentar o terceiro tipo de alteração geométrica ventricular,

denominada remodelamento excêntrico (Figura 3B), no qual há aumento da espessura da parede do ventrículo esquerdo, embora não ocorra aumento da massa cardíaca (DRAZNER, 2011).

De modo geral, o espessamento da parede ventricular ocorre mais comumente em resposta à sobrecarga pressórica, e a dilatação da câmara ocorre mais comumente em resposta à sobrecarga de volume (FRHOLICH et al, 1993). Embora a duração e severidade da HAS, as comorbidades e o fator genético tenham sido descritos também como possíveis determinantes envolvidos no estabelecimento dos diferentes tipos de padrão geométrico ventricular (DEVEREUX, 1994), os mecanismos detalhados da fisiopatogenia de cada um deles ainda não estão completamente elucidados (DRAZNER, 2011).

Figura 3 - Classificação da geometria do ventrículo esquerdo. Baseado na massa ventricular e na espessura relativa da parede, é possível classificar a geometria do ventrículo esquerdo em normal (A), remodelamento concêntrico (B), hipertrofia excêntrica (C) e hipertrofia concêntrica (D).

		Espessura Relativa da Parede	
		Normal	Aumentada
Massa do Ventrículo Esquerdo	Normal	A 	B 
	Aumentada	C 	D 

Fonte: Adaptado de DRAZNER, 2011.

A progressão da HAS à HVE é um importante fator para o desenvolvimento de IC (DRAZNER, 2011), a qual pode ser classificada em diastólica, quando a fração de ejeção encontra-se dentro da normalidade, e em sistólica, quando a fração de ejeção encontra-se diminuída (HOGG, MCCMURRAY, 2008). As prevalências entre os dois tipos de IC é bastante similar (OWAN et al, 2006).

As alterações patológicas ocorridas em pacientes com HVE englobam um aumento no tamanho dos cardiomiócitos; alterações da matriz extracelular, na qual é observada acúmulo de fibrose; anormalidades na vasculatura coronária, entre elas hipertrofia medial, fibrose perivascular (SCHWARTZKOPFF et al, 1993) e rarefação microvascular (MATOS-SOUZA, FRANCHINI, NADRUZ JR, 2008); modificações no transporte do cálcio intracelular; na capacidade de contração e relaxamento do miocárdio; e no metabolismo energético (OPIE et al, 2006).

Os mecanismos envolvidos na progressão da hipertrofia cardíaca para IC ainda não estão completamente descritos, porém algumas sugestões têm sido propostas. Na HVE, devido às anormalidades nos vasos coronários, há diminuição no suprimento de oxigênio e nutrientes para os cardiomiócitos, o que poderia resultar em disfunção do miocárdio (VERDECCHIA et al, 2007). Além disso, em decorrência do acúmulo de fibrose, pode ser produzida uma oposição mecânica ao funcionamento dos cardiomiócitos, comprometendo seu desempenho (OPIE et al, 2006).

Em contraste com a hipertrofia patológica observada na HAS, a hipertrofia fisiológica cardíaca é caracterizada por um aumento proporcional da câmara cardíaca e da espessura da parede ventricular (MCMULLEN, JENNINGS, 2007), além de não estar associada ao desenvolvimento de IC (PLUIM et al, 2000). De fato, trabalhos demonstram que na hipertrofia fisiológica do exercício, há ainda aumento do número de células troncos cardíacas, as quais poderiam contribuir para a formação *de novo* de células no tecido (LEITE et al, 2015). Considerando que na hipertrofia patológica são observados efeitos deletérios devido ao aumento de fibrose em contraste com diminuição por morte celular de cardiomiócitos, o estudo de células tronco cardíacas em associação com a HAS, auxiliaria na busca do conhecimento da capacidade regenerativa do coração em indivíduos hipertensos.

1.4 CÉLULAS TRONCO

Durante muitos anos acreditou-se que o coração seria um órgão terminalmente diferenciado. Contudo, esta afirmação vem sendo contestada pela observação inequívoca, ainda que em baixa frequência, da formação *de novo* de miócitos, a partir de células tronco residentes,

e da proliferação de pequenos miócitos cardíacos (LAFLAMME, MURRY, 2011). Tal fato gera grande expectativa e interesse em estudos que visam avaliar a capacidade do órgão em originar novas células frente à lesões, sendo exemplo o estudos com células tronco em doenças cardíacas.

Células tronco são células indiferenciadas, que apresentam como características a proliferação, a auto-renovação e ainda a capacidade de gerar células progenitoras que, por sua vez, darão origem a células diferenciadas (BLAU, BRAZELTON, WEIMANN, 2001). As células tronco são classificadas quanto à sua capacidade de diferenciação em: totipotentes, pluripotentes, multipotentes e unipotentes. As totipotentes são as células encontradas no zigoto e blastômeros (KELLY, 1977), e podem se diferenciar em células de qualquer tecido do organismo. As pluripotentes apresentam capacidade de diferenciação em todas as células do organismo, com exceção dos anexos embrionários, enquanto as multipotentes apresentam diferenciação mais limitada, dando origem apenas a células do tecido ao qual se originaram, e as unipotentes originando somente um único tipo celular (DE LOS ANGELES et al, 2015). Adicionalmente, uma recente célula tronco descrita pode ser citada, a célula tronco pluripotente induzida (iPS), a qual surgiu a partir da reprogramação genética de fibroblastos humanos através da introdução de quatro genes (Oct3/4, Sox2, Klf4 e c-Myc,) no DNA celular, tornando possível reprogramar células somáticas, conferindo-lhes características de células tronco pluripotentes (TAKAHASHI et al, 2007).

No que diz respeito às células multipotentes, também conhecidas como células tronco adultas ou somáticas, encontram-se os mais variados subtipos, cada qual localizado em diferentes órgãos, apresentando capacidades diversas de diferenciação tecidual e contribuindo para a homeostase no tecido ao qual estão inseridos (BLAU, BRAZELTON, WEIMANN, 2001). Incluídas nesse grupo estão as células tronco cardíacas, descritas inicialmente por Beltrami e colaboradores, no coração de camundongos e ratos (BELTRAMI et al., 2003). Tais células têm sido objeto de estudo em muitos trabalhos envolvendo a fisiologia e fisiopatologia cardiovascular (FUENTES, KEARNS-JONKER, 2013) e podem ser classificadas em diferentes subtipos, de acordo com a expressão fenotípica de marcadores específicos, dentre os quais encontram-se: c-Kit (*Stem cell factor receptor*), Sca-1 (*Stem cells antigen-1*), IsL-1 (*Insulin gene enhancer protein*), etc; ou ainda classificadas de acordo com suas propriedades de exclusão do corante nuclear Hoechst 33342 (MARTIN et al., 2004) ou na capacidade de gerar a partir de cultura de explantes cardíacos unidades multicelulares suspensas, chamadas cardiosferas (MESSINA et al., 2004; LEITE et al, 2015).

Os diversos subtipos de células tronco cardíacas apresentam características específicas, como as células IsL-1, as quais são um tipo de progenitora restrita ao coração embrionário (LERI, 2009); as células Side Population, caracterizadas como um subtipo de progenitora capaz de excluir compostos tóxicos e corantes (MARTIN et al., 2004); as células derivadas do epicárdio, progenitoras que expressam o fator de transcrição T-box, Tbx18, envolvidas na geração de fibroblastos cardíacos e de células de músculo liso coronariano (CAI et al, 2008); e as células positivas para o antígeno W8B2, isoladas a partir de apêndices atriais (ZHANG et al, 2015).

Também já foram descritas no coração as células tronco c-Kit⁺-CD45^{neg}, as células tronco Sca-1⁺-CD45^{neg} e as células tronco mesenquimais cardíacas. Tais células estão dentre as mais estudadas na atualidade, e serão abordadas em detalhes nas subseções seguintes.

1.5 CÉLULAS TRONCO CARDÍACAS C-KIT⁺-CD45NEG

As c-Kit⁺-CD45^{neg} são células que residem no tecido cardíaco na proporção de uma c-Kit⁺-CD45^{neg} para cada 30000 miócitos e não miócitos (LERI, KAJSTURA, ANVERSA, 2011). Tais células tronco encontram-se localizadas em nichos no coração, os quais controlam a renovação fisiológica cardíaca e o crescimento, migração e estimulação das células tronco que deixam estes locais para assumir novas funções no tecido (HOSODA et al, 2009). *In vitro* são capazes da diferenciação em miócitos, células de músculo liso vascular e células endoteliais, enquanto que *in vivo*, embora existam controvérsias em relação ao nível de capacidade de diferenciação (ZARUBA et al, 2010; VAN BERLO et al, 2014), originam novos cardiomiócitos, os quais apresentam propriedades mecânicas e elétricas de células funcionais competentes (LERI, KAJSTURA, ANVERSA, 2011).

As c-Kit⁺-CD45^{neg} têm sido utilizadas nos mais variados trabalhos relacionados a doenças cardiovasculares. Em modelo de infarto em camundongos, foi observado que células c-Kit⁺-CD45^{neg} transplantadas ocasionavam melhora na função cardíaca, porém apresentavam reduzida retenção no coração dos animais receptores (HONG et al, 2014). Este fato sugere que fatores parácrinos poderiam estar relacionados aos benefícios ocasionados com o transplante, de forma mais eficaz do que a diferenciação em novos cardiomiócitos (HONG et

al, 2014). Resultados semelhantes, nos quais observou-se melhora funcional do coração, também foram descritos com transplante das c-Kit⁺-CD45^{neg} em modelo de infarto em suínos (BOLLI et al, 2013) e em cardiomiopatia isquêmica em humanos (BOLLI et al, 2011), ambos demonstrando aumento da fração de ejeção do ventrículo esquerdo.

Em relação à melhora da função cardíaca, obtida com o uso das c-Kit⁺-CD45^{neg}, a hipótese de que fatores parácrinos apresentariam função essencial pode ser reafirmada em vista da demonstração, por método altamente sensível, de que células transplantadas são perdidas muito rapidamente após o procedimento de transplante, com apenas 25% das c-Kit⁺-CD45^{neg} presentes localmente após 24 horas (HONG et al, 2013). Além dos fatores atrativos previamente descritos envolvendo o uso de tais células, van Berlo e colaboradores demonstraram, recentemente, que a população endógena das c-Kit⁺CD45^{neg} apresenta amplo potencial de diferenciação *in vivo* em células endoteliais cardíacas (VAN BERLO, 2014), contribuindo para o interesse e expectativa na pesquisa de tais células tronco, as quais têm sido utilizadas em diversos estudos pré-clínicos (KEITH, BOLLI, 2015) e em um estudo clínico (Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO)) (BOLLI et al, 2011).

1.6 CÉLULAS TRONCO CARDÍACAS SCA-1⁺-CD45^{NEG}

As células tronco cardíacas Sca-1⁺-CD45^{neg}, primeiramente descritas por Oh e colaboradores (OH et al, 2003), representam 2% das células cardíacas (MATSUURA et al, 2004). São capazes de induzir cardiomiogênese *in vitro* e *in vivo* (OH et al, 2013), apresentam capacidade de diferenciação em células de músculo liso, células endoteliais, adipócitos e osteoblastos (LERI, KAJSTURA, ANVERSA, 2011), e expressam reguladores transcricionais de linhagem cardíaca, como GATA-4, Mef2c, e Tef1 (OH et al, 2013).

Matsuura e colaboradores observaram que, quando tratadas em cultura com ocitocina, as células Sca-1⁺-CD45^{neg} do coração de camundongos passam a expressar genes de fatores transcricionais cardíacos e de proteínas contráteis, e ainda apresentam estrutura sarcomérica e batimento espontâneo celular (MATSUURA et al, 2004). Em modelo de infarto em camundongos, tais células foram capazes de discreta diferenciação em cardiomiócitos e secreção de citocinas, entre elas a molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1) solúvel, a

qual auxilia na prevenção da morte celular, promove a angiogênese e a migração e sobrevivência das células tronco no coração (MATSUURA et al, 2009). Além disso, o transplante das Sca-1+-CD45neg ocasiona melhora da função cardíaca, possivelmente atribuída aos fatores parácrinos secretados, os quais contribuem para formação de novos vasos sanguíneos e para o aumento do desempenho funcional cardíaco (WANG et al, 2006).

Experimentos também foram realizados com células Sca-1+-CD45neg humanas, as quais apresentaram, da mesma maneira que demonstrado em modelos experimentais animais, fatores transcricionais cardíacos (GATA-4, Mef2c, Isl-1, e Nkx-2.5) e se diferenciaram em cardiomiócitos (SMITS et al, 2009).

Diversos outros subtipos de células tronco cardíacas já foram também descritos, e têm sido estudados e caracterizados ao longo dos anos recentes (LEITE et al, 2015). Exemplos são as células IsL-1, as quais são restritas ao coração embrionário (LERI, 2009); as células Side Population, caracterizadas como um subtipo de progenitora capaz de excluir compostos tóxicos e corantes (MARTIN et al., 2004); as células derivadas do epicárdio, progenitoras que expressam o fator de transcrição T-box, Tbx18, e estão envolvidas na geração de fibroblastos cardíacos e de células de músculo liso coronariano (CAI et al, 2008); e as células positivas para o antígeno W8B2, isoladas a partir de apêndices atriais (ZHANG et al, 2015).

Além das células acima citadas, as células tronco mesenquimais cardíacas também são consideradas uma população de células tronco residentes do coração e serão discutidas em detalhes na subseção seguinte. Vários desses subtipos de progenitoras descritos tem sido testadas terapeuticamente em estudos pré-clínicos e clínicos para o tratamento de doenças cardiovasculares (FUENTES, KEARNS-JONKER, 2013; LEITE et al, 2015), demonstrando o amplo potencial de seu uso.

1.7 CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS

As células tronco mesenquimais (MSCs) são células localizadas de forma acoplada à parede de vasos sanguíneos (MEIRELLES, CAPLAN, NARDI, 2008), e estão dentre as mais estudadas nos últimos anos, seja em trabalhos envolvendo doenças cardiovasculares ou ainda outros tipos de enfermidades. Para que seja definida como MSC, de acordo com a *International*

Society for Cellular Therapy, tais células devem ser aderentes ao plástico sob condições de cultura padrão; devem ser capazes de se diferenciar em osteoblastos, condrócitos e adipócitos; e ainda devem apresentar positividade para alguns marcadores de superfície específicos (CD105, CD73 e CD90), e negatividade para outros (CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 ou CD19, e HLA-DR) (KEATING, 2006; HORWITZ et al, 2005; DOMINICI et al, 2006).

As MSCs apresentam ampla variedade de características que tornam seu estudo relevante. Entre tais características estão as relacionados ao sistema imune. As MSCs expressam baixos níveis de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) Classe I e não expressam moléculas de MHC Classe II, bem como moléculas co-estimulatórias (TSE et al, 2003). Diversos trabalhos tem demonstrado que as MSCs possuem propriedades imunomodulatórias, inicialmente observadas com linfócitos T, os quais tiveram sua ativação e proliferação suprimidos pelas células tronco mesenquimais (DI NICOLA et al, 2002). Além dos linfócitos T, as MSCs ainda podem interagir com linfócitos B, células NK e células dendríticas (SHARMA et al, 2014).

Tem sido demonstrado, nos últimos anos, que a interação das MSCs com o sistema imune pode gerar efeitos pró-inflamatórios ou imunossupressores (KEATING, 2012), de acordo com a ausência ou presença de um ambiente inflamatório, respectivamente (BERNARDO, FIBBE, 2013). Embora os mecanismos precisos envolvidos entre tais células tronco e o sistema imune ainda necessitem de melhor caracterização, o contato célula-célula e a liberação de mediadores, como óxido nítrico, prostaglandina E2, indolamina 2,3-dioxigenase, interleucina-6, interleucina-10 e antígeno leucocitário humano, têm sido descritos como principais fatores nessa interação (SHARMA et al, 2014).

Diante de tal capacidade de imunomodulação, além da ampla variedade de efeitos benéficos observados com o uso das MSCs, elas tem sido utilizadas em diversos ensaios pré-clínicos e clínicos. As MSCs são capazes de secretar fatores bioativos, responsáveis pelos seus efeitos parácrinos (MEIRELLES et al, 2009), além de migrarem para locais de lesão tecidual. Nagaya e colaboradores demonstraram que, quando MSCs de medula óssea eram injetadas por via endovenosa após a indução de infarto agudo do miocárdio por ligadura da artéria coronária em ratos, as MSCs não só eram observadas na região lesada do coração, como também foi possível constatar diminuição da área infartada, melhora da função cardíaca, miogênese e angiogênese (NAGAYA et al, 2004). Chen e colaboradores demonstraram que MSCs de medula óssea, obtidas de ratos Wistar, eram capazes de migrar, após administração pela veia

caudal, até o local de lesão induzida na medula espinhal de ratos Wistar (CHEN et al, 2015), reafirmando o potencial terapêutico de tais células.

A propriedade de migração das MSCs pode ser atribuída à presença de receptores de fator de crescimento, de quimiocinas e de matriz extracelular na superfície dessas células (MEIRELLES et al, 2009), contribuindo para seu deslocamento. Além disso, aderência célula-célula também pode estar envolvida nesse processo. Foi demonstrado que a P-selectina e a VCAM -1, nas células endoteliais, são ligantes para receptores nas MSCs, fazendo com que a célula realize seu deslocamento sobre o endotélio (RÜSTER et al, 2006).

Os benefícios ocasionados pelo tratamento com MSCs tem sido creditados, em sua maior parte, aos seus efeitos parácrinos. Yao e colaboradores demonstraram que MSCs transplantadas em área de infarto induzido em camundongos, secretam diversos fatores, os quais atuando no tecido, auxiliam na melhora da função cardíaca observada com o transplante das células tronco (YAO et al, 2015). Entre os fatores bioativos secretados, se encontram moléculas que auxiliam na redução de apoptose, como as observadas por Togel e colaboradores, que constaram, após decréscimo de apoptose com o uso de MSCs em modelo animal de doença renal aguda, a presença de fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), e fator de crescimento de hepatócito (HGF), os quais estão relacionados com a sobrevivência e proliferação de células endoteliais (TOGEL et al, 2007). Além dos fatores citados, outras moléculas também já foram descritas como anti-apoptóticas secretadas pelas MSCs, como o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e o fator de crescimento transformante beta (TGF- β) (REHMAN et al, 2004).

As moléculas secretadas pelas MSCs ainda apresentam propriedades anti-fibróticas, embora os mecanismos moleculares envolvidos não estejam completamente elucidados (MEIRELLES et al, 2009). Li e colaboradores demonstraram que em modelo animal de insuficiência cardíaca, a injeção de MSCs foi capaz de atenuar a fibrose, levando à uma diminuição da expressão de colágeno I e III e de metaloproteinase de matriz 2 e 9 (LI et al, 2008). Ainda no mesmo estudo, foi observada nas MSCs em cultura a expressão de HGF, fator também anti-fibrótico, indicando a possível ação parácrina dessa molécula nos resultados relatados.

As MSCs também apresentam papel relevante relacionado à angiogênese. Foi demonstrado que moléculas bioativas secretadas pelas MSCs exercem efeito pró-angiogênico, sendo algumas delas o fator de crescimento fibroblástico-2 (FGF-2), fator de crescimento fibroblástico-7 (FGF-7), fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), fator de crescimento placentário (PIGF), TGF- β (KINNAIRD et al, 2004a), VEGF e proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) (KINNAIRD et al, 2004b). Rossini e colaboradores observaram angiogênese em animais tratados com MSCs, após modelo de infarto agudo do miocárdio, e ainda demonstraram que os efeitos parácrinos seriam os preponderantes em tal achado, visto que a taxa de diferenciação das MSCs relacionada aos novos vasos sanguíneos foi muito reduzida (ROSSINI et al, 2011).

Todos os fatores acima descritos tornam as MSCs bastante atrativas para o tratamento de diversas enfermidades. O estudo de tais células torna-se ainda mais relevante devido às MSCs terem sido já descritas em praticamente todos os tecidos e órgãos (MEIRELLES, CHAGASTELLES, NARDI, 2006). Apesar da localização entre os diversos órgãos, as diferentes MSCs apresentam características semelhantes entre si, embora alguma distinção possa ser feita em relação à expressão de genes e proteínas (PELEKANOS et al, 2011) e à capacidade de isolamento bem sucedido, proliferação, senescência e diferenciação, de acordo com o local de origem (KERN et al, 2006), indicando possíveis propriedades tecido-específicas.

1.7.1 Células tronco mesenquimais cardíacas

No que diz respeito ao coração, as células tronco mesenquimais cardíacas (cMSCs) foram primeiramente estudadas por Hoogduijn e colaboradores, os quais isolaram cMSCs humanas, demonstraram sua capacidade de diferenciação osteogênica e adipogênica e adicionalmente observaram a propriedade das cMSCs em inibir a proliferação de células mononucleares de sangue periférico (HOOGDUIJN et al, 2007). Posteriormente, as cMSCs foram também estudadas por Chong e colaboradores, os quais constataram a presença de tais células no coração adulto e em desenvolvimento de camundongos (CHONG et al, 2011). Nesse trabalho foi observado o tempo de crescimento prolongado *in vitro* das células progenitoras, e também sugerido sua provável localização perivascular. Os resultados encontrados pelos pesquisadores sugerem que as cMSCs se originariam como um componente organizado do leito

vascular coronário que persiste através da vida fetal e adulta (CHONG et al, 2011), fato que poderia explicar as diferenças encontradas entre as diversas MSC tecido-específicas, dada a origem singular de cada uma delas.

Quando comparadas às MSCs de medula óssea, as cMSCs apresentam algumas características próprias. Embora os dois subtipos de células tronco apresentem perfis imunofenotípicos bastante similares, as cMSCs demonstraram ser menos competentes na diferenciação adipogênica e osteogênica, porém mais eficientes na expressão de marcadores da linhagem cardiovascular (ROSSINI et al, 2011). As cMSCs foram capazes ainda de causar melhora superior na função cardíaca após modelo de infarto do miocárdio em ratos, fato que pode ser explicado devido à permanência de tais células por tempo prolongado no tecido cardíaco, migração para a área lesada, promoção da angiogênese e diferenciação em células adultas semelhantes a cardiomiócitos de forma mais eficiente do que as MSCs de medula óssea (ROSSINI et al, 2011).

Alguns trabalhos sugerem ainda a participação das cMSCs endógenas no processo de cicatrização após infarto. Carlson e colaboradores demonstraram que tais células responderiam à lesão cardíaca através da sua proliferação e diferenciação em fibroblastos e miofibroblastos (CARLSON et al, 2011). Essa contribuição para a cicatrização é de grande relevância, visto que após a ocorrência do infarto e consequente lesão tecidual, a formação de uma cicatriz efetiva auxilia na diminuição dos efeitos deletérios ocasionados pelo dano cardíaco.

Ainda no que diz respeito à participação dessas progenitoras no processo de cicatrização, Cieslik e colaboradores observaram formação defeituosa de miofibroblastos a partir de cMSCs isoladas de camundongos velhos (CIESLIK, TRIAL, ENTMAN, 2011), indicando que o envelhecimento poderia causar alterações às células. Além da formação cicatricial defeituosa, foi também demonstrado que, quando comparados aos animais mais jovens, as células dos camundongos velhos apresentaram redução na expressão de Nanog, molécula a qual acredita-se estar envolvida na regulação da expressão de genes críticos para a renovação e diferenciação de células tronco (CIESLIK, TRIAL, ENTMAN, 2011).

Recentemente, foi também demonstrado que cMSCs originadas de feto, quando injetadas por via intravenosa, são capazes de ocasionar melhora da função cardíaca após indução de infarto em ratos, a qual poderia ser explicada pela diferenciação das cMSCs em células da linhagem cardiovascular, assim como pela secreção de moléculas bioativas, VEGF,

HGF, IGF-1 e b-FGF (GARIKIPATI et al, 2014). Da mesma forma, cMSCs injetadas no coração de camundongos chagásicos crônicos, geraram efeito protetor, ocasionado pela redução das células inflamatórias nos corações dos animais, bem como redução na expressão de TNF- α e aumento da citocina TGF- β (SILVA et al, 2014).

Em razão das propriedades benéficas observadas nos estudos sobre as cMSCs, tais células tornam-se atrativas para as pesquisas envolvendo o sistema cardiovascular. Em vista de suas propriedades tecido-específicas, o estudo aprofundado dos mecanismos que as envolvem, e seu uso direcionado para as enfermidades relacionadas ao coração, poderiam representar nova fonte de conhecimento para a obtenção da melhora na regeneração tecidual após a ocorrência de lesão cardíaca.

1.8 CÉLULAS TRONCO E HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA

A relação entre células tronco e HAS foi primeiramente discutida por Hill e colaboradores (HILL et al, 2003). Nesse trabalho, células progenitoras endoteliais, um subtipo de célula tronco originada principalmente da medula óssea, foram estudadas em associação com fatores de risco cardiovasculares. Foi possível demonstrar que fatores de risco, como a HAS, influenciam o número de células progenitoras endoteliais de sangue periférico, as quais apresentaram-se em quantidade reduzida, além de influenciar na taxa de senescência *in vitro*, maior nos indivíduos com alto risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (HILL et al, 2003).

Nos últimos anos, novos estudos têm sido realizados com o objetivo de buscar a melhor compreensão da influência de células tronco na HAS. Em modelo de hipertensão renovascular, as MSCs de medula óssea transplantadas foram capazes de prevenir o progressivo aumento da PA, causar melhora da morfologia renal e rarefação microvascular, reduzir fibrose, proteinúria e citocinas inflamatórias, entre outros efeitos benéficos (OLIVEIRA-SALES et al, 2013). Além disso, foi demonstrado que o transplante de células tronco derivadas de tecido adiposo é capaz de ocasionar melhora na rigidez do ventrículo direito de ratos SHR, assim como redução dos valores pressóricos nestes animais (RUBIANO et al, 2015).

Trabalhos de nosso laboratório também avaliaram a relação entre células tronco e HAS. Dados prévios indicam que MSCs de medula óssea apresentam déficit funcional em ratos SHR quando comparadas às células de ratos normotensos Wistar-Kyoto (WKY) (OLIVEIRA, 2010). As MSCs de medula óssea de SHR apresentaram-se defeituosas nos ensaios de proliferação celular e de expansão celular em cultura, até a senescência e diferenciação osteogênica e adipogênica (OLIVEIRA, 2010). Esse resultado permite sugerir que tais deficiências funcionais poderiam também se estender à secreção de moléculas bioativas e ao consequente efeito pró-angiogênico dessas células, tornando-se, pelo menos em parte, responsável pela rarefação microvascular. Além disso, os dados encontrados neste trabalho, os quais demonstram as deficiências funcionais das MSCs de medula óssea, identificadas nos animais SHRs, poderiam refletir em uma modulação endotelial deficiente e, conseqüentemente, em uma disfunção endotelial, a qual é característica importante na HAS (OLIVEIRA, 2010).

O estudo da associação entre células tronco e HAS torna-se relevante, visto que os resultados observados com o transplante de tais células mostram-se benéficos para os modelos de HAS utilizados. Além disso, a demonstração de que células progenitoras endoteliais encontram-se em número reduzido em hipertensos (HILL et al, 2003) e que MSCs de medula óssea exibem defeitos funcionais em ratos SHR (OLIVEIRA, 2010), sugerem que a HAS poderia, por um mecanismo ainda não esclarecido, alterar o perfil biológico de células tronco ou ser agravada por déficit funcional de tais células no organismo de indivíduos afetados com a síndrome.

2 JUSTIFICATIVA

A HAS é uma síndrome na qual os mecanismos exatos envolvidos durante os processos de estabelecimento dos níveis pressóricos elevados e de surgimento das complicações aos órgãos-alvo ainda são pouco esclarecidos. Nesse contexto, avaliar as características de células tronco residentes do coração, órgão alvo de grande relevância na doença, auxiliaria na sua compreensão. A associação entre células tronco cardíacas e HAS, nunca antes estudada, torna-se necessária na busca de auxiliar na elucidação dos mecanismos implicados nos danos cardiovasculares observados em indivíduos hipertensos crônicos, assim como auxiliar na compreensão da etiopatogênese da doença.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil quantitativo de células tronco cardíacas na hipertensão arterial espontânea em ratos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar em ratos SHR, comparados com normotensos WKY:

- 1) o perfil quantitativo das células tronco cardíacas c-Kit⁺-CD45^{neg}, por meio de citometria de fluxo;
- 2) o perfil quantitativo das células tronco cardíacas Sca-1⁺-CD45^{neg}, por meio de citometria de fluxo;
- 3) o perfil quantitativo das células tronco mesenquimais cardíacas, por meio do ensaio de formação de unidades de colônias semelhantes a fibroblastos (*Colony forming unit – fibroblast – CFU-F*).

4 METODOLOGIA

4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram empregados 33 ratos SHR e 34 ratos WKY com idades de 04 e de 14 a 30 semanas. Os animais foram mantidos em condições controladas e estáveis em biotério (temperatura 22° C, umidade de 40-70% e ciclo claro-escuro de 12/12horas), alojados em caixas padrão para ratos com no máximo 05 animais por caixa, onde tiveram livre acesso à água e ração.

Todos os animais foram provenientes do biotério da disciplina de Fisiologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, em Uberaba/MG, e receberam cuidados humanos em conformidade com os “*Principles of Laboratory Animal Care*” formulado pela Sociedade Nacional de Pesquisa Médica e o “*Guide for the care and use of laboratory animals*” preparado pelo Instituto Nacional de Saúde [DHEW publicação nº (NHI) 80-123, revisado 1978]. Os protocolos experimentais apenas foram executados após aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFTM, sob números 272 e 277.

4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para a quantificação de células tronco cardíacas por citometria de fluxo, os animais foram divididos nos seguintes grupos:

- a) grupo SHR jovem (n = 5): composto por ratos SHR de 04 semanas de idade;
- b) grupo WKY jovem (n = 5): composto por ratos WKY de 04 semanas de idade;
- c) grupo SHR adulto (n = 15): composto por ratos SHR de 14 a 30 semanas de idade;
- d) grupo WKY adulto (n = 15): composto por ratos WKY de 14 a 30 semanas de idade;

Para quantificação de células tronco mesenquimais cardíacas, por meio de ensaio CFU-F, os animais foram separados nos seguintes grupos:

- a) grupo SHR jovem (n = 4): composto por ratos SHR de 04 semanas de idade.
- b) grupo WKY jovem (n = 4): composto por ratos WKY de 04 semanas de idade.
- c) grupo SHR adulto (n = 9): composto por ratos SHR de 14 a 30 semanas de idade.
- d) grupo WKY adulto (n = 10): composto por ratos WKY de 14 a 30 semanas de idade.

4.3 ESTUDO HEMODINÂMICO

Cerca de duas semanas antes do protocolo de isolamento, quantificação e cultivo das células tronco, todos os animais tiveram a pressão arterial e a frequência cardíaca monitorizadas em dias alternados (três vezes por semana), empregando-se o método de oclusão da artéria caudal, com a utilização de um sistema automatizado (Digital Blood Pressure Meter LE-5000, Letica S.I., Barcelona, Espanha), o qual permite uma medida indireta da pressão arterial sistólica (PAS) e frequência cardíaca (FC), baseada no ponto de surgimento de pulsação, após a liberação da oclusão da artéria caudal (Kurtz et al, 2005).

4.4 PROCESSAMENTO DO TECIDO CARDÍACO E QUANTIFICAÇÃO POR CITOMETRIA DE FLUXO

A eutanásia dos animais foi realizada imediatamente após o estudo hemodinâmico via anestesia com tiopental em dose supra-anestésica (100mg/kg), intraperitonealmente. Posteriormente à constatação de anestesia profunda, uma toracotomia foi efetuada e o coração de cada animal foi excisado, efetivando-se assim a eutanásia. O coração foi então pesado e inteiramente cortado em diminutos pedaços com uma lâmina de bisturi. A razão peso cardíaco/peso corporal foi utilizada como uma estimativa da hipertrofia cardíaca. Em seguida, o tecido cardíaco fragmentado foi suspenso em Meio Eagle Modificado por Dulbecco

(DMEM) com EDTA 2mM, contendo colagenase tipo I a 1%. A suspensão tecidual, mantida a 37 °C sob agitação contínua por 30 minutos a fim de liberar as células cardíacas da matriz extracelular, foi então filtrada, empregando-se uma peneira de nylon com poros de 40µm (Celltrainer, BDBiosciences) e contada, a fim de possibilitar a obtenção de células cardíacas não cardiomiocíticas, fração onde as células tronco cardíacas são encontradas (BELTRAMI et al., 2003). O pool de células foi então submetido à marcação com anticorpos marcadores de células tronco cardíacas.

Para cada animal foram preparados tubos de citometria, sendo que todos recebiam 50µL do pool celular, contendo 500.000 células, e 2µL do bloqueador da porção Fc (FcBlock - BDBiosciences Inc., San Jose, CA). Foram adicionados volumes de PBS-SBF aos tubos que receberam anticorpos marcadores ou os controles isotípicos a fim de completar o volume final dos tubos para 100 µL. Os anticorpos e os isotipos utilizados foram:

- a) tubo 1 - controle negativo, ao qual adicionavam-se apenas as células (50 µL), 48µL de PBS-SBF gelado e 2µL de Fc Block (0,5µg/µL);
- b) tubo 2 e 3 – adicionavam-se os isotipos controles, tanto para CD45 de rato (3µl) quanto para os marcadores Sca-1(2µl) e c-Kit (2µl) (clones A95-1 and R35-95), mais 2µL de Fc Block (0,5µg/µL) e 43µl de PBS-SBF;
- c) tubo 4 – adicionavam-se os anticorpos marcador de linhagem (anti-CD45 de rato, 3µl) conjugado à ficoeritrina (Phycoerythrin-PE) e anti-c-Kit (CD117) conjugado ao isotiacianato de fluoresceína (Fluorescein Isotiocyanate-FITC, clone 2B8, 2µl), mais 2µL de Fc Block (0,5µg/µL) e 43µl de PBS-SBF.
- d) tubo 5 – adicionavam-se os anticorpos marcador de linhagem (anti-CD45 de rato, 3µl) conjugado à ficoeritrina (Phycoerythrin-PE) e anti-Sca-1 (Ly-6A/E) conjugado ao isotiacianato de fluoresceína (Fluorescein Isotiocyanate-FITC, clone D7, 2µl), mais 2µL de Fc Block (0,5µg/µL) e 43µL de PBS-SBF.

Após a marcação, todos os tubos foram submetidos à incubação por 40 minutos no escuro, à temperatura de 4° C. Em seguida, o material foi lavado em PBS-SBF por 3 vezes (centrifugação de 200g por 5 minutos). Os tubos foram então levados para leitura em citômetro de fluxo.

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.

4.5 ISOLAMENTO DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS CARDÍACAS E ENSAIO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS SEMELHANTES FIBROBLASTOS

A eutanásia dos animais e toracotomia foi realizada da mesma maneira que a descrita anteriormente para a quantificação por citometria de fluxo. Cada coração foi então transportado em PBS-EDTA para a capela de fluxo laminar tipo 2-A, e processado para o isolamento das cMSCs. Foi realizada fragmentação mecânica do tecido cardíaco, seguida de digestão enzimática com solução de Tripsina-EDTA 0,25% por 20 minutos em banho-maria à 37°C, e centrifugação a 360g por 5 minutos. A solução de Tripsina-EDTA foi então bloqueada com o acréscimo de DMEM baixa glicose, 20% Soro Bovino Fetal, 1% Penicilina/Estreptomicina, para que a enzima não mais atuasse sobre os fragmentos cardíacos e não causasse danos às células em solução. O material obtido foi então submetido à filtração em Cellstrainer 70µm (BDBiosciences), para que fossem obtidas somente as células de interesse. Procedeu-se uma centrifugação a 360g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células resultantes foram ressuspensas e lavadas em PBS-EDTA. Em seguida, as células foram contadas para que fosse realizado o plaqueamento em placas de cultura multi-poços e em garrafas de cultura.

As células incubadas em placas de cultura multi-poços foram utilizadas para o ensaio CFU-F. Neste ensaio é possível quantificar as cMSCs, através da contagem do número de colônias, visto que cada colônia é formada por uma única célula-mãe original. Em cada poço foi plaqueada a mesma quantidade de células (100 mil células por poço) e para cada animal o ensaio foi realizado em duplicata ou triplicata. O meio de cultura (DMEM baixa glicose, 20% Soro Bovino Fetal, 1% Penicilina/Estreptomicina) foi trocado no 3º dia após plaqueamento, e depois novamente no 8º. No 13º dia de incubação, as células foram submetidas à revelação através de coloração por Giemsa diluído em Metanol. Posteriormente, o número de colônias foi contado com o auxílio de microscópio invertido de contraste de fase e expresso em número de CFU-F por 200.000 células plaqueadas.

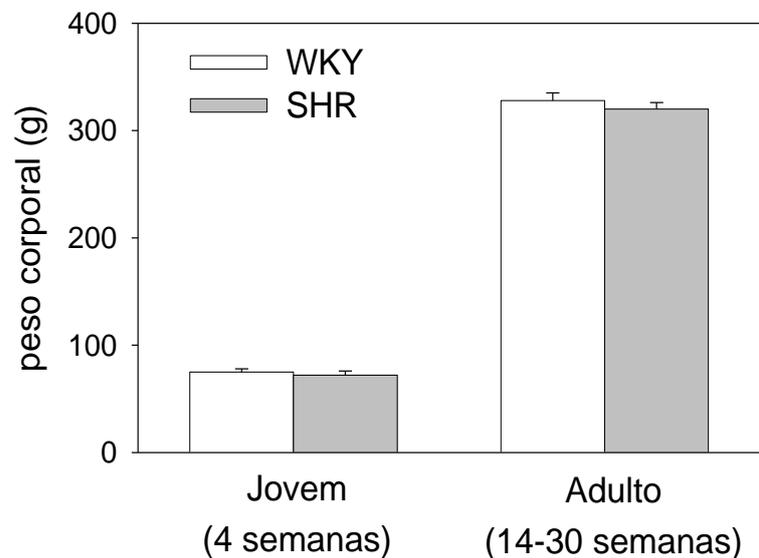
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os parâmetros foram expressos como média \pm erro padrão médio e comparados entre si empregando-se o teste t-Student ou teste de Mann-Whitney para duas amostras independentes, quando apropriados. Um valor de probabilidade menor que 0,05 foi utilizado para expressar a significância das comparações.

5 RESULTADOS

As figuras 4 e 5 mostram a evolução do peso corporal e da pressão arterial sistólica medida indiretamente na artéria caudal, respectivamente, nos dois grupos estudados nas duas diferentes idades: jovens de 4 semanas e adultos de 14-30 semanas. Note o peso corporal similar das duas linhagens de ratos nas duas idades estudadas (Figura 4).

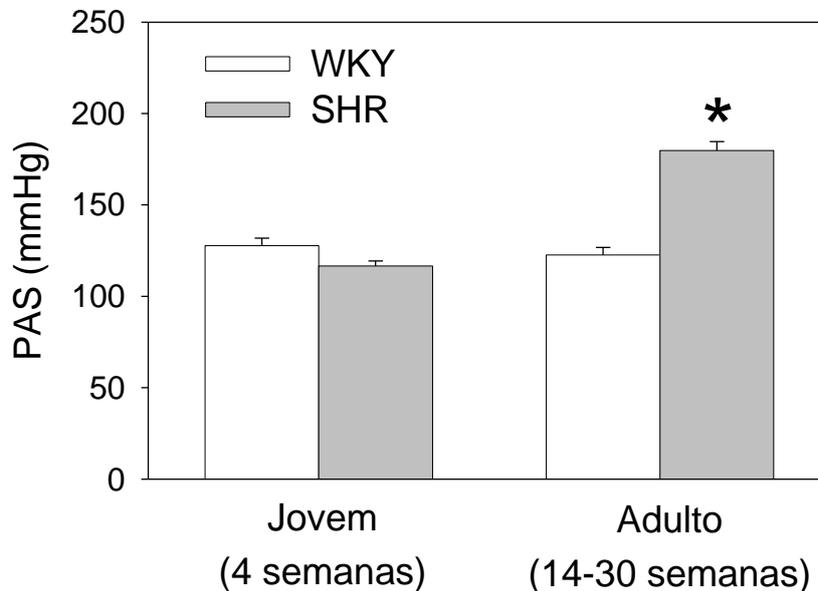
Figura 4 - Valores médios (\pm erro padrão) do peso corporal dos animais SHR e WKY nas diferentes idades estudadas. ($p=NS$ entre os grupos SHR e WKY na mesma idade).



Fonte: Da autora, 2016.

O estudo hemodinâmico demonstrou que nos animais do grupo jovem, de 4 semanas de idade, a PA sistólica ainda encontrava-se dentro dos valores considerados normais, ou seja, abaixo de 140mmHg. Para o grupo SHR jovem, a média de PA sistólica foi de $116,6 \pm 2,7$ mmHg, enquanto que para o grupo WKY jovem, a média foi de $127,7 \pm 4,1$ mmHg (Figura 5). Nos animais do grupo adulto, de 14 – 30 semanas, a pressão sistólica eleva-se para níveis já considerados acima dos valores normais, com os SHR apresentando média de $179,8 \pm 4,8$ mmHg e os WKY, média de $122,6 \pm 4,1$ mmHg ($p < 0,05$, Figura 5).

Figura 5 - Valores médios (\pm erro padrão) da pressão arterial sistólica (PAS) medida na artéria caudal dos animais SHR e WKY nas diferentes idades estudadas (* $p < 0,05$ versus grupo WKY de mesma idade).



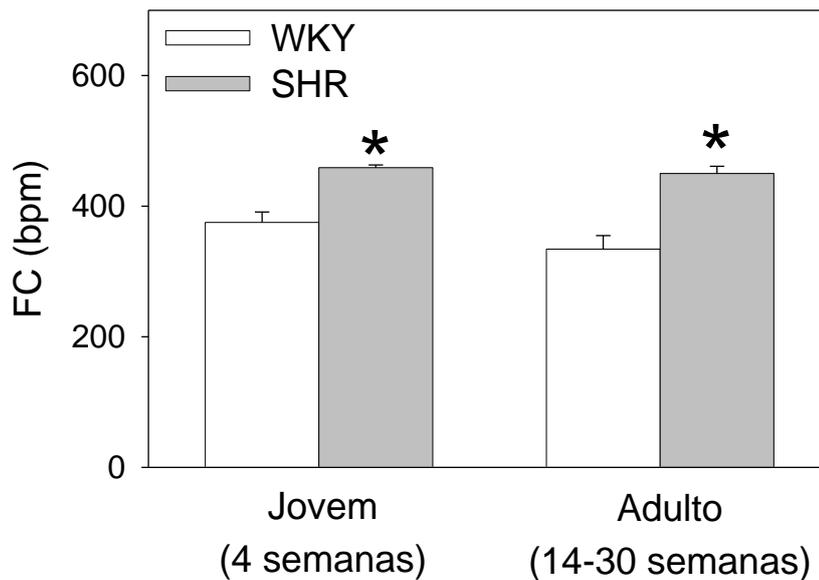
Fonte: Da autora, 2016.

A figura 6, na página seguinte, mostra o comportamento da frequência cardíaca medida pelo método da oclusão caudal nas duas idades estudadas. Note que em ambas as idades os SHRs apresentaram frequências cardíacas mais elevadas que os ratos WKY normotensos controles (459 ± 4 bpm versus 375 ± 16 bpm, respectivamente, $p < 0,05$ na idade de 4 semanas e 450 ± 11 bpm versus 334 ± 21 bpm, respectivamente, $p < 0,05$ na idade de 14-30 semanas) (Figura 6).

Após a eutanásia, o peso absoluto dos corações foi medido (Figura 7-A) e o cálculo da razão peso cardíaco/peso corporal (peso cardíaco relativo) foi efetuado (Figura 7-B). Os pesos cardíacos absolutos dos animais jovens de 4 semanas foram significativamente menores que os animais jovens, como esperado. Entretanto, em virtude do peso corporal muito menor, os pesos cardíacos relativos foram marcadamente maiores nos animais jovens de 4 semanas que nos animais adultos em ambas as linhagens de ratos. Em adição, nos animais de idade adulta (entre a 14ª e 30ª semana), os pesos cardíacos absolutos e relativos foram significativamente maiores nos SHR em comparação com os ratos WKY ($1,25 \pm 0,02$ g versus $0,89 \pm 0,01$ g, respectivamente,

$p < 0,05$, para o peso cardíaco absoluto e $3,92 \pm 0,17 \text{ mg/g}$ versus $2,73 \pm 0,22 \text{ mg/g}$, respectivamente, $p < 0,05$ para o peso cardíaco relativo) (Figura 7).

Figura 6 - Valores médios (\pm erro padrão) da frequência cardíaca (FC) medida na artéria caudal dos animais SHR e WKY nas diferentes idades estudadas (* $p < 0,05$ versus grupo WKY de mesma idade).



Fonte: Da autora, 2016.

Quanto à quantificação das células tronco cardíacas $c\text{-Kit}^+\text{-CD45}^{\text{neg}}$ no coração dos diferentes animais, note que na 4ª semana de idade, os animais SHR apresentaram maior contagem numérica de células $c\text{-Kit}^+\text{-CD45}^{\text{neg}}$ ($0,74 \pm 0,09\%$ versus $0,46 \pm 0,09\%$ nos ratos WKY, $p < 0,05$) (Figura 8). Com 14-30 semanas de idades, porém, o perfil numérico se inverteu e os SHR mostraram um número menor de células $c\text{-Kit}^+\text{-CD45}^{\text{neg}}$ em comparação aos ratos WKY ($0,43 \pm 0,10\%$ versus $0,78 \pm 0,12\%$ nos ratos WKY, $p < 0,05$) (Figura 8).

Figura 7 - Valores médios (\pm erro padrão) do peso cardíaco absoluto (painel A) e da razão peso cardíaco (em mg) pelo peso corporal (em gramas) (peso cardíaco relativo) (painel B) dos animais SHR e WKY nas diferentes idades estudadas. (* $p < 0.05$ versus grupo WKY de mesma idade).

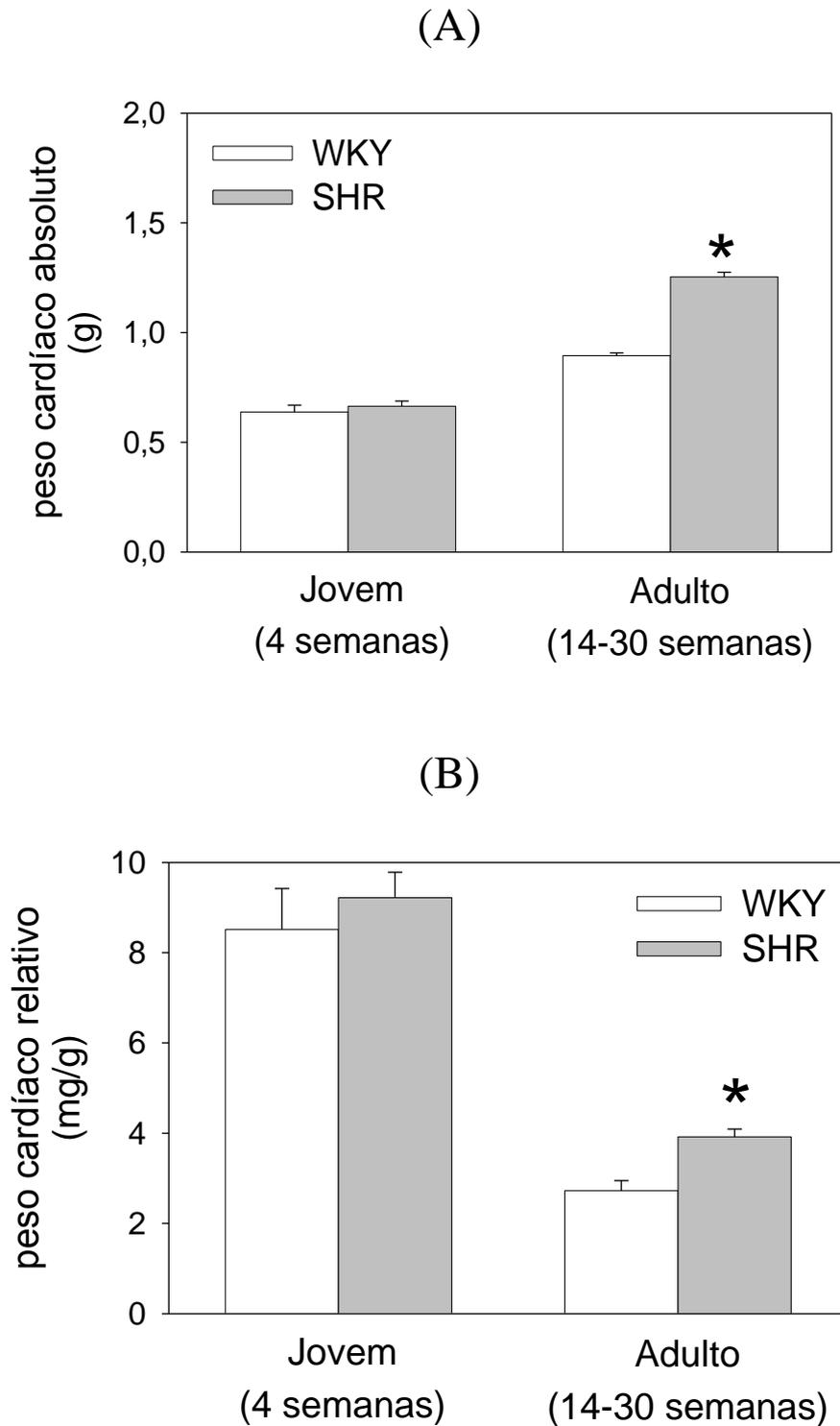
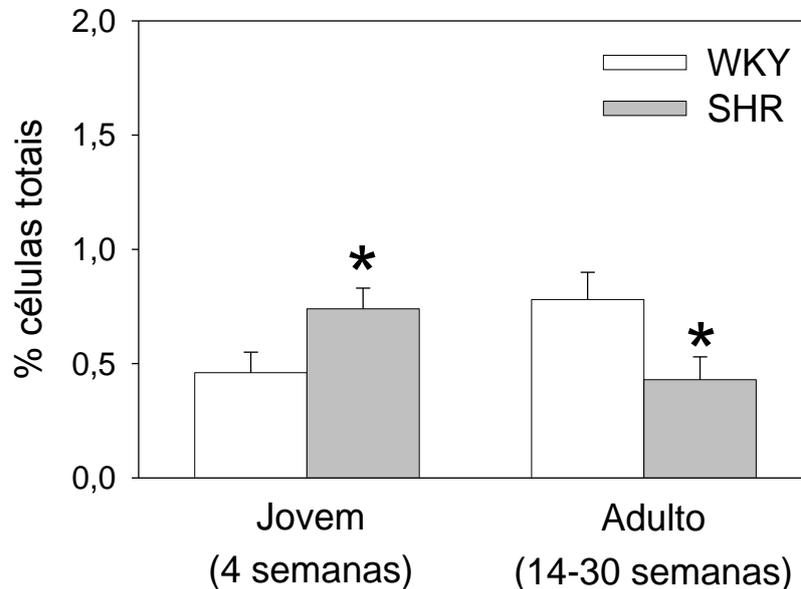


Figura 8 - Valores médios (\pm erro padrão) do percentual de células tronco cardíacas c-kit⁺-CD45^{neg} dos animais SHR e WKY em 4 semanas e em 14 – 30 semanas de idade (* $p < 0,05$ versus grupo WKY de mesma idade).

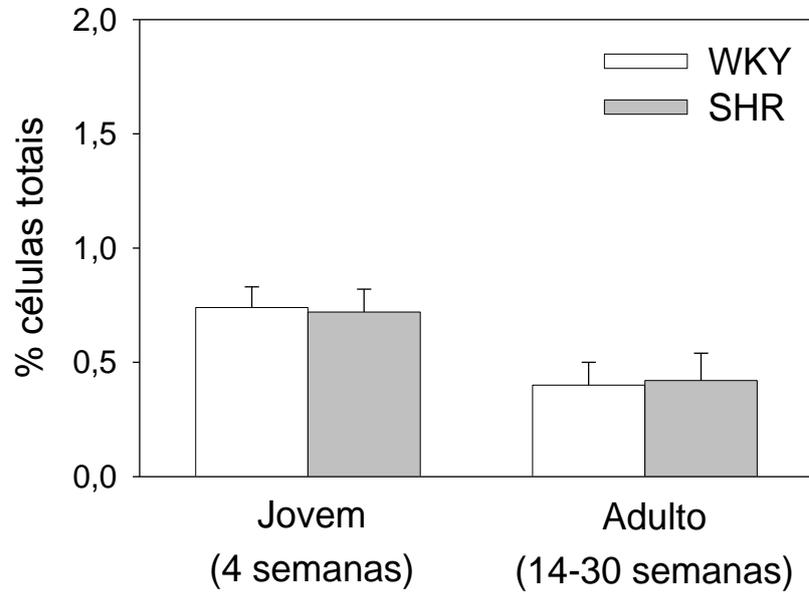


Fonte: Da autora, 2016.

Quanto à quantificação das células tronco cardíacas Sca-1⁺-CD45^{neg} no coração dos diferentes animais, note que na 4ª semana de idade, nenhuma diferença na contagem numérica das mesmas foi observada entre os SHRs e os ratos WKY ($0,72 \pm 0,10\%$ versus $0,74 \pm 0,09\%$, respectivamente, $p = \text{NS}$) (Figura 9). Com 14-30 semanas de idade, o mesmo perfil numérico sem diferença entre as duas linhagens de ratos se manteve ($0,40 \pm 0,10\%$ em SHR versus $0,42 \pm 0,12\%$ nos ratos WKY, $p = \text{NS}$) (Figura 9). Em ambas as linhagens de ratos, a contagem numérica das células Sca-1⁺-CD45^{neg} foi significativamente menor nos animais adultos (14-30 semanas) quando comparado aos animais jovens (Figura 9).

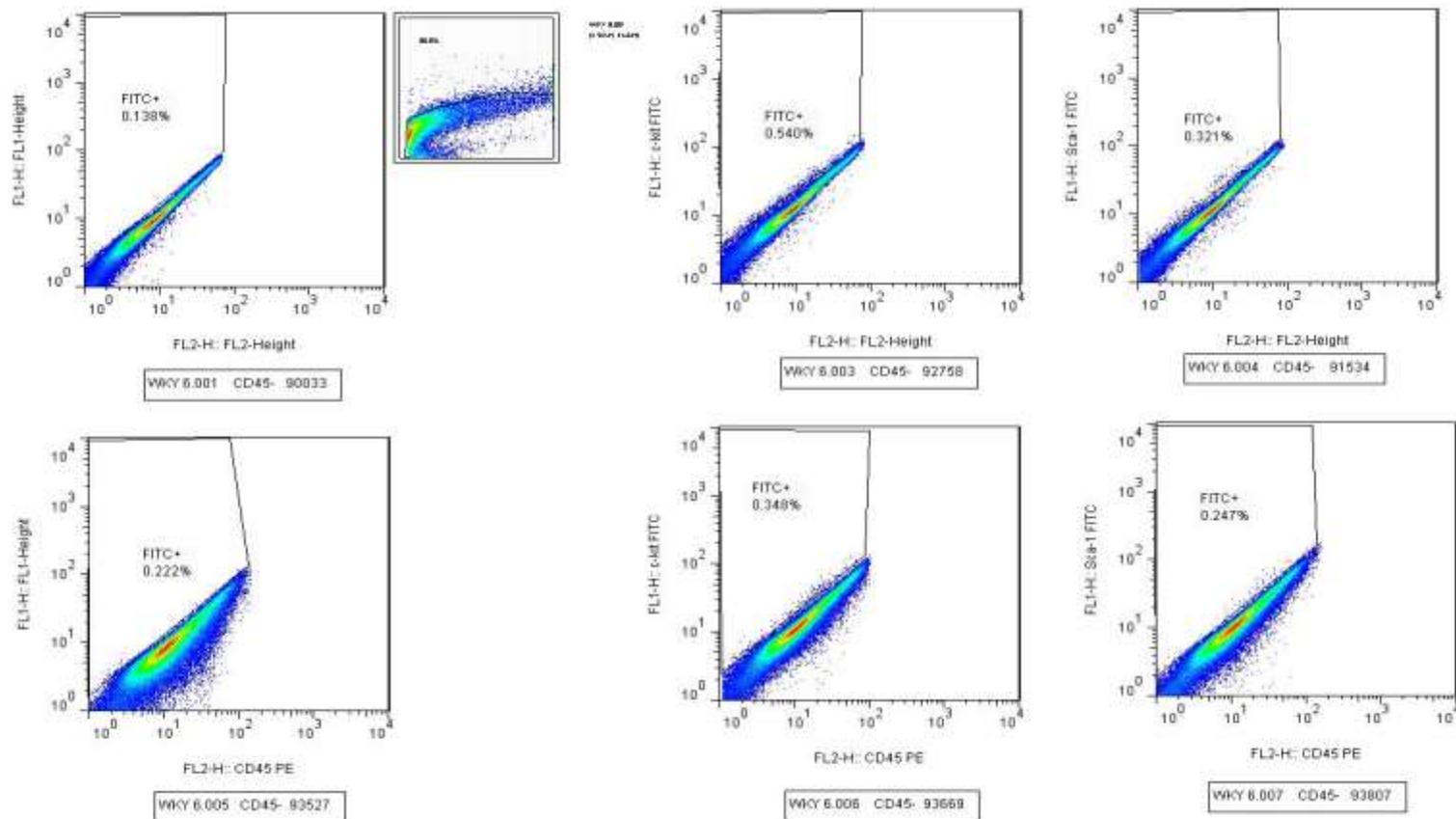
As figuras 10, 11, 12 e 13 ilustram painéis gráficos com os dados de citometria de fluxo de animais individuais representativos de cada um dos grupos estudados, respectivamente WKY - 4 semanas, SHR - 4 semanas, WKY - 14-30 semanas e SHR - 14-30 semanas.

Figura 9 - Valores médios (\pm erro padrão) do percentual de células tronco cardíacas Sca-1+CD45neg dos animais SHR e WKY em 4 semanas e em 14 – 30 semanas de idade. A contagem numérica de células nas duas linhagens de ratos foi significativamente menor nos animais adultos em comparação aos jovens.



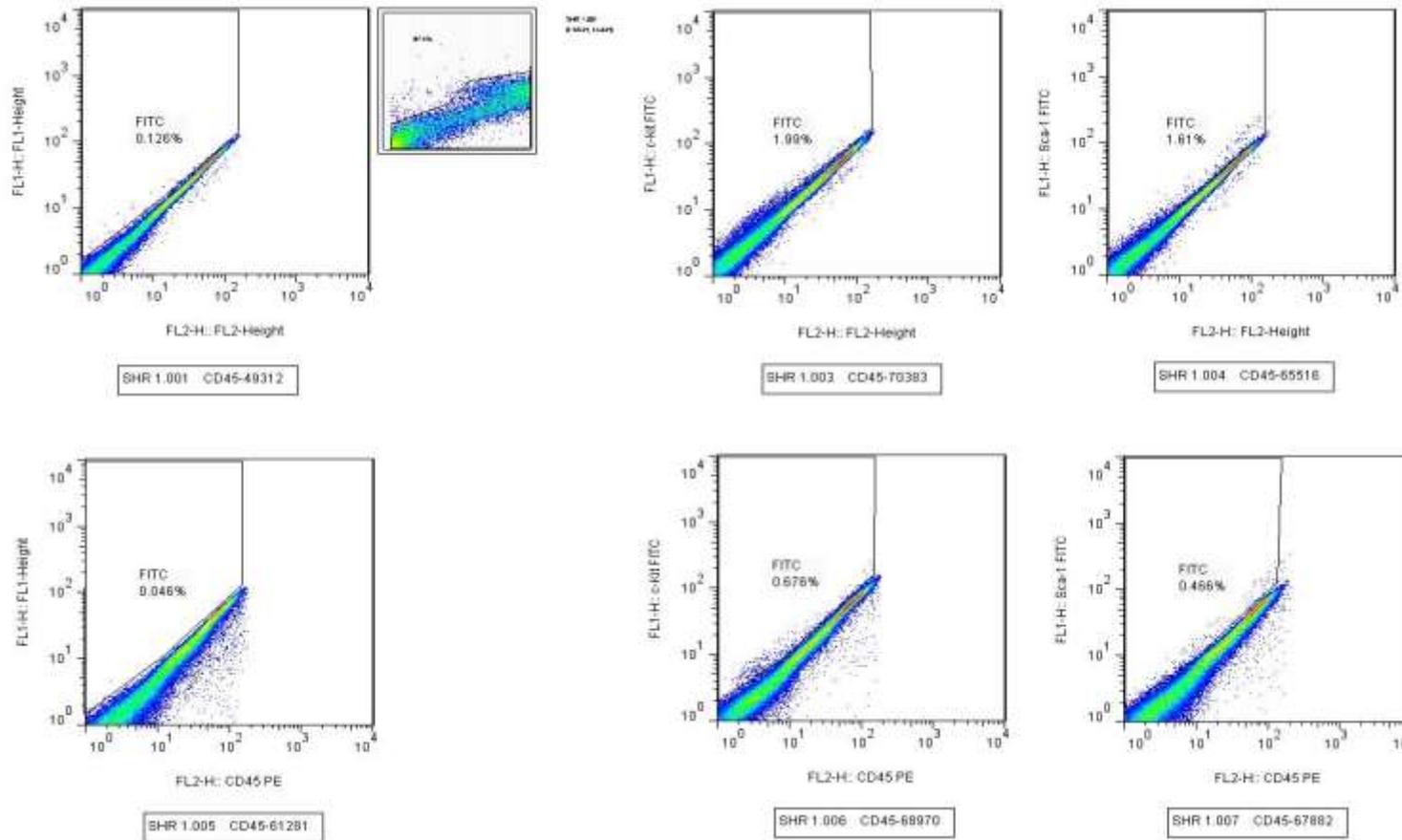
Fonte: Da autora, 2016.

Figura 10 – Painéis gráficos com dados de citometria de fluxo de um rato do grupo WKY-4 semanas. A figura mostra a distribuição das células marcadas com os isotipos controles (painéis superior e inferior à esquerda), bem como com os anticorpos anti-c-Kit e anti-Sca1 (quatro painéis à direita) no total de células (painéis superiores) e em células CD45 negativas (painéis inferiores). Painel menor mostra marcação com anti-CD45.



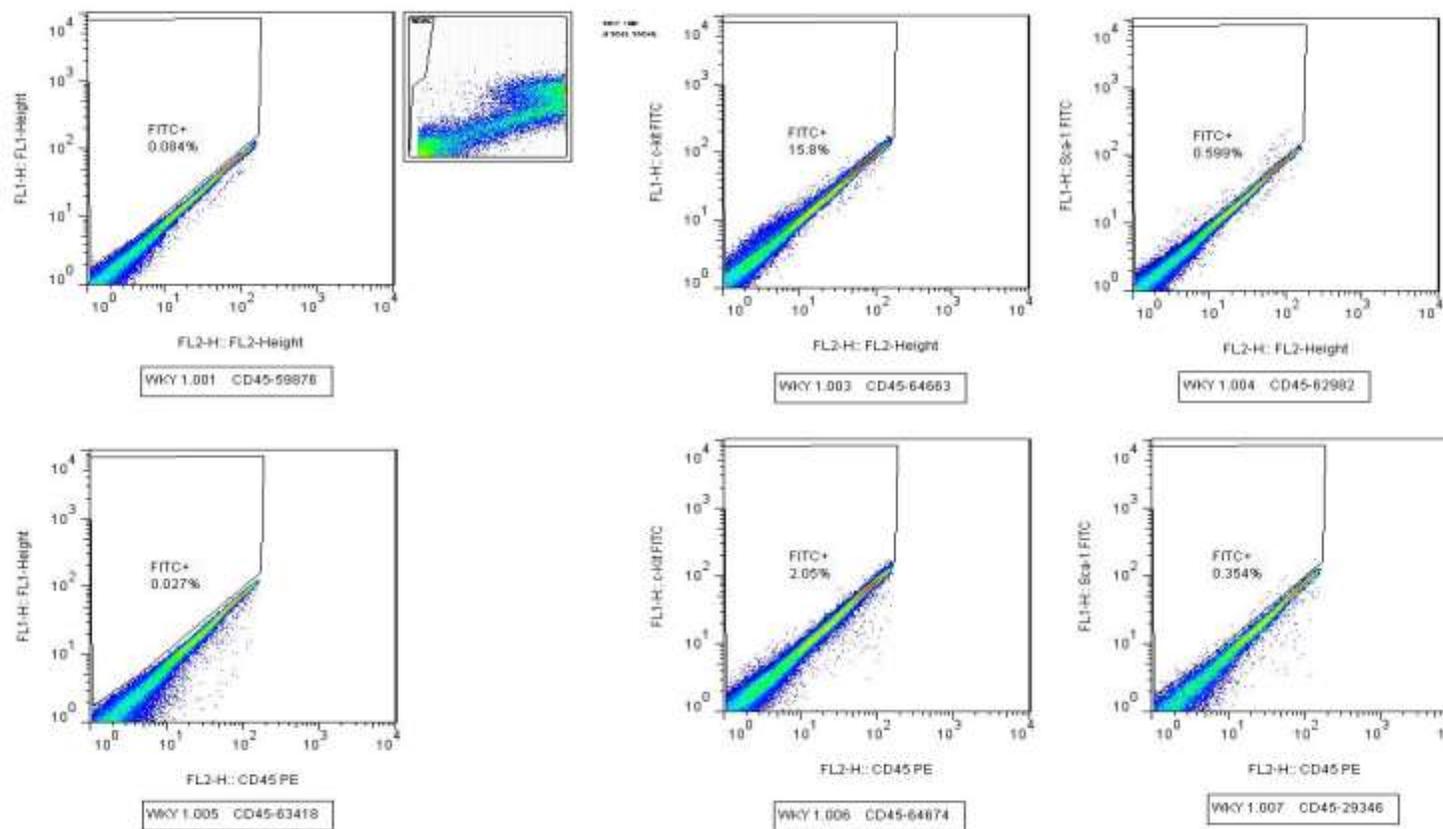
Fonte: Da autora, 2016.

Figura 11 – Painéis gráficos com dados de citometria de fluxo de um rato do grupo SHR-4 semanas. A figura mostra a distribuição das células marcadas com os isotipos controles (painéis superior e inferior à esquerda), bem como com os anticorpos anti-cKit e anti-Sca1 (quatro painéis à direita) no total de células (painéis superiores) e em células CD45 negativas (painéis inferiores). Painel menor mostra marcação com anti-CD45.



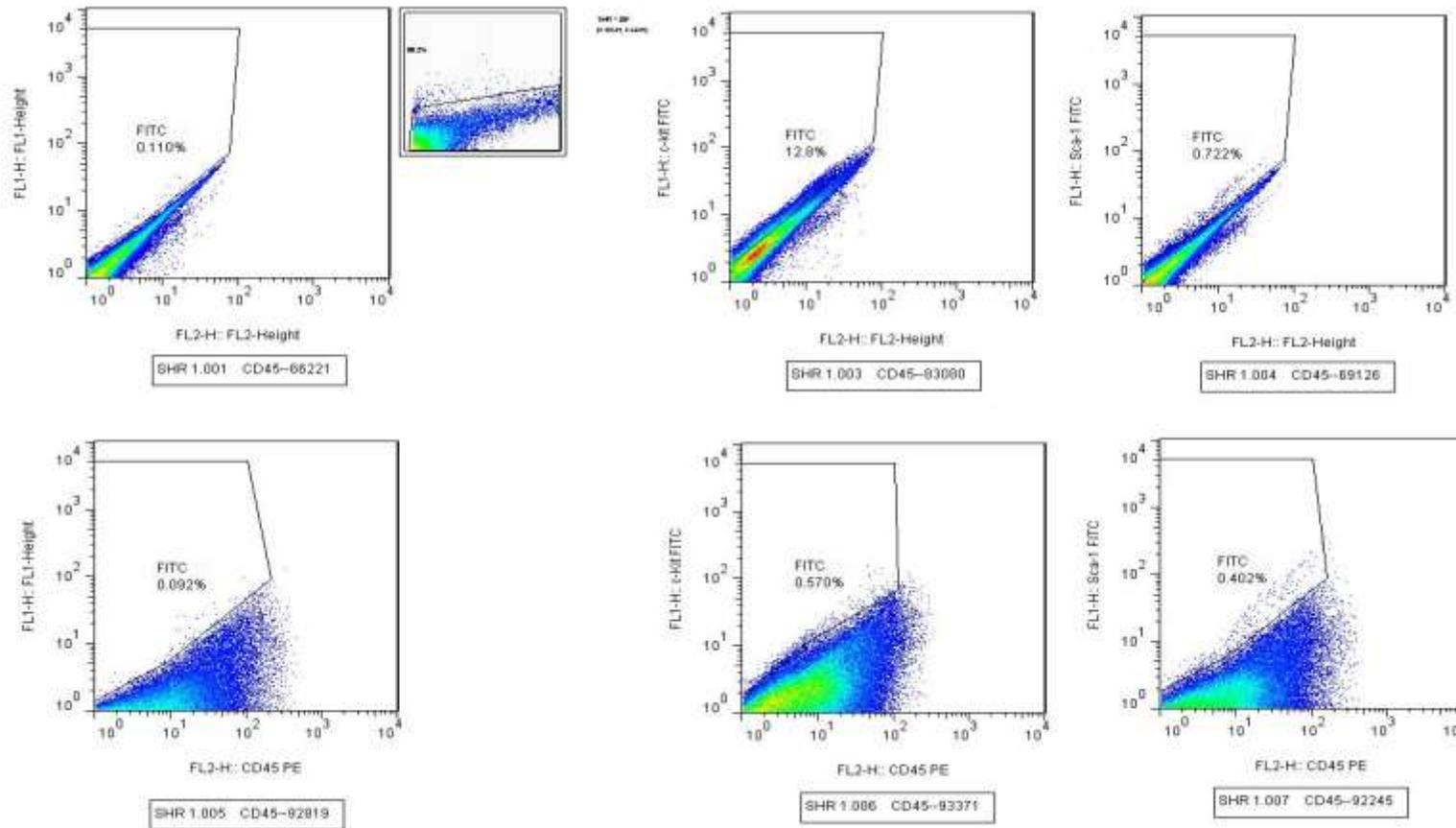
Fonte: Da autora, 2016.

Figura 12 – Painéis gráficos com dados de citometria de fluxo de um rato do grupo WKY-14-30 semanas. A figura mostra a distribuição das células marcadas com os isotipos controles (painéis superior e inferior à esquerda), bem como com os anticorpos anti-cKit e anti-Sca1 (quatro painéis à direita) no total de células (painéis superiores) e em células CD45 negativas (painéis inferiores). Painel menor mostra marcação com anti-CD45.



Fonte: Da autora, 2016.

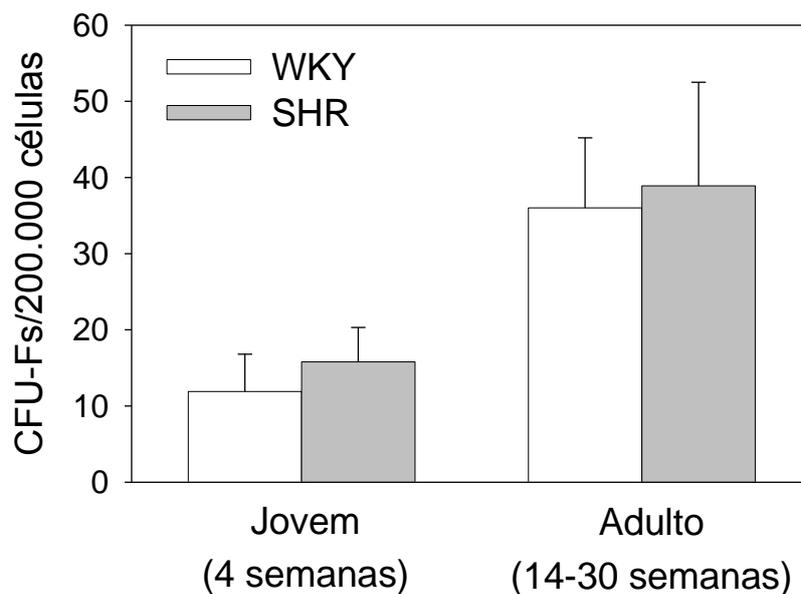
Figura 13 – Painéis gráficos com dados de citometria de fluxo de um rato do grupo SHR-14-30 semanas. A figura mostra a distribuição das células marcadas com os isotipos controles (painéis superior e inferior à esquerda), bem como com os anticorpos anti-cKit e anti-Scal1 (quatro painéis à direita) no total de células (painéis superiores) e em células CD45 negativas (painéis inferiores). Painel menor mostra marcação com anti-CD45.



Fonte: Da autora, 2016.

Em relação à quantificação das cMSCs, contadas como CFU-Fs por 200.000 células cultivadas, os animais SHR de 04 semanas de idade, ainda que não hipertensos, apresentaram contagem numérica destas células similar em comparação com seus respectivos controles ($15,8 \pm 4,5$ CFU-F/200.000 células versus $11,9 \pm 4,9$ CFU-F/200.000 células no grupo WKY, respectivamente, $p=NS$) (Figura 14). Nos animais com idade entre 14 e 30 semanas nenhuma diferença na contagem de CFU-Fs foi também observada em ambas as linhagens ($38,9 \pm 13,6$ CFU-F/200.000 células em SHRs versus $36,0 \pm 9,2$ CFU-F/200.000 células em ratos WKY, $p=NS$) (Figura 14).

Figura 14 -Valores médios (\pm erro padrão) do número de células tronco mesenquimais cardíacas (cMSC), expressas como unidades formadoras de colônias similares a fibroblastos (CFU-F) por 200.000 células cultivadas dos corações dos animais SHR e WKY em 4 semanas e em 14 – 30 semanas de idade. Nenhuma diferença no número de CFU-Fs foi notada entre as linhagens de ratos e entre a idade dos mesmos.

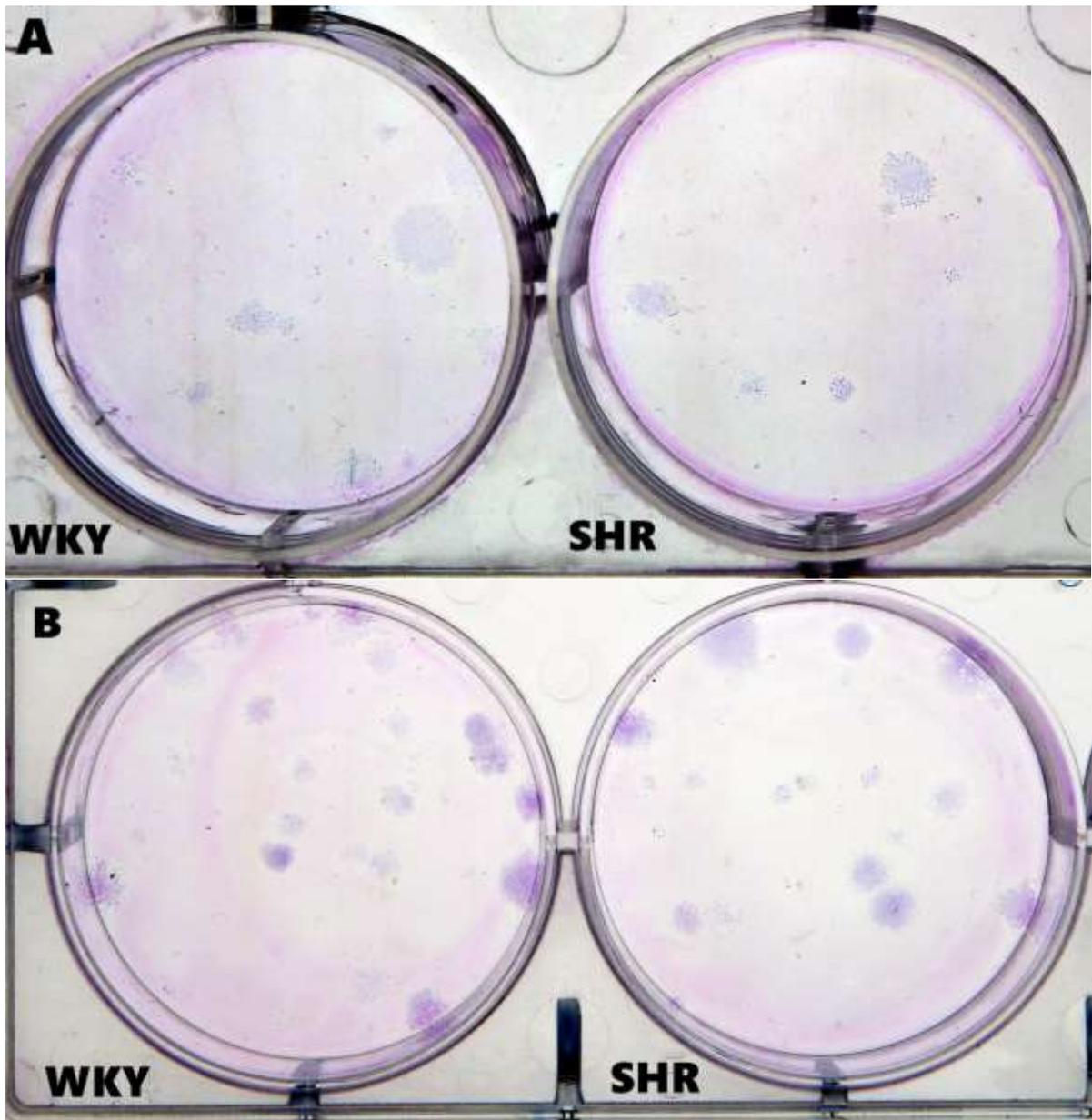


Fonte: Da autora, 2016.

Imagens ilustrativas de poços de cultura de CFU-Fs de animais representativos dos dois grupos experimentais nas duas idades estudadas estão mostradas na Figura 15. As figuras 16 e 17 mostram as características microscópicas das colônias de animais SHR e WKY nos aumentos de 50x e 100x, respectivamente. Pode-se notar nas colônias de SHR um espaçamento

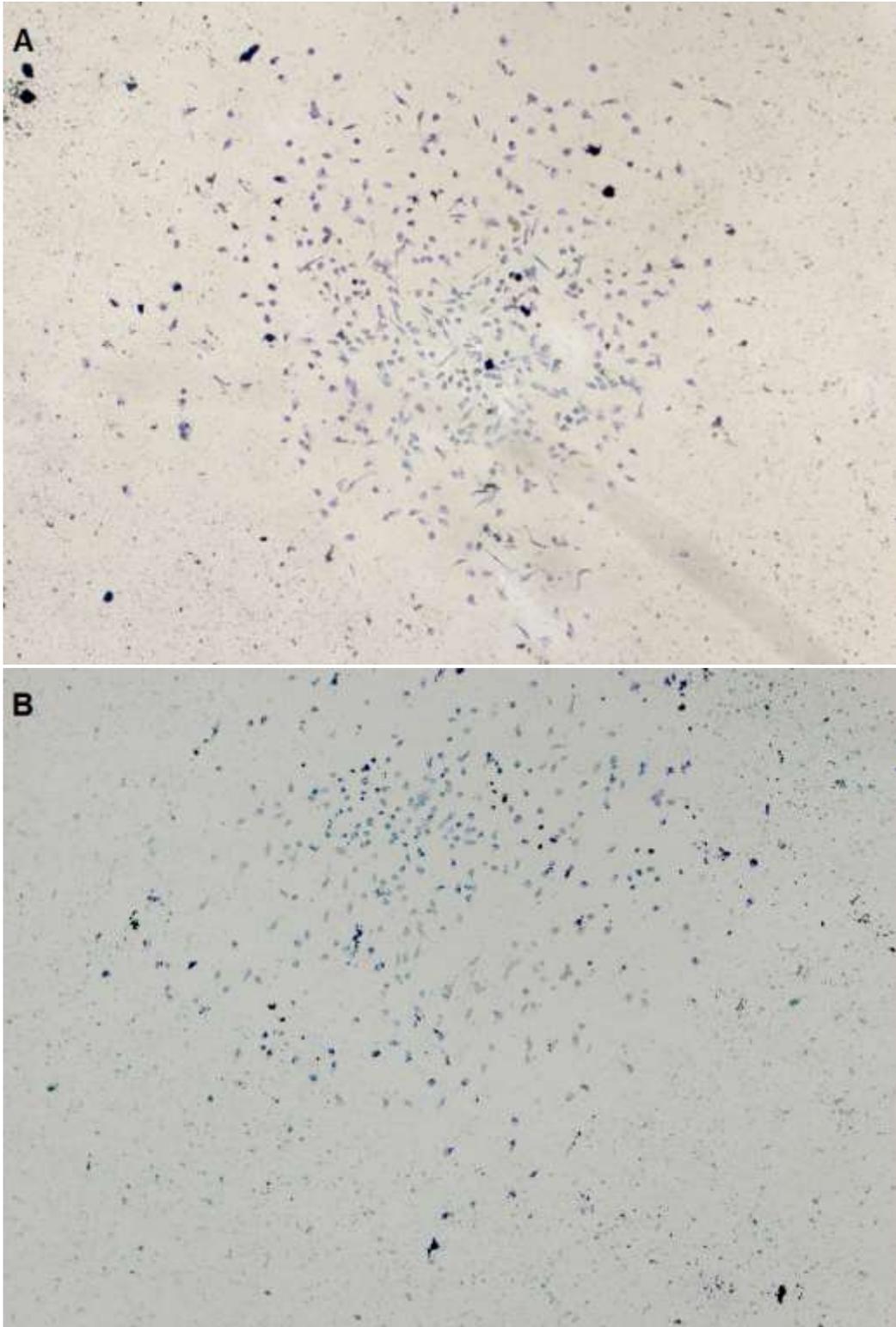
maior entre as células e uma menor frequência de células com formato fibroblastóide em comparação com as colônias de WKY (Figuras 16 e 17).

Figura 15– Visão macroscópica de placas de cultura correspondentes aos ensaios de CFU-F dos animais de 4 semanas (Painel A) e de 14-30 semanas de idade (Painel B). Os pontos corados por Giemsa representam as colônias celulares, formadas por células tronco mesenquimais cardíacas.



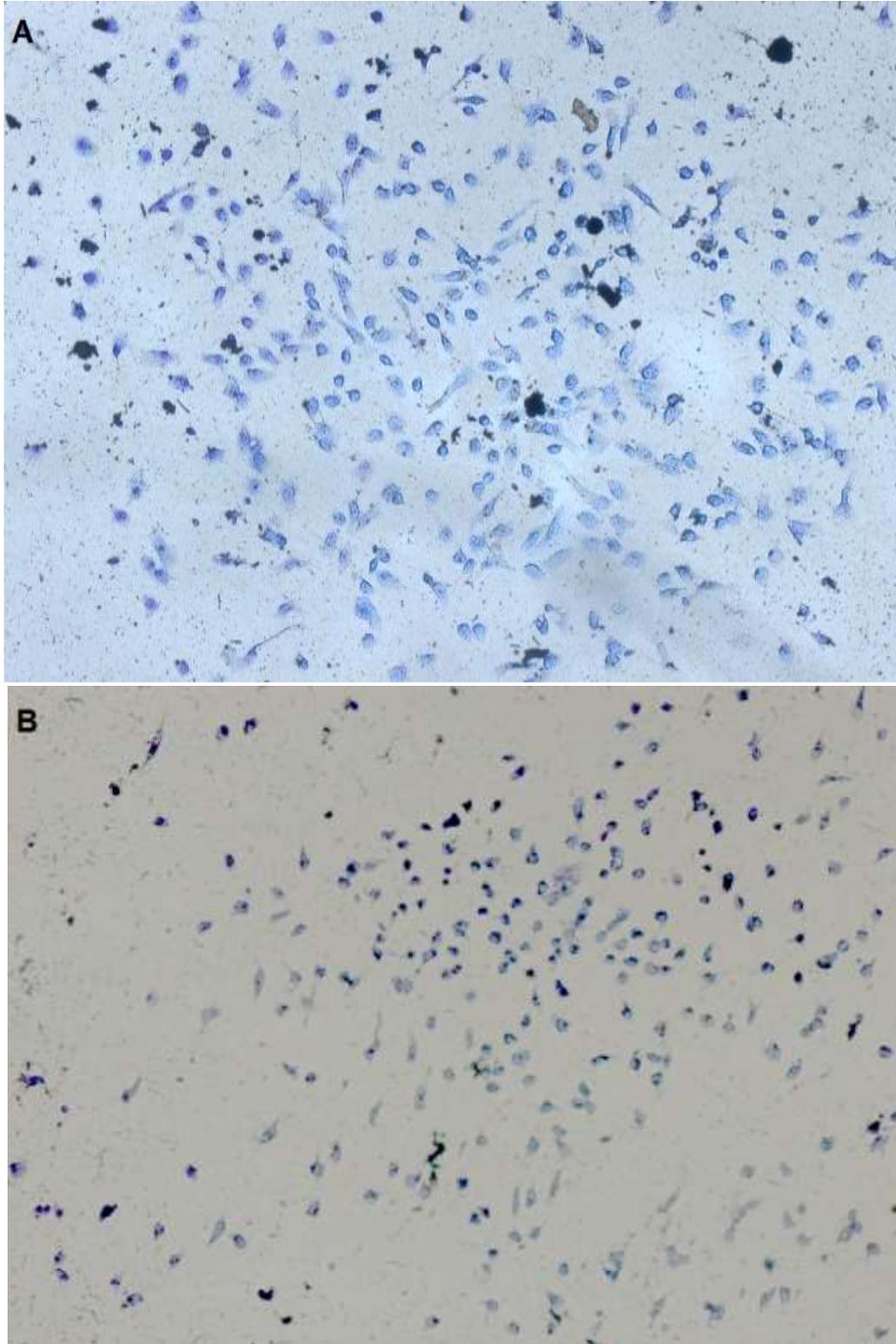
Fonte: Da autora; Serviço de Fotografia – UFTM, 2016.

Figura 16- Visão microscópica de dois poços de placa de cultura correspondente ao ensaio CFU-F de animais WKY (imagem A) e SHR (imagem B) de 16 semanas de idade, em aumento de 50x. Comparando-se as duas imagens, é possível observar alterações morfológicas entre as colônias de ratos WKY e SHR.



Fonte: Da autora, 2016.

Figura 17- Visão microscópica de dois poços de placa de cultura correspondente ao ensaio CFU-F de animais WKY (imagem A) e SHR (imagem B) de 16 semanas de idade, em aumento de 100x. Comparando-se as duas imagens, é possível observar alterações morfológicas entre as células tronco mesenquimais cardíacas das colônias de ratos WKY e SHR



Fonte: Da autora, 2016.

6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho são os primeiros da literatura a quantificar em ratos espontaneamente hipertensos diferentes tipos de células tronco cardíacas, a saber, as células tronco cardíacas c-Kit⁺-CD45^{neg}, Sca-1⁺-CD45^{neg} e as mesenquimais (cMSCs). Diferença significativa foi notada em relação às células tronco cardíacas c-Kit⁺-CD45^{neg}, o que pode ao menos parcialmente estar implicado na fisiopatologia da hipertrofia cardíaca associada à hipertensão arterial sistêmica

Os dados hemodinâmicos obtidos pelo método de oclusão da artéria caudal demonstram que a PA dos animais SHR de 4 semanas de idade ainda encontra-se dentro de valores normais. Porém com 14-30 semanas a média pressórica mostra-se consideravelmente elevada. Tais resultados estão de acordo com os descritos por Yamori, nos quais a elevação da PA inicia-se com 5 semanas de idade e entre a 7^a e 15^a semanas de vida os animais já são considerados hipertensos (YAMORI, 1984). Ainda que os SHR de 4 semanas de idade ainda não sejam hipertensos, os mesmos já demonstram uma frequência cardíaca aumentada, denotando já nesta idade um aumento da atividade nervosa simpática para o coração (TRIPPODO, FROHLICH, 1981; YAMORI, 1984).

A relação do peso cardíaco pelo peso corporal encontrada neste trabalho demonstrou que com o surgimento da HAS, os animais começam a desenvolver um quadro de hipertrofia cardíaca. A hipertrofia cardíaca, complicação característica da HAS, que aumenta de forma significativa o risco de desenvolvimento de IC, decorre das alterações causadas pelos elevados valores de PA ao qual o organismo é submetido cronicamente. Os dados encontrados estão de acordo com Trippodo e Frohlich, os quais relataram as alterações vasculares e cardíacas presentes nos ratos SHR (TRIPPODO, FROHLICH, 1981). Vale destacar aqui que os valores de peso cardíaco relativo nos animais jovens (4 semanas) de ambas as linhagens WKY e SHR não diferiram entre si, certamente pela ausência de sobrecarga pressórica nos animais SHR desta idade, os quais ainda não apresentam níveis tensionais elevados. Em adição, os valores de peso cardíaco relativo de ambas as linhagens nesta idade foram praticamente o dobro ou triplo dos valores observados nos animais adultos. Tais resultados estão de acordo com os encontrados por Solomon e Bengel, os quais demonstraram que ratos em idades mais jovens

apresentam peso cardíaco relativo maior quando comparados com animais em idades adultas (SOLOMON, BENGELE, 1973).

Em relação às células tronco cardíacas c-Kit⁺-CD45^{neg}, o presente estudo demonstrou que os animais SHR numa fase de hipertensão arterial praticamente estabelecida (14 - 30 semanas) apresentam redução numérica de suas células c-Kit⁺-CD45^{neg}, o que coincide com a hipertrofia cardíaca observada nestas idades. Curiosamente, com 4 semanas de idade, na fase pré-hipertensiva, os corações de animais SHR apresentaram um comportamento inverso, ou seja, uma maior quantidade de células tronco cardíacas c-Kit⁺-CD45^{neg} em comparação aos ratos WKY de mesma idade. As razões para estas diferenças numéricas no contexto da hipertensão arterial não são conhecidas e mais pesquisas deverão ser efetuadas para esclarecer este assunto.

Estudos demonstram que as células c-Kit⁺-CD45^{neg} apresentam potencial para geração de novos cardiomiócitos (BELTRAMI et al., 2003; LERI, KAJSTURA, ANVERSA, 2011), além de ocasionarem melhora funcional cardíaca quando transplantadas (BOLLI et al, 2013, HONG et al, 2014;). A redução das células c-Kit⁺-CD45^{neg} nos animais hipertensos, na fase de estabelecimento da hipertensão (14 - 30 semanas) poderia contribuir para os danos cardíacos observados cronicamente na HAS, visto que na hipertrofia cardíaca ocorre perda de cardiomiócitos e aumento de fibrose. O número reduzido de células c-Kit⁺-CD45^{neg} poderia prejudicar de forma mais acentuada o quadro patológico cardíaco, devido ao possível comprometimento da formação *de novo* de cardiomiócitos.

Em adição, as células c-Kit⁺-CD45^{neg} podem gerar células endoteliais e musculares lisas (LERI, KAJSTURA, ANVERSA, 2011), contribuindo assim para a neoangiogênese. De fato, van Berlo e colaboradores demonstraram que tais células apresentam amplo potencial de diferenciação *in vivo* em células endoteliais cardíacas (VAN BERLO et al., 2014). Levando-se em consideração a rarefação microvascular cardíaca observada na HAS (WANG et al., 2004), a redução numérica das células c-Kit⁺-CD45^{neg} observada poderia também estar implicada nesta complicação da síndrome. Tal achado na hipertrofia patológica associada à hipertensão arterial sistêmica se opõe aos achados em animais submetidos ao treinamento físico aeróbico em esteira (WARING et al., 2014) ou por natação (LEITE et al, 2015) em que o número de células tronco cardíacas c-Kit⁺-CD45^{neg} encontra-se significativamente aumentado no coração com a hipertrofia fisiológica do exercício. Neste tipo de hipertrofia, a rarefação microvascular não é observada (WEINER, BAGGISH, 2012).

Trabalhos recentes têm sugerido que os resultados benéficos alcançados com a utilização das células tronco c-Kit⁺-CD45^{neg} decorreriam de sua capacidade de secreção de fatores parácrinos, os quais atuariam no tecido cardíaco (HONG et al, 2014). Portanto, a redução de tais células nos ratos hipertensos, poderia prejudicar a secreção de biomoléculas capazes de auxiliar o quadro de hipertrofia cardíaca observada nestes animais. Dessa forma, a diminuição numérica das células c-Kit⁺-CD45^{neg} implicaria em possível prejuízo da neoangiogênese, da formação *de novo* de cardiomiócitos, e de estímulos parácrinos benéficos ao ambiente cardíaco.

As razões predisponentes para a redução no número das células c-Kit⁺-CD45^{neg} do coração são desconhecidas. Entretanto, devido à não ocorrência da diminuição de tais células na fase pré-hipertensiva, de 4 semanas de idade, é possível sugerir que a redução numérica das células c-Kit⁺-CD45^{neg} no coração seria possivelmente uma consequência da evolução e do agravamento da HAS, uma vez que seu surgimento se dá a partir do desenvolvimento dos níveis pressóricos elevados. Ainda é possível sugerir, de forma relativamente segura, que a redução numérica encontrada não estaria relacionada diretamente a fatores genéticos, visto que nos animais SHR de 4 semanas de idade, tal redução não foi observada.

Diversos trabalhos têm demonstrado que células tronco são sensíveis ao *stress* oxidativo, o qual é capaz de ocasionar aumento nos níveis de apoptose (GUO et al, 2010; WU et al, 2013). Considerando que em ratos SHR é observado *stress* oxidativo vascular (NABHA et al, 2005), além de aumento nas taxas de apoptose no coração (HAMET et al, 1995), o declínio encontrado para as células c-Kit⁺-CD45^{neg} poderia estar envolvido com a elevação da taxa de morte celular causada por aumento de radicais livres nesses animais.

Além disso, foi demonstrado que a biodisponibilidade de NO é capaz de modular a sobrevivência de células c-Kit⁺-CD45^{neg}, através do aumento à resistência ao *stress* oxidativo ocasionado pela molécula de NO (TENG, BENNETT, CAI, 2016). A diminuição da biodisponibilidade e síntese de NO, consequência da disfunção endotelial observada na HAS (BRUNNER et al, 2005), poderia, portanto, levar a uma menor resistência a radicais livres, e contribuir para a redução encontrada em tais células no coração dos animais SHR adultos.

Ainda no que concerne à diminuição das c-Kit⁺-CD45^{neg} nos ratos hipertensos, outro possível fator envolvido seria o sistema nervoso autonômico simpático. Khan e colaboradores demonstraram que a estimulação β -adrenérgica, atuando através do receptor adrenérgico β_1 , é capaz de ocasionar a perda de células c-Kit⁺-CD45^{neg} no coração (KHAN et al, 2013).

Considerando que, no presente trabalho, foi observado um aumento da FC nos animais SHR, o que poderia estar relacionado com o aumento da atividade simpática encontrada também nestes animais (TRIPPODO, FROHLICH, 1981), a estimulação adrenérgica poderia contribuir para a morte celular de tais células tronco cardíacas no coração dos animais hipertensos.

Embora todos os mecanismos citados anteriormente possam contribuir para os resultados observados em relação às células c-Kit⁺-CD45^{neg}, novos trabalhos devem ser realizados para que seja avaliada a importância fisiopatológica de cada um dos fatores descritos para a redução na contagem destas células.

No que diz respeito às células Sca-1⁺-CD45^{neg}, não foram demonstradas quaisquer diferenças numéricas entre os SHR e ratos WKY em nenhuma das idades em estudo. Porém, foi observada diferença significativa em ambas as linhagens em relação às diferentes idades, com redução numérica das células Sca1⁺-CD45^{neg} com o envelhecimento dos animais. Este estado está de acordo com Ye e colaboradores, os quais descreveram a ocorrência de diminuição de células Sca-1⁺-CD45^{neg} em camundongos velhos através do estudo de cardiosferas, unidades suspensas de células cardíacas em cultura, formadas por diversos tipos celulares, incluindo as células Sca-1⁺-CD45^{neg} (Ye et al, 2013). Esses resultados demonstram que o envelhecimento, por um mecanismo ainda não conhecido, alteraria o número de células Sca-1⁺-CD45^{neg} no coração. Novos estudos são necessários para que se busque o entendimento dos fatores relacionados com a redução numérica de tais células.

Além disso, a redução das células Sca-1⁺-CD45^{neg} demonstrada de forma similar em ambas as linhagens, sugere que estas células tronco seriam possivelmente resistentes à morte celular pelos mecanismos desencadeados pela HAS, visto que não houve diminuição significativa das células nos animais hipertensos quando comparados aos normotensos. Tal fato não descarta, contudo, que as células Sca-1⁺-CD45^{neg} poderiam ainda apresentar defeitos funcionais ocasionados pela HAS. Novos estudos devem ser realizados para que sejam avaliadas as características funcionais de tais células no coração de hipertensos.

Da mesma forma que para as células Sca-1⁺-CD45^{neg}, não foram observadas alterações quantitativas no que se refere às cMSCs. Previamente a este trabalho, Oliveira (2010) demonstrou que animais SHR adultos (entre 16 a 24 semanas) não apresentavam diferença significativa no número de CFU-F de MSCs de medula óssea em relação aos seus controles pareados normotensos WKY (OLIVEIRA, 2010). No presente estudo, foi demonstrado pela primeira vez que tais células se alojam no coração de SHRs em números similares aos WKY

desde a fase pré-hipertensiva (4 semanas de idade) até o estabelecimento da hipertensão arterial sistêmica (14-30 semanas). Dados coletados da avaliação morfológica das CFU-Fs dos animais hipertensos (14-30 semanas) parecem sugerir que, ainda que em mesmo número, as cMSCs de SHRs possuem alterações morfológicas significativas em relação às CFU-Fs de ratos WKY. Tais achados poderiam também sugerir um eventual déficit funcional destas células no coração de SHR, em concordância com dados obtidos por Oliveira (2010), que encontrou em MSCs de medula óssea de SHRs, um marcado déficit de proliferação, diferenciação e tendência a entrar em senescência replicativa precoce (OLIVEIRA, 2010). Entretanto, pesquisas futuras precisam ser realizadas para melhor elucidar a existência de déficit funcional nas MSCs cardíacas.

7 CONCLUSÃO

Este trabalho mostra pela primeira vez um déficit numérico de células tronco cardíacas c-Kit⁺-CD45^{neg} no coração hipertrofiado de ratos espontaneamente hipertensos. Células tronco cardíacas Sca-1⁺-CD45^{neg} e células tronco mesenquimais cardíacas (cMSCs) não são numericamente modificadas, embora em relação às últimas, parece haver alteração morfológica celular nos animais hipertensos. A redução numérica de células tronco cardíacas c-Kit⁺-CD45^{neg} no coração de hipertensos poderia de alguma forma contribuir para a patogênese da hipertrofia cardíaca decorrente da hipertensão arterial sistêmica. Novos estudos devem ser realizados para que sejam caracterizados os mecanismos envolvidos no declínio de células c-Kit⁺-CD45^{neg}, além de serem estudadas as características funcionais das células tronco cardíacas no contexto da Hipertensão Arterial Sistêmica.

8 REFERÊNCIAS

- Andrade SSA, Stopa SR, Brito AS, Chueri PS, Szwarcwald CL, Malta DC. Prevalência de hipertensão arterial autorreferida na população brasileira: análise da Pesquisa Nacional de Saúde, 2013. *Epidemiol. Serv. Saúde*. 2015;24(2):297-304.
- Badyal DK, Lata H, Dadhich AP. Animal Models of Hypertension and Effect of Drugs. *Indian Journal of Pharmacology*. 2003;35:349-362.
- Beevers DG. The epidemiology of salt and hypertension. *Clinical Autonomic Research*. 2002;12(5):353–357.
- Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 2003 Sep 19;114(6):763-76.
- Bernardo ME, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell*. 2013 Oct 3;13(4):392-402.
- Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell*. 2001 Jun 29;105(7):829-41.
- Bolívar JJ. Essential Hypertension: An Approach to Its Etiology and Neurogenic Pathophysiology *Int J Hypertens*. 2013;2013:547809.
- Bolli R, Chugh AR, D'Amario D, Loughran JH, Stoddard MF, Ikram S, et al. Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet*. 2011 Nov 26;378(9806):1847-57.
- Bolli R, Tang XL, Sanganalmath SK, Rimoldi O, Mosna F, Abdel-Latif A, Jneid H, et al. Intracoronary delivery of autologous cardiac stem cells improves cardiac function in a porcine model of chronic ischemic cardiomyopathy. *Circulation*. 2013 Jul 9;128(2):122-31
- Brandao AA, Pozzan R, Freitas EV, Pozzan R, Magalhaes MEC, Brandao AP. Blood pressure and overweight in adolescence and their association with insulin resistance and metabolic syndrome. *J Hypertens*. 2004;22(Suppl. 1):S111.
- Brunner H, Cockcroft JR, Deanfield J, et al. Endothelial function and dysfunction. Part II: Association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertens* 2005; 23(2): 233-46.
- Cai CL, Martin JC, Sun Y, Cui L, Wang L, Ouyang K, et al. A myocardial lineage derives from Tbx18 epicardial cells. *Nature*. 2008 Jul 3;454(7200):104-8.
- Carlson S, Trial J, Soeller C, Entman ML. Cardiac mesenchymal stem cells contribute to scar formation after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2011 Jul 1;91(1):99-107.
- Cesarino CB, Cipullo JP, Martin JFV, Ciorlia LA, Godoy MRP, Cordeiro JA, et al. Prevalência e Fatores Sociodemográficos em Hipertensos de São José do Rio Preto – SP. *Arq Bras Cardiol*. 2008;91(1):31-35.

- Cesena FHY, Chagas ACP. A circulação coronária na hipertensão arterial sistêmica e na insuficiência cardíaca conseqüente. *Rev Bras Hipertens*. 2001;8:431-39.
- Chen YB, Jia QZ, Li DJ, Sun JH, Xi S, Liu LP. Spinal cord injury in rats treated using bone marrow mesenchymal stem-cell transplantation. *Int J Clin Exp Med*. 2015 Jun 15;8(6):9348-54.
- Chong JJ, Chandrakanthan V, Xaymardan M, Asli NS, Li J, Ahmed I, et al. Adult cardiac-resident MSC-like stem cells with a proepicardial origin. *Cell Stem Cell*. 2011 Dec 2;9(6):527-40.
- Cieslik KA, Trial J, Entman ML. Defective myofibroblast formation from mesenchymal stem cells in the aging murine heart rescue by activation of the AMPK pathway. *Am J Pathol*. 2011 Oct;179(4):1792-806.
- Coffman TM. Under pressure: the search for the essential mechanisms of hypertension. *Nature Medicine*. 2011;17(11):1402-1409.
- Dahlöf B, Devereux RB, Kjeldsen SE, Julius S, Beevers G, de Faire U, Fyhrquist F, et al. Cardiovascular morbidity and mortality in the losartan intervention or endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomized trial against atenolol. *Lancet* 2002; 359: 995–1003.
- De Los Angeles A, Ferrari F, Xi R, Fujiwara Y, Benvenisty N, Deng H, Hochedlinger K, et al. Hallmarks of pluripotency. *Nature*. 2015 Sep 24;525(7570):469-78.
- Devereux RB, de Simone G, Ganau A, Roman MJ. Left ventricular hypertrophy and geometric remodeling in hypertension: Stimuli, functional consequences and prognostic implications. *J Hypertens Suppl*. 1994; 12:S117–127.
- Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 2002 May 15;99(10):3838-43.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
- Drazner MH. The progression of hypertensive heart disease. *Circulation*. 2011 Jan 25;123(3):327-34.
- Endermann DH, Schiffrin EL. Endothelial Dysfunction. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15:1983-1992.
- Frazan Jr R, Dias da Silva VJ, Salgado HC. Modelos de hipertensão arterial. *Rev. Bras. Hipertens*. 2001;8:19-29.
- Frohlich ED, Apstein C, Chobanian AV, Devereux RB, Dustan HP, Dzau V, et al. The heart in hypertension. *N Engl J Med*. 1992 Oct 1;327(14):998-1008.
- Fuentes T, Kearns-Jonker M. Endogenous cardiac stem cells for the treatment of heart failure. *Stem Cells Cloning*. 2013 Mar 25;6:1-12.

- Garikipati VN, Jadhav S, Pal L, Prakash P, Dikshit M, Nityanand S. Mesenchymal stem cells from fetal heart attenuate myocardial injury after infarction: an in vivo serial pinhole gated SPECT-CT study in rats. *PLoS One*. 2014 Jun 27;9(6):e100982.
- Georgiopoulou VV, Kalogeropoulos AP, Raggi P, Butler J. Prevention, diagnosis, and treatment of hypertensive heart disease. *Cardiol Clin*. 2010 Nov;28(4):675-91.
- Grossman W, Jones D, McLaurin LP. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest*. 1975; 56:56–64.
- Guo YL, Chakraborty S, Rajan SS, Wang R, Huang F. Effects of oxidative stress on mouse embryonic stem cell proliferation, apoptosis, senescence, and self-renewal. *Stem Cells Dev*. 2010 Sep;19(9):1321-31.
- Guyton AC, Hall JE. *Tratado de Fisiologia Médica*. 12^a edição. Rio de Janeiro, Elsevier, 2011.
- Guyton AC. Blood pressure control—special role of the kidneys and body fluids. *Science*. 1991 Jun 28;252(5014):1813-6
- Guzik TJ, Hoch NE, Brown KA, McCann LA, Rahman A, Dikalov S, et al. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *J Exp Med*. 2007 Oct 1;204(10):2449-60.
- Hamet P, Richard L, Dam TV, Teiger E, Orlov SN, Gaboury L, Gossard F, Tremblay J. Apoptosis in target organs of hypertension. *Hypertension*. 1995 Oct;26(4):642-8.
- Heagerty AM, Aalkjaer C, Bund SJ, Korsgaard N, Mulvany MJ.. Small artery structure in hypertension. Dual processes of remodeling and growth. *Hypertension*. 1993 Apr;21(4):391-7.
- Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med*. 2003 Feb 13;348(7):593-600.
- Hogg K, McMurray J. The treatment of heart failure with preserved ejection fraction (“diastolic heart failure”). *Heart Fail Rev* 2006;11:141-6.
- Hollenberg NK. The influence of dietary sodium on blood pressure. *J Am Coll Nutr*. 2006 Jun;25(3 Suppl):240S-246S.
- Hong KU, Guo Y, Li QH, Cao P, Al-Maqtari T, Vajravelu BN, et al. c-kit⁺ Cardiac stem cells alleviate post-myocardial infarction left ventricular dysfunction despite poor engraftment and negligible retention in the recipient heart. *PLoS One*. 2014 May 7;9(5):e96725.
- Hong KU, Li QH, Guo Y, Patton NS, Moktar A, Bhatnagar A, Bolli R. A highly sensitive and accurate method to quantify absolute numbers of c-kit⁺ cardiac stem cells following transplantation in mice. *Basic Res Cardiol*. 2013 May;108(3):346.
- Hoogduijn MJ, Crop MJ, Peeters AM, Van Osch GJ, Balk AH, Ijzermans JN, et al. Human heart, spleen, and perirenal fat-derived mesenchymal stem cells have immunomodulatory capacities. *Stem Cells Dev*. 2007 Aug;16(4):597-604.
- 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(5):393-5.

Hosoda T, D'Amario D, Cabral-Da-Silva MC, Zheng H, Padin-Iruegas ME, Ogorek B, et al. Clonality of mouse and human cardiomyogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:17169–17174.

Keating A. Mesenchymal stromal cells. *Curr Opin Hematol*. 2006;13:419-425.

Keating A. Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell Stem Cell*. 2012 Jun 14;10(6):709-16.

Keith MC, Bolli R. "String theory" of c-kit(pos) cardiac cells: a new paradigm regarding the nature of these cells that may reconcile apparently discrepant results. *Circ Res*. 2015 Mar 27;116(7):1216-30.

Kelly SJ. Studies of the developmental potential of 4- and 8-cell stage blastomeres. *J. Exp. Zool*. 1977;200:365–376.

Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. 2006 May;24(5):1294-301.

Khan M, Mohsin S, Avitabile D, Siddiqi S, Nguyen J, Wallach K, Quijada P, McGregor M, Gude N, Alvarez R, Tilley DG, Koch WJ, Sussman MA. β -Adrenergic regulation of cardiac progenitor cell death versus survival and proliferation. *Circ Res*. 2013 Feb 1;112(3):476-86.

Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW, Barr S, Fuchs S, et al. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res*. 2004a;94(5):678-85.

Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, Fuchs S, et al. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation*. 2004b;109(12):1543-9.

Krishna GG. Effect of potassium intake on blood pressure. *J Am Soc Nephrol*. 1990 Jul;1(1):43-52.

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

Lawes CM, Vander Hoorn S, Rodgers A. Global burden of blood-pressure-related disease, 2001. *Lancet*. 2008 May 3;371(9623):1513-8.

Laflamme MA, Murry CE. Heart regeneration. *Nature*. 2011;473(7347):326-35.

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

Leite CF, Lopes CS, Alves AC, Fuzaro CS, Silva MV, Oliveira LF. Endogenous resident c-Kit cardiac stem cells increase in mice with an exercise-induced, physiologically hypertrophied heart. *Stem Cell Res*. 2015 Jul;15(1):151-64.

- Leong XF, Ng CY, Jaarin K. Animal Models in Cardiovascular Research: Hypertension and Atherosclerosis. *BioMed Research International*, v. 15, 11p, 2015.
- Leri A, Kajstura J, Anversa P. Role of Cardiac Stem Cells in Cardiac Pathophysiology: A Paradigm Shift in Human Myocardial Biology. *Circ Res*. 2011 Sep 30;109(8):941-61.
- Leri A. Human cardiac stem cells: the heart of a truth. *Circulation*. 2009;120:2515–2518.
- Li L, Zhang Y, Li Y, Yu B, Xu Y, Zhao S, Guan Z. Mesenchymal stem cell transplantation attenuates cardiac fibrosis associated with isoproterenol-induced global heart failure. *Transpl Int*. 2008 Dec;21(12):1181-9.
- McMullen JR, Jennings GL. Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007 Apr;34(4):255-62.
- Madhur MS, Lob HE, McCann LA, Iwakura Y, Blinder Y, Guzik TJ, Harrison DG. Interleukin 17 promotes angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction. *Hypertension*. 2010 Feb;55(2):500-7.
- Martin CM, Meeson AP, Robertson SM, Hawke TJ, Richardson JA, Bates S, et al. Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, *Abcg2*, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart. *Dev Biol*. 2004 Jan 1;265(1):262-75.
- Martinez MC, Latorre MRDO. Fatores de risco para hipertensão arterial e diabete melito em trabalhadores de empresa metalúrgica e siderúrgica. *Arq Bras Cardiol*. 2006;87:471-479.
- Matos-Souza JR, Franchini KG, Nadruz Jr W. Hipertrofia ventricular esquerda: o caminho para a insuficiência cardíaca. *Rev Bras Hipertens*. 2008;15(2):71-74.
- Matsuura K, Honda A, Nagai T, Fukushima N, Iwanaga K, Tokunaga M, et al. Transplantation of cardiac progenitor cells ameliorates cardiac dysfunction after myocardial infarction in mice. *J Clin Invest*. 2009 Aug;119(8):2204-17.
- Matsuura K, Nagai T, Nishigaki N, Oyama T, Nishi J, Wada H, et al. Adult cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes. *J Biol Chem*. 2004;279:11384–11391.
- Meirelles L da S, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009 Oct-Dec;20(5-6):419-27.
- Meirelles LS, Caplan AI, Nardi NB. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2008 Sep;26(9):2287-99.
- Meirelles LS, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*. 2006 Jun 1;119(Pt 11):2204-13.
- Messina E, De Angelis L, Frati G, Morrone S, Chimenti S, Fiordaliso F, et al. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res*. 2004 Oct 29;95(9):911-21.
- Montezano AC, Dulak-Lis M, Tsiropoulou S, Harvey A, Briones AM, Touyz RM. Oxidative stress and human hypertension: vascular mechanisms, biomarkers, and novel therapies. *Can J Cardiol*. 2015 May;31(5):631-41.

Nabha L, Garbern JC, Buller CL, Charpie JR. Vascular oxidative stress precedes high blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens*. 2005 Jan;27(1):71-82.

Nagaya N, Fujii T, Iwase T, Ohgushi H, Itoh T, Uematsu M, Yamagishi M, et al. Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004 Dec;287(6):H2670-6.

Neal B, MacMahon S, Chapman N. Blood Pressure Lowering Trialists' Collaboration. Effects of ACE inhibitors, calcium antagonists and other blood-pressure-lowering drugs: results of prospectively designed overviews of randomized trials. *Lancet*, 2000;356: 1955–1964.

Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussin V, Mishina Y, Pocius J, et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Oct 14;100(21):12313-8.

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

Olafiranye O, Zizi F, Brimah P, Jean-Louis G, Makaryus AN, McFarlane S, Ogedegbe G. Management of Hypertension among Patients with Coronary Heart Disease. *Int J Hypertens*. 2011;2011:653903.

Oliveira CM, Pereira AC, de Andrade M, Soler JM, Krieger JE. Heritability of cardiovascular risk factors in a Brazilian population: Baependi Heart Study. *BMC Med Genet*. 2008 Apr 22;9:32.

Oliveira, LF. Avaliação de células tronco mesenquimais de medula óssea em ratos normotensos Wistar-Kyoto (WKY) e espontaneamente hipertensos (SHR) [dissertação]. Uberaba: Universidade Federal do Triângulo Mineiro; 2010.

Oliveira-Sales EB, Maquigussa E, Semedo P, Pereira LG, Ferreira VM, Câmara NO, et al. Mesenchymal stem cells (MSC) prevented the progression of renovascular hypertension, improved renal function and architecture. *PLoS One*. 2013 Nov 4;8(11):e78464.

Opie LH, Commerford PJ, Gersh BJ, Pfeffer MA. Controversies in ventricular remodelling. *Lancet* 2006;367:356-67.

Organização Mundial da Saúde. Global status report on noncommunicable diseases 2010. Geneva, World Health Organization, 2011.

Owan TE, Hodge DO, Herges RM, Jacobsen SJ, Roger VL, Redfield MM. Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med*. 2006 Jul 20;355(3):251-9.

Patrascu N. Diastolic Heart Failure in Hypertension: Possible Preventive Benefits of Nebivolol Beyond Lowering Blood Pressure. *MAEDICA – a Journal of Clinical Medicine*. 2013; 8(3):285-289.

Pelekanos RA, Li J, Gongora M, Chandrakanthan V, Scown J, Suhaimi N, et al. Comprehensive transcriptome and immunophenotype analysis of renal and cardiac MSC-like populations supports strong congruence with bone marrow MSC despite maintenance of distinct identities. *Stem Cell Res*. 2012 Jan;8(1):58-73.

Pescatello LS, Franklin BA, Fagard R, Farquhar WB, Kelley GA, Ray CA. American College of Sports Medicine position stand: Exercise and hypertension. *Med Sci Sports Exerc.* 2004 Mar;36(3):533-53.

Pluim BM, Zwinderman AH, van der Laarse A, van der Wall EE. The athlete's heart. A meta-analysis of cardiac structure and function. *Circulation.* 2000 Jan 25;101(3):336-44.

Potts JT, Mckeown KP, Shoukas AA. Reduction in arterial compliance alters carotid baroreflex control of cardiac output in a model of hypertension. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology.* 1998;274(4):H1121-H1131.

Psaty BM, Smith NL, Siscovick DS, Koepsell TD, Weiss NS, Heckbert SR, et al. Health outcomes associated with antihypertensive therapies used as firstline agents. A systematic review and meta-analysis. *JAMA.* 1997 Mar 5;277(9):739-45.

Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, Pell CL, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation.* 2004 Mar 16;109(10):1292-8.

Rossini A, Frati C, Lagrasta C, Graiani G, Scopece A, Cavalli S, et al. Human cardiac and bone marrow stromal cells exhibit distinctive properties related to their origin. *Cardiovasc Res.* 2011 Feb 15;89(3):650-60.

Rubiano A, Qi Y, Guzzo D, Rowe K, Pepine C, Simmons C. Stem cell therapy restores viscoelastic properties of myocardium in rat model of hypertension. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2015 Dec 19;59:71-77.

Rüster B, Göttig S, Ludwig RJ, Bistrrian R, Müller S, Seifried E, et al. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood.* 2006 Dec 1;108(12):3938-44.

Sacks FM, Svetkey LP, Vollmer WM, Appel LJ, Bray GA, Harsha D, et al. Effects on blood pressure of reduced dietary sodium and the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) diet. *N Engl J Med.* 2001 Jan 4;344(1):3-10.

Santos M, Shah AM. Alterations in cardiac structure and function in hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 2014 May;16(5):428.

Schwartzkopff B, Motz W, Frenzel H, Vogt M, Knauer S, Strauer BE. Structural and functional alterations of the intramyocardial coronary arterioles in patients with arterial hypertension. *Circulation.* 1993 Sep;88(3):993-1003.

Sharma RR, Pollock K, Hubel A, McKenna D. Mesenchymal stem or stromal cells: a review of clinical applications and manufacturing practices. *Transfusion.* 2014 May;54(5):1418-37.

Silva DN, de Freitas Souza BS, Azevedo CM, Vasconcelos JF, Carvalho RH, Soares MB, et al. Intramyocardial transplantation of cardiac mesenchymal stem cells reduces myocarditis in a model of chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Stem Cell Res Ther.* 2014 Jul 1;5(4):81.

Smith SR, Klotman PE, Svetkey LP. Potassium chloride lowers blood pressure and causes natriuresis in older patients with hypertension. *J Am Soc Nephrol.* 1992 Feb;2(8):1302-9.

Smits AM, van Vliet P, Metz CH, Korfage T, Sluijter JP, Doevendans PA, Goumans MJ. Human cardiomyocyte progenitor cells differentiate into functional mature cardiomyocytes: an

in vitro model for studying human cardiac physiology and pathophysiology *Nat Protoc.* 2009;4(2):232-43.

Sociedade Brasileira de Cardiologia. VI Diretrizes brasileiras de hipertensão. *Arq Bras Cardiol.* 2010;95(1 supl 1):1-51.

Solomon S, Bengel HH. Growth rates and organ weights of rats. *Biol Neonate.* 1973;22(3):222-9.

Takahashi H, Yoshika M, Komiyama Y, Nishimura M. The central mechanism underlying hypertension: a review of the roles of sodium ions, epithelial sodium channels, the reninangiotensin- aldosterone system, oxidative stress and endogenous digitalis in the brain. *Hypertens Res.* 2011 Nov;34(11):1147-60.

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

Teng L, Bennett E, Cai C. Preconditioning c-Kit-positive Human Cardiac Stem Cells with a Nitric Oxide Donor Enhances Cell Survival through Activation of Survival Signaling Pathways. *J Biol Chem.* 2016 Apr 29;291(18):9733-47.

Togel F, Weiss K, Yang Y, Hu Z, Zhang P, Westenfelder C. Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;292(5):F1626-35.

Trippodo NC, Frohlich ED. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat. *Circ. Res.* 1981;48:309-319.

Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, et al. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation.* 2003;75:389-97.

van Berlo JH, Kanisicak O, Maillet M, Vagnozzi RJ, Karch J, Lin SC, et al. c-kit⁺ cells minimally contribute cardiomyocytes to the heart. *Nature.* 2014 May 15;509(7500):337-41.

Verdecchia P, Schillaci G, Borgioni C, Ciucci A, Gattobigio R, Zampi I, et al. Prognostic value of left ventricular mass and geometry in systemic hypertension with left ventricular hypertrophy. *Am J Cardiol.* 1996 Jul 15;78(2):197-202.

Verdecchia P, Angeli F, Achilli P, Castellani C, Broccatelli A, Gattobigio R, et al. Echocardiographic left ventricular hypertrophy in hypertension: marker for future events or mediator of events? *Curr Opin Cardiol* 2007;22:329-34.

Waring CD, Vicinanza C, Papalamprou A, Smith AJ, Purushothaman S, Goldspink DF, Nadal-Ginard B, et al. The adult heart responds to increased workload with physiologic hypertrophy, cardiac stem cell activation, and new myocyte formation. *Eur Heart J.* 2014 Oct 14;35(39):2722-31.

Wang H, Olszewski B, Rosebury W, Wang D, Robertson A, Keiser JA. Impaired angiogenesis in SHR is associated with decreased KDR and MT1-MMP expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Mar 5;315(2):363-368.

- Wang X, Hu Q, Nakamura Y, Lee J, Zhang G, From AH, Zhang J. The role of the sca-1+/CD31-cardiac progenitor cell population in postinfarction left ventricular remodeling. *Stem Cells*. 2006 Jul;24(7):1779-88.
- Weiner RB, Baggish AL. Cardiovascular Adaptation and Remodeling to Rigorous Athletic Training. *Clin Sports Med*. 2015 Jul;34(3):405-18.
- Wu J, Saleh MA, Kirabo A, Itani HA, Montaniel KR, Xiao L, et al. Immune activation caused by vascular oxidation promotes fibrosis and hypertension. *J Clin Invest*. 2016 Jan 4;126(1):50-67.
- Wu Y, Zhang X, Kang X, Li N, Wang R, Hu T, Xiang M, Wang X, Yuan W, Chen A, Meng D, Chen S. Oxidative stress inhibits adhesion and transendothelial migration, and induces apoptosis and senescence of induced pluripotent stem cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2013 Sep;40(9):626-34.
- Yamori Y. Development of the spontaneously hypertensive rat (SHR) and of various spontaneous rat models, and their implications. In: De Jong W (ed.). *Experimental and Genetic Models of Hypertension*. Handbook of Hypertension. Elsevier, 224-39, 1984.
- Yao Y1, Huang J, Geng Y, Qian H, Wang F, Liu X, et al. Paracrine action of mesenchymal stem cells revealed by single cell gene profiling in infarcted murine hearts. *PLoS One*. 2015 Jun 4;10(6):e0129164.
- Ye J, Hom DS, Hwang J, Yeghiazarians Y, Lee RJ, Boyle AJ. Aging Impairs the Proliferative Capacity of Cardiospheres, Cardiac Progenitor Cells and Cardiac Fibroblasts: Implications for Cell Therapy. *J Clin Med*. 2013 Sep 23;2(3):103-14.
- Zaruba MM, Soonpaa M, Reuter S, Field LJ. Cardiomyogenic potential of C-kit(+)-expressing cells derived from neonatal and adult mouse hearts. *Circulation*. 2010 May 11;121(18):1992-2000.
- Zhang Y, Sivakumaran P, Newcomb AE, Hernandez D, Harris N, Khanabdali R, et al. Cardiac Repair With a Novel Population of Mesenchymal Stem Cells Resident in the Human Heart. *Stem Cells*. 2015 Oct;33(10):3100-13.