

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

**AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE
MEDULA ÓSSEA EM RATOS NORMOTENSOS WISTAR-KYOTO
(WKY) E ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS (SHR)**

Aluno: Lucas Felipe de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva

Uberaba, MG, 2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

LUCAS FELIPE DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE
MEDULA ÓSSEA EM RATOS NORMOTENSOS WISTAR-KYOTO
(WKY) E ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS (SHR)**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Curso de Pós-Graduação em Patologia
como parte das exigências para a
obtenção do título de Mestre em
Patologia.**

Orientador: Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva

Abril, 2010

LUCAS FELIPE DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE MEDULA ÓSSEA EM RATOS NORMOTENSOS WISTAR-KYOTO (WKY) E ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS (SHR)

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Patologia. Universidade Federal do Triângulo Mineiro; área de concentração: Patologia Clínica.

Uberaba, 07 de Abril de 2010.

BANCA EXAMINADORA

VALDO JOSÉ DIAS DA SILVA	
Titulação:	Doutor em Fisiologia.
Assinatura:	
Instituição: Disciplina de Fisiologia – UFTM – Uberaba – MG.	

NANCE BEYER NARDI	
Titulação:	Doutora em Imunologia
Assinatura:	
Instituição: Departamento de Genética – UFRGS – Porto Alegre - RS	

DAVID NASCIMENTO SILVA TEIXEIRA	
Titulação:	Doutor em Bioquímica e Imunologia
Assinatura:	
Instituição: Disciplina de Laboratório Clínico – UFTM – Uberaba - MG	

DEDICATÓRIAS

Dedico este trabalho...

Primeiramente a Deus. Fonte de inspiração, ser supremo, agradeço-lhe pelo dom da vida, por me abrir os caminhos até o presente momento. Por toda a proteção e ajuda que me dispensou em todos os momentos acompanhando-me com amor. Que me permitiu sonhar e acima de tudo ousar. Enfim, por ter me permitido mais esta conquista em minha vida!

Dedico esta, bem como todas as minhas demais conquistas, aos meus pais Moacir e Ângela, pela dedicação, incentivo e apoio incondicional, não medindo esforços para a minha educação pessoal e formação profissional. Vocês são os grandes responsáveis pela pessoa e pelo profissional que sou hoje. Obrigado pela minha existência, amo vocês!

Ao meu querido irmão Rafael pelo companheirismo e amizade. Sua honestidade e humildade me servem de inspiração. Pelo simples prazer de tê-lo como irmão.

A minha querida namorada Luciana, por todo amor e carinho a mim dispensados, pela paciência, colaboração, incentivo e acima de tudo pelo companheirismo durante o meu aprimoramento profissional, assumindo assim uma importante participação neste. Por todos os momentos desafiante, de aprendizado e de alegrias. Obrigado amor!

Aos sempre queridos amigos que me ajudaram e aos infortúnios que me desafiaram.

AGRADECIMENTOS

Diante de todas as lembranças acerca deste período de aprendizado, percebo o quanto foram importantes orientador, amigos, colegas de trabalho e funcionários para que este projeto se tornasse viável, uma vez que todo trabalho de mestrado para ser realizado envolve um grande número de pessoas, e a execução deste não ocorreu de forma diferente. Portanto, só tenho que agradecer especialmente àqueles que me apoiaram, me ajudando na concretização deste sonho.

Ao Prof. Valdo José Dias da Silva, pela figura humana e maravilhosa que é, unanimemente reconhecida. Pela capacidade de nos conduzir e despertar à vontade de novas descobertas na vida científica. Por ter a serenidade e disponibilidade de me orientar neste trabalho e também por acreditar na minha capacidade e na minha força de vontade. E também por todas as vezes que não esteve por perto quando precisei porque, de um jeito ou de outro, sua ausência nestes momentos foi meu maior estímulo para buscar, by myself, as informações de que necessitava, o que acabou aumentando a minha capacidade de aprender sozinho. Mas sobretudo agradeço por ter-me apresentado ao universo mágico da ciência!

A todos os professores da pós-graduação que ensinaram com prazer e dedicação e pelas cobranças tão necessários à minha formação.

Aos amigos Marcus Paulo, Igor e Octávio, por todas as conversas, científicas ou não, que com certeza contribuíram e muito para minha formação e para este mestrado.

Aos demais colegas de laboratório pela convivência, paciência, presteza e gargalhadas.

Aos funcionários do laboratório de fisiologia Margareth, Ana Maria (e seus deliciosos pães de queijo), Glauco Finholdt, Marco Aurélio, Donizete Ponciano e Elizabeth Perez pela presteza, paciência e auxílio no convívio diário.

A CAPES pelo apoio financeiro.

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim”.

Chico Xavier.

RESUMO

A hipertensão arterial sistêmica, uma síndrome clínica muito frequente em seres humanos, está associada a um aumento da resistência periférica total (RPT), decorrente de uma intensa vasoconstrição periférica. Outra marcante alteração apresentada tanto por seres humanos hipertensos como por modelos animais de hipertensão, como os ratos espontaneamente hipertensos (SHR), é a rarefação microvascular, definida como uma reduzida densidade espacial de vasos de pequeno calibre, sendo decorrente de destruição vascular e de angiogênese deficiente. Células tronco mesenquimais (MSCs), extraídas principalmente de medula óssea, entre as suas várias funções, parecem possuir uma importante ação angiogênica. Em adição, estas células apresentam uma semelhança funcional muito grande com os pericitos, células perivasculares presentes na camada sub-endotelial dos vasos sanguíneos, e que participam da homeostase da parede vascular. Considerando estes novos aspectos da função das MSCs na biologia vascular e que na hipertensão arterial rarefação microvascular e angiogênese defeituosa são observadas, um possível papel das MSCs na fisiopatogênese da HAS pode ser postulado. Entretanto, para o nosso conhecimento, a fisiologia das MSCs no contexto da hipertensão ainda não foi investigada. Assim sendo, o presente estudo visou avaliar alguns aspectos funcionais destas células no modelo experimental de hipertensão arterial espontânea em ratos SHR. Para tal, foram utilizados ratos normotensos (Wistar-Kyoto-WKY) e ratos espontaneamente hipertensos (“spontaneously hypertensive rats” -SHR) pareados pela idade (entre 16 e 24 semanas). Após a confirmação da diferença de pressão arterial (PA) entre os animais das duas linhagens, as MSCs de medula óssea de cada animal foram extraídas, isoladas e fenotipadas por citometria de fluxo, sendo a seguir realizados ensaios *in vitro* de quantificação de unidades formadoras de colônias de fibroblastos (CFU-F), de proliferação celular, de capacidade de expansão até a senescência e de capacidade de diferenciação em linhagens osteogênica e adipogênica. As células obtidas dos animais

WKY formaram uma média de $4,7 \pm 2,3$ CFU-F a cada 10^6 células plaqueadas no ensaio, enquanto as células dos animais SHR formaram uma média de $4,9 \pm 1,8$ CFU-F a cada 10^6 células plaqueadas no ensaio, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ($p = 0.952$). A análise da taxa de proliferação das MSCs demonstrou uma significativa elevação do número de células com o decorrer do tempo. Em adição, observou-se que a partir do oitavo dia de cultura o número de células de WKY foi maior que o número de células de SHR, indicando uma maior capacidade proliferativa das MSCs dos animais WKY em relação aos animais SHR. A análise da capacidade destas células de duplicar sua população em cultura revelou que as MSCs de SHR sofreram 27 passagens em cultura, enquanto que as MSCs de WKY sofreram 42 passagens em cultura até adquirirem um fenótipo senescente. A análise da capacidade de diferenciação *in vitro* das MSCs foi analisada qualitativa- e quantitativamente, observando-se que a capacidade de diferenciação das MSCs de WKY, tanto em osteoblastos quanto em adipócitos, foi maior que aquela observada após a indução de diferenciação das MSCs de SHR sob as mesmas condições. Os resultados encontrados neste estudo apontam para uma deficiência funcional das MSCs obtidas de medula óssea de ratos SHR em relação àquelas obtidas da medula óssea de ratos WKY. As possíveis causas e as eventuais consequências desta deficiência funcional observada nas MSCs de medula óssea de SHR precisam ser melhor investigadas em estudos futuros.

ABSTRACT

Systemic arterial hypertension (SAH), a clinical syndrome that affects about 15-20% of people around the world, is associated to an increase in total peripheral resistance, due to a marked arteriolar vasoconstriction. Another major alteration presented by hypertensive human beings, as well as animal models of hypertension like spontaneously hypertensive rats (SHR), is the microvascular rarefaction, defined as a lower small caliber vessels spatial density provoked by vascular destruction or defective angiogenesis. Mesenchymal stem cells (MSC), usually extracted from bone marrow, play several physiological roles, including angiogenesis induction. In addition, these cells present functional properties quite similar to the pericytes, peri-vascular cells which play a marked role in vascular biology. Taking into consideration these new aspects of MSC biology and the observation of defective angiogenesis and microvascular rarefaction in hypertensive states, it could be hypothesized that MSCs could participate in the pathogenesis of systemic arterial hypertension. However, to our knowledge, the physiology of MSCs in the SAH context has not been yet investigated. Therefore, the aim of the present study was to evaluate some functional aspects of bone marrow-derived MSCs in SHR comparing with normotensive control Wistar-Kyoto (WKY) rats. We used WKY rats and SHR matched by age (16 - 24 weeks). After confirmation of high arterial blood pressure in SHR and normotension in WKY rats, bone marrow-derived MSCs were obtained, cultured, phenotypically characterized by flow cytometry and then submitted to some functional assays: a) colony-forming unit-fibroblastic (CFU-F) assay, b) proliferation assay, c) doubling-populations *in vitro* assay and d) differentiation assay in osteogenic and adipogenic lineages. MSCs from WKY formed an average of $4,7 \pm 2,3$ CFU-F/ 10^6 plated cells, while the MSCs from SHR formed $4,9 \pm 1,8$ CFU-F/ 10^6 plated cells, without any significant difference ($p=0,952$). MSCs proliferation analysis show a great rise in cells number with the time, and we could observe that during all the time the number of WKY

cells was bigger than the number of SHR cells, indicating a higher proliferation function of MSCs from WKY than these from SHR. According to doubling-population *in vitro* assay, MSC from SHR were doubled 27 times in culture, while MSCs from WKY were doubled 42 times in culture until acquire a senescent phenotype. The osteogenic and adipogenic *in vitro* differentiation assay revealed a lower ability of MSCs from SHR to differentiate in osteogenic and adipogenic lineages when compared to MSCs form WKY rats, under the same culture conditions. The results found in this study showed a functional deficit of bone marrow-derived MSCs from SHR compared to bone marrow-derived MSCs from WKY rats. The possible mechanisms and eventual consequences of this functional deficit of bone marrow-derived MSCs in hypertensive state are not known and deserve intensive future investigation.

SUMÁRIO

<i>RESUMO</i>	09
<i>ABSTRACT</i>	12
<i>SUMÁRIO</i>	15
<i>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS</i>	21
<i>LISTA DE TABELAS</i>	21
<i>LISTA DE FIGURAS</i>	23
<i>1. INTRODUÇÃO</i>	25
<i>2. OBJETIVOS</i>	16
2.1 Objetivo Geral.....	17
2.2 Objetivos Específicos	17
<i>3. MATERIAL e METODOS</i>	18
3.1 Seleção dos animais	19
3.2 Protocolo de isolamento de MSCs.....	19
3.3 Protocolo de replaqueamento de MSCs.....	21
3.4 Protocolo de ensaio de CFU-F.....	21
3.5 Caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo.....	22
3.6 Protocolo de avaliação da capacidade de expansão <i>in vitro</i>	23
3.7 Protocolo de avaliação da proliferação celular	24
3.8 Protocolo de diferenciação celular.....	24
3.8.1 Protocolo de diferenciação osteogênica.....	24
3.8.2 Protocolo de diferenciação adipogênica	25
3.9 Análise Estatística.....	26
<i>4. RESULTADOS</i>	36
<i>5. DISCUSSÃO</i>	36
<i>6. CONCLUSÕES</i>	49

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS51

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATP	Adenosina trifosfato
B7	Molécula co-estimuladora
bFGF	Fator de crescimento fibroblástico básico
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CFU-F	Unidade formadora de colônia semelhantes a fibroblastos
Dahl	Ratos sensíveis à ingestão de sódio
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EPC	Célula progenitora endotelial
ERK	Quinase regulada por sinais extracelulares
FBS	Soro bovino fetal
G-CSF	Fator estimulador de colônia granulocítica
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HGF	Fator de crescimento de hepatócito
HIF-1 α	Fator induzido por hipóxia 1 α
HLA-DR	Antígeno leucocitário humano
hTERT	Telomerase humana
IFN	Interferon
IL	Interleucina
ISCT	International Society of Cellular Therapy
KDR	Receptor de VEGF tipo II
MCH	Complexo de histocompatibilidade principal
MSC	Multipotent mesenchymal stromal cell
NK	<i>Natural killer</i>

NO	Óxido nítrico
NTS	Núcleo do trato solitário
PA	Pressão arterial
PBS-EDTA	Phosphate-buffer-saline with etilen-diamin-tetracetic
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaqueta
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PPAR γ -2	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-2
RPT	Resistência periférica total
SDF-1	Fator derivado do estroma 1
SFlt-1	Receptor 1 de VEGF solúvel
SHR	Spontaneously hypertensive rats
TGF- β	Fator de crescimento transformador β
TLR	Toll-like receptor
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
WKY	Ratos Wistar Kyoto

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores médios de pressão arterial sistólica obtidos através do método de pletismografia de cauda.....	28
Tabela 2 – Valores percentuais de células positivamente marcadas com os marcadores indicados na coluna à esquerda em um exemplar de células tronco mesenquimais extraídas de ratos WKY e SHR.....	30

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Fotografia ilustrativa da visão macroscópica de uma placa de cultura correspondente ao ensaio de CFU-F de um animal WKY. As imagens em azul representam colônias derivadas de células tronco mesenquimais de medula óssea.....22
- Figura 2: Valores médios (\pm epm) das unidades formadoras de colônias semelhantes a fibroblastos correspondentes aos animais da linhagem SHR e WKY.....29
- Figura 3: Valores médios (\pm epm) do número de células encontradas em cada *well* nos diferentes dias do experimento.....31
- Figura 4: Valores das passagens em cultura nas quais as MSCs dos animais SHR e WKY atingiram um fenótipo senescente.....32
- Figura 5: (A) Fotomicrografias das MSCs submetidas à indução de diferenciação em linhagem osteogênica, tanto de WKY (direita) quanto de SHR (esquerda). (B) Quantificação da área relativa ocupada por células diferenciadas em relação à área total do campo microscópico analisado.....34
- Figura 6: (A) Fotomicrografias das MSCs submetidas à indução de diferenciação em linhagem adipogênica, tanto de WKY (direita) quanto de SHR (esquerda). (B) Quantificação da área relativa ocupada por células diferenciadas em relação à área total do campo microscópico analisado.....35

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, grandes avanços têm sido feitos na tecnologia de reconstituição de tecidos lesados através da terapia celular, que se baseia na utilização de células indiferenciadas pluripotentes ou multipotentes, chamadas de células tronco (“stem cells”). Estas células são definidas pelo seu fenótipo indiferenciado e sua elevada capacidade proliferativa, ou seja, são células que possuem a capacidade de diferenciar-se em muitos tipos celulares especializados dos mais variados tecidos do organismo; e também possuem, através de uma divisão celular dita simétrica, a capacidade de auto-renovação, o que permite a manutenção da quantidade de células tronco em um determinado local (Blau e cols., 2001; Donovan e Gearhart, 2001; Strauer e Kornowski, 2003).

As células tronco utilizadas em terapias celulares, tanto em caráter experimental quanto clínico, são classificadas, de acordo com sua capacidade proliferativa e de diferenciação, em células tronco pluripotentes e multipotentes. As células tronco pluripotentes podem, teoricamente, dar origem a qualquer tipo celular no organismo adulto, sendo derivadas de tecidos embrionários, como células do carcinoma embrionário, que são as células tronco dos tumores testiculares; e células tronco embrionárias, que são as células derivadas do maciço celular interno do embrião em fase de blastocisto. As células tronco multipotentes, por sua vez, possuem uma capacidade mais limitada de se diferenciar em diferentes tipos celulares, estando presentes em praticamente todos os tecidos adultos e se diferenciando principalmente em células do tecido no qual estão inseridas, participando do processo de regeneração tissular e homeostase tecidual. As células tronco multipotentes mais bem descritas na literatura incluem as células tronco hematopoiéticas, células tronco mesenquimais e células progenitoras endoteliais, todas presentes na medula óssea; células tronco cardíacas, presentes no coração; células tronco neurais, presentes no sistema nervoso central; células satélites, presentes no músculo esquelético (Blau e cols., 2001; Donovan e Gearhart, 2001).

A cavidade óssea de alguns ossos longos é preenchida por medula óssea e vasos sanguíneos. A medula óssea é a principal fonte de células tronco hematopoiéticas, que são as responsáveis pela renovação das células sanguíneas. Em condições normais, as células hematopoiéticas em desenvolvimento são retidas na medula óssea e, uma vez que completam sua maturação, são liberadas no sistema vascular. Além das células tronco hematopoiéticas, existem na medula óssea outros tipos de células tronco; como as células tronco mesenquimais, presentes em pequenas quantidades na medula óssea, que dão origem às células estromais da medula óssea, incluindo condrócitos, osteoblastos, adipócitos, fibroblastos e células endoteliais (Yin e Li, 2006; Mugurama e cols., 2006).

A primeira evidência concreta de que células precursoras mesenquimais não-hematopoiéticas estavam presentes na medula óssea surgiu através de trabalhos de Friedenstein na década de 1970, que descreveu uma população de células presentes na medula óssea caracterizadas pelo seu formato fusiforme, pela sua aderência à superfície plástica e pela formação de colônias de células semelhantes a fibroblastos, chamadas de unidades formadoras de colônias de fibroblastos (CFU-F), as quais possuíam a capacidade de formar células que produziam pequenos depósitos de osso e cartilagem. Nos anos seguintes, vários estudos demonstraram que as células isoladas pelo método de Friedenstein eram multipotentes e podiam se diferenciar em osteoblastos, condroblastos, adipócitos e mesmo em mioblastos (Friedenstein, 1970; Prockop, 1997; Nardi e Meirelles, 2006).

As células tronco mesenquimais, também chamadas de células estromais de medula óssea, ou ainda de células estromais mesenquimais multipotentes, são designadas pelo acrônimo MSC. De acordo com a International Society for Cellular Therapy, para se definir uma célula como sendo uma célula tronco mesenquimal é necessário que esta célula possua a propriedade de aderência ao plástico sob condições de cultura padrão, a

capacidade de se diferenciar *in vitro* em osteoblastos, adipócitos e condroblastos; expresse os marcadores de superfície CD105, CD73 e CD90; e não expresse os marcadores de superfície CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 ou CD19, e HLA-DR (Keating, 2006; Horwitz, 2005).

Embora as MSCs sejam muito estudadas, a natureza exata, a localização, bem como a função *in vivo* destas células ainda é pouco entendida, uma vez que estas células não possuem um marcador específico que permita sua identificação *in vivo*, e sua separação específica (Meirelles e cols., 2006). Os principais tipos celulares diferenciados a partir de MSCs, osteoblastos, condrócitos e adipócitos, estão presentes no organismo inteiro (Meirelles e cols., 2008). Diante disto, Meirelles e cols. (2006) analisaram a distribuição *in vivo* de MSCs murinas através do estabelecimento de cultura de longo prazo e da caracterização funcional de MSCs obtidas a partir de diferentes tecidos e órgãos, como cérebro, baço, fígado, rim, pulmão, medula óssea, músculo, timo, pâncreas, artéria aorta, veia cava e glomérulo renal. Estes autores observaram que a partir de todos os locais investigados, exceto o sangue circulante, foi possível se estabelecer uma cultura de MSC de longo prazo, e as células obtidas apresentavam morfologia similar, marcadores de superfície similares, capacidade de auto-renovação prolongada e de diferenciação em linhagens mesenquimais, como osteogênica e adipogênica, embora os ensaios de diferenciação tenham mostrado variações entre as culturas quanto à frequência de células que realmente se diferenciaram e quanto ao grau de diferenciação, o que pode ser devido à influência do ambiente local do qual as células se originaram, refletindo assim a importância do nicho na determinação do fenótipo das células tronco que interagem com ele (Meirelles e cols., 2006). Além disso, estas células também já foram descritas no tecido adiposo (Zuk e cols., 2001), placenta (In 't Anker e cols., 2004), tecidos fetais (In 't Anker e cols., 2003b), e muitos outros. Dada a sua localização ubíqua junto a vasos sanguíneos e

seu perfil fenotípico, uma hipótese recente postula que as MSCs estão situadas em todo o organismo acopladas à parede vascular, na camada sub-endotelial, na forma de pericitos, funcionando para estabilizar os vasos sanguíneos e contribuindo para a homeostase tecidual, o que explicaria o isolamento de MSCs a partir de diferentes tecidos (Meirelles e cols., 2008)

Os pericitos, também chamados de células periendothelias ou células de Rouget, se localizam imediatamente abaixo na membrana basal endotelial dos vasos sanguíneos, intimamente acoplados às células endoteliais (Hirschi e D'Amore; 1996). Em alguns órgãos, estas células podem receber denominações específicas, como as células mesangiais encontradas nos glomérulos renais (Schlondorff, 1987). Os pericitos e as células endoteliais vasculares exibem uma relação interdependente na qual fatores solúveis e interações físicas contribuem sinergicamente para a formação, estrutura e manutenção do vaso sanguíneo (Armulik e cols., 2005). Para ser considerado um pericito, uma célula deve estabelecer contato físico com células endoteliais por meio de junções gap, expressar no mínimo um marcador celular atribuído aos pericitos, e não expressar marcadores celulares pan-endoteliais. Se um pericito deixa o contato físico com a célula endotelial e é liberado na corrente sanguínea, acredita-se que ele possa ser considerado uma MSC (Meirelles e cols., 2008). Vários estudos têm demonstrado semelhanças entre os pericitos e as MSCs, incluindo a capacidade dos pericitos de se diferenciar em tipos celulares mesenquimais, como adipócitos (Richardson e cols., 1982), condrócitos (Diaz-Flores e cols., 1991) e osteoblastos (Diaz-Flores e cols., 1992); e a expressão de marcadores fenotípicos comuns. Diante disto, tem sido postulado que os pericitos representem MSCs, as quais se localizariam por todo o organismo associadas aos vasos sanguíneos. Frente a uma lesão vascular ou de tecidos adjacentes, a MSC ou pericito seria estimulado, proliferando-se e secretando fatores bioativos que funcionariam para proteger, reparar ou regenerar o tecido

lesado (Meirelles e cols., 2008). Esta idéia é reforçada pelo fato de que vários estudos têm estabelecido culturas convencionais de MSC a partir de paredes de artérias e veias (Abedin e cols., 2004; Meirelles e cols., 2006).

A capacidade das MSCs trafegar no sangue circulante sob condições fisiológicas é controverso, havendo estudos indicando a presença destas células naturalmente na circulação periférica, embora em baixas quantidades (Kuznetsov e cols., 2001). Porém, o protocolo utilizado é crítico, uma vez que a punção da parede do vaso, necessária para acessar a circulação sanguínea, poderia liberar pequenas quantidades de pericitos ou outras células do tecido conectivo vascular para dentro da circulação. Meirelles e cols. (2006) não conseguiram obter MSCs a partir do sangue circulante obtido a partir da veia porta, em um procedimento que reduziu a probabilidade de contaminação da amostra de sangue com pericitos ou outras células do tecido conectivo vascular (Meirelles e cols., 2006). Por outro lado, existem vários relatos na literatura indicando a mobilização de MSCs no sangue circulante e recrutamento destas células mediante estímulos específicos, como lesão tecidual (Wang e cols., 2008), citocinas como o fator estimulador de colônias granulocíticas (G-CSF) (Tondreau e cols., 2005), substância P (Hong e cols., 2009) e hipóxia (Rocheffort e cols., 2006). Além disso, alguns tipos de tumor também induzem a mobilização e o recrutamento destas células para o local afetado (Fernandez e cols., 1997). Isto é reforçado pelo fato de MSCs injetadas sistemicamente possuírem uma capacidade intrínseca de se alojar nos sítios de lesão tecidual (Nagaya e cols., 2004).

As MSCs mais estudadas são aquelas derivadas da medula óssea, local em que o microambiente ao qual estas células são expostas é caracterizado por uma baixa tensão de oxigênio (2 – 7% O₂). Por essa razão, as MSCs possuem uma marcante flexibilidade metabólica, uma vez que conseguem produzir ATP por metabolismo anaeróbio e manter sua capacidade de se diferenciar em condrócitos e adipócitos, ou seja, conseguem manter

seu fenótipo multipotente, sob condições de hipóxia ou isquemia (Mylotte e cols., 2008). Tipicamente, o cultivo *ex vivo* destas células é realizado sob condições ambientes, ou seja, em condições de normóxia (21% O₂), diferente do microambiente da medula óssea. Quando se cultiva MSCs derivadas de medula óssea sob condições de hipóxia, ocorre a estimulação de uma via de sinalização intracelular associada à sobrevivência celular, a qual envolve a ativação de uma proteína quina denominada Akt, a qual mantém a viabilidade celular, a taxa de proliferação e aumenta a taxa de migração e a atividade restauradora de fluxo sanguíneo em modelo de isquemia de pata traseira em camundongos. Estas modificações parecem envolver a sinalização do fator de crescimento de hepatócito (Rosová e cols., 2008).

As MSCs são consideradas hipoinmunogênicas por expressarem baixos níveis de moléculas de MHC classe I e não expressarem moléculas de MHC classe II, nem moléculas co-estimulatórias (Keating e cols., 1984), embora Le Blanc e cols. (2003) tenham demonstrado que as moléculas de MHC classe II estão presentes no meio intracelular, e sua expressão na superfície da célula pode ser induzida por IFN- γ (Le Blanck, 2003). Um número cada vez maior de evidências vem demonstrando que as MSCs possuem a capacidade de modular o sistema imunológico, podendo exercer funções imunomodulatórias importantes para a manutenção de tolerância periférica, tolerância a transplantes, auto-imunidade, evasão tumoral e tolerância materno-fetal (Nauta e Fibbe, 2007). Os efeitos imunomodulatórios das MSCs têm sido estudados em uma variedade de modelos animais relacionados à imunidade a aloenxertos (Yanez e cols., 2006), auto-imunidade (Zappia e cols., 2005) e imunidade aos tumores (Djouad e cols., 2003), bem como em alguns ensaios clínicos de terapia celular utilizando estas MSCs (Lazarus e cols., 2005; Koc e cols., 2000).

As propriedades imunomodulatórias das MSCs podem refletir um significado funcional destas células dentro do organismo, embora a real importância destas propriedades para a manutenção da homeostase imune ainda permaneça pouco compreendida. Meirelles e cols. (2008) propuseram que as MSCs são importantes na manutenção de auto-tolerância, dada a sua vasta distribuição periférica gerada pela íntima associação com os vasos sanguíneos e suas propriedades imunomodulatórias (Meirelles e cols., 2008). Alguns estudos que reforçam esta idéia indicam que as MSCs de alguns pacientes portadores de doenças auto-imunes apresentam-se afetadas quanto à sua capacidade proliferativa, de diferenciação (Del Papa e cols., 2006) e quanto à sua capacidade de inibir a proliferação e secreção de citocinas pelos linfócitos T (Bacigalupo e cols., 2005). Além disso, o fato de as MSCs humanas serem isoladas com sucesso a partir de fontes fetais, como fluído amniótico (In 't Anker e cols., 2003a), sangue fetal (In 't Anker e cols., 2003b), sangue do cordão umbilical (Bieback e cols., 2004), dentre outros, pode indicar um envolvimento das MSCs na tolerância fetal, o que é reforçado pela demonstração de que os mecanismos que contribuem para a tolerância fetal em úteros gravídicos são muito semelhantes aos efeitos imunossupressores das MSCs (Barry e cols., 2005).

As MSCs são capazes de influenciar a função de outras células através de interação direta célula-célula, e principalmente através da liberação de um amplo espectro de fatores bioativos, os quais são secretados sob influência das propriedades intrínsecas das MSCs e também do microambiente no qual elas se encontram (Kamihata e cols., 2001). Vários relatos na literatura indicam que MSCs transplantadas exercem seus efeitos terapêuticos principalmente através de secreção de fatores bioativos, caracterizando uma ação parácrina destas células. Tais fatores bioativos possuem propriedades anti-apoptóticas, anti-fibróticas e angiogênicas, contribuindo para limitar a extensão do tecido danificado e restabelecer o

suprimento sanguíneo na região (Gnecchi e cols, 2005; Kinnaird e cols., 2004a; Kinnaird, 2004b). Além destes efeitos tróficos, as MSCs também podem secretar moléculas quimioatraentes, como a proteína quimioatraente de monócito – 1, que recruta monócitos circulantes nos tecidos lesionados, onde eles podem se diferenciar em células endoteliais (Fujiyama e cols., 2003; Kinnaird e cols., 2004a;) e estimular a neovascularização tecidual.

O efeito pró-angiogênico das MSCs têm sido confirmado por uma série de estudos, que indicam principalmente uma elevada capacidade destas células de secretar os mais variados tipos de fatores bioativos envolvidos no processo de formação de novos vasos, especialmente o processo de angiogênese. MSCs injetadas localmente em um modelo de isquemia de pata traseira são capazes de promover um aumento na perfusão colateral, e este efeito é mediado essencialmente por mecanismos parácrinos, ao invés de incorporação celular (Kinnaird, 2004a). As MSCs secretam um amplo espectro de citocinas, que estimulam, *in vitro*, a proliferação e a diferenciação de células endoteliais e de células musculares lisas. Algumas destes fatores incluem fator derivado de célula estromal-1 (SDF-1), fator de crescimento básico de fibroblasto (bFGF), fator 1 α induzido por hipóxia (HIF-1 α), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), angiopoietina-1, proteína quimioatraente de monócito-1, interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), fator de crescimento placentário, dentre outros (Kinnaird e cols.; 2004b). Além disso, alguns estudos também evidenciam uma capacidade das MSCs de se diferenciarem em linhagens de células endoteliais (Oswald e cols., 2004) e células musculares, tanto lisas (Galmiche e cols., 1993) quanto estriadas cardíacas (Makino e cols., 1999; Toma, 2002).

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma síndrome clínica caracterizada por níveis de pressão sanguínea sistólica iguais ou superiores a 140 mmHg ou níveis de pressão sanguínea diastólica iguais ou superiores a 90 mmHg, afetando cerca de 15-20% da população mundial. A HAS é dividida em hipertensão essencial, que corresponde a

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

Embora inicialmente assintomática, esta síndrome está associada a diversas alterações em órgãos alvos, tais como coração, rins, cérebro, vasos sanguíneos, retina, etc., com profundo impacto na morbi-mortalidade dos indivíduos, sendo considerada um dos maiores problemas de saúde pública no mundo ocidental e um dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, tais como infarto do miocárdio, acidente vascular encefálico, dentre outros (World Health Organization, 1999).

Apesar dos grandes avanços relacionados ao entendimento das bases fisiopatológicas desta síndrome e do imenso arsenal terapêutico altamente efetivo para o tratamento de HAS, muito ainda falta por ser investigado a fim de se entender completamente os mecanismos patogênicos da hipertensão arterial, sabidamente de origem multifatorial (World Health Organization, 1999).

A pressão arterial sistêmica é determinada, em última análise, pelo débito cardíaco e pela resistência vascular periférica, sendo que um grande número de mecanismos fisiológicos que atuam modulando estes parâmetros estão envolvidos na manutenção da pressão sanguínea em níveis normais. Uma falha em algum destes mecanismos pode, pelo menos em parte, desencadear um quadro hipertensivo. Sendo assim, é provável que vários fatores contribuam para a elevação dos níveis pressóricos em pacientes hipertensos, caracterizando a natureza multi-fatorial da HAS. O papel relativo de cada um destes fatores pode diferir entre os diferentes indivíduos hipertensos. Alguns dos fatores mais estudados são o sistema renina-angiotensina, sistema nervoso autonômico simpático, função endotelial, dentre outros (Beevers e cols., 2001).

Embora influências do estilo de vida, como ingestão de sódio, alcoolismo, elevado índice de massa corporal, sedentarismo, tabagismo, dentre outros, sejam conhecidos por desencadear elevações na pressão arterial; estudos genéticos têm demonstrado um importante componente hereditário na HAS (Havlik e cols., 1979), sendo esta atualmente considerada poligênica, ou seja, resultante do acúmulo e/ou combinação de alterações em vários genes distintos (Binder, 2007). Sabe-se ainda muito pouco acerca de quantos e quais alelos contribuem para o fenótipo de elevada pressão arterial, bem como da maneira pela qual os vários genes podem influenciar a pressão sanguínea; e alguns estudos realizados no sentido de identificar regiões específicas do DNA relacionadas ao fenótipo hipertensivo têm identificado alguns polimorfismos de base única (SNP) que podem estar envolvidos com o fenótipo hipertensivo (Levy e cols., 2009; Newton-Cheh e cols., 2009).

Modelos experimentais envolvendo doenças que afetam o funcionamento normal do sistema cárdio-circulatório são comumente utilizados em estudos de fisiologia cardiovascular. Existe uma busca contínua por um modelo experimental que possa melhor simular a hipertensão arterial essencial, uma doença muito frequente em seres humanos. Atualmente, é grande a diversidade de modelos de estudo experimentais para HAS, os quais têm fornecido importante contribuição para o entendimento dos mecanismos envolvidos na elevação da pressão arterial (PA) e também para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes no controle dos níveis tensionais elevados. Dentre os modelos experimentais mais utilizados para se estudar a hipertensão arterial destacam-se modelos de hipertensão genética, como ratos com hipertensão espontânea (SHR) e ratos sensíveis à ingestão de sódio (Dahl); de hipertensão neurogênica, como modelos de lesão do núcleo do trato solitário (NTS); de hipertensão renal, como hipertensão renovascular; modelos induzidos pela constrição da aorta abdominal; e modelos induzidos pelo bloqueio farmacológico da síntese de óxido nítrico (Fazan Jr. e cols., 2001).

O modelo de hipertensão arterial espontânea em ratos (ratos espontaneamente hipertensos - SHR) merece destaque por se tratar de um excelente modelo para o estudo da hipertensão essencial, dada a similaridade de sua patogenia com a HAS humana. Porém, há de se considerar que é improvável que as duas formas de hipertensão, no homem e no rato, sejam a expressão de uma mesma doença hipertensiva determinada geneticamente, sendo que ambas têm origem poligênica e são influenciadas por diversos fatores ambientais; e, uma vez que o controle cardio-circulatório é multifatorial, certos mecanismos pressores podem não se expressar, necessariamente, em ambas as situações (Trippodo e Frohlich, 1981).

O modelo de SHR foi desenvolvido originalmente na Universidade de Kyoto, no Japão, através de endo-cruzamentos seletivos de ratos da linhagem Wistar que produziram ratos cuja pressão arterial apresentava uma marcante elevação espontânea no decorrer da vida do animal (Okamoto e Aoki, 1963). Animais desta linhagem começam a desenvolver hipertensão arterial com aproximadamente 05 semanas de vida, apresentando níveis tensionais considerados hipertensivos entre a 7ª e a 15ª semanas, e atingindo um platô por volta da 20ª até a 28ª semanas. A partir desta idade a hipertensão se estabiliza até aproximadamente 1 a 1,5 anos de idade, quando os animais começam a desenvolver um quadro de insuficiência cardíaca congestiva, a qual está associada com uma elevada taxa de mortalidade. Fatores ambientais, tais como ingestão exagerada de sódio, estresse, alterações sociais, alterações no ciclo claro-escuro, podem afetar o desenvolvimento da hipertensão (Yamori, 1994).

A hipertensão arterial do SHR adulto está associada a alterações nos parâmetros cardiovasculares determinantes da pressão arterial sistêmica, como aumento da resistência periférica total (RPT) acompanhada de débito cardíaco normal ou mesmo reduzido (Potts e cols., 1998). Com o desenvolvimento da hipertensão arterial, o SHR desenvolve uma

progressiva hipertrofia cardíaca, a qual acaba progredindo, com o avançar da idade do animal, para uma insuficiência cardíaca, situação que promove uma marcada redução do débito cardíaco (Thomas e cols., 1997). A elevação da resistência periférica total se dá principalmente em decorrência da marcada hiperatividade autonômica simpática presente no SHR, que se constitui em uma das características mais marcantes deste modelo experimental de HAS (Fazan e cols., 2001).

Outra marcante alteração apresentada pelos animais da linhagem SHR é a rarefação microvascular, definida como uma reduzida densidade espacial de vasos de pequeno calibre, como arteríolas e capilares (Le Noble e cols., 1998), em vários tecidos, incluindo músculo esquelético (Le Noble e cols., 1990), intestino (Henrich e cols., 1978), pele (Haack e cols., 1980), e coração (Sabri e cols., 1998), embora não no cérebro (Lin e cols., 1990); sendo que esta condição é detectada em animais SHR ainda muito jovens (Le Noble e cols., 1990). A reduzida densidade capilar miocárdica possivelmente reflete uma incapacidade do crescimento microcirculatório, através de angiogênese, para acompanhar a hipertrofia cardíaca decorrente do aumento da pressão arterial nestes animais (Feihl e cols., 2006).

Ainda não está muito bem estabelecido se a rarefação microvascular está relacionada à causa ou é uma consequência da hipertensão arterial sistêmica, uma vez que existem estudos mostrando que esta condição é um defeito primário que ocorre na hipertensão essencial (Le Noble e cols., 1990), enquanto outros estudos demonstram o surgimento de rarefação microvascular em modelos de hipertensão secundária (Sabri e cols., 1998). A densidade microvascular pode diminuir em decorrência de destruição vascular, a qual ocorre, pelo menos em parte, devido à apoptose de células endoteliais causada pelo estresse oxidativo aumentado (Kobayashi e cols., 2005), e também em decorrência de angiogênese deficiente. A angiogênese deficiente na hipertensão parece

decorrer de um defeito no desenvolvimento vascular normal do organismo, condição em que o crescimento dos vasos sanguíneos não consegue acompanhar o crescimento dos órgãos e tecidos, uma vez que uma marcante rarefação microvascular pode ser encontrada em animais jovens com hipertensão genética, como o SHR (Le Noble e cols., 1990), e também em seres humanos normotensos com predisposição genética familiar para a HAS (Noon e cols., 1997). Além disso, a biodisponibilidade reduzida de óxido nítrico (NO) observada na HAS tem papel importante na sua patogênese, não apenas por reduzir o efeito vasodilatador direto do NO, mas também porque o NO estimula a expressão de fatores de crescimento vascular, notavelmente o VEGF (Dulak e cols., 2000), um importante fator angiogênico que promove sobrevivência, proliferação e migração de células endoteliais, de forma que em modelos de hipertensão experimental induzida por inibição farmacológica crônica da síntese de NO observa-se angiogênese deficiente (Kiefer e cols., 2002). Paradoxalmente, pacientes com hipertensão essencial e sem insuficiência cardíaca apresentam elevados níveis de VEGF circulantes e baixas concentrações de seu inibidor receptor-1 de VEGF solúvel (SFlt-1), o que pode representar uma resposta compensatória à angiogênese deficiente (Belgore e cols., 2001); embora exista também a associação da angiogênese prejudicada em animais SHR a uma baixa expressão do receptor de VEGF tipo II (KDR) (Wang e cols., 2004).

Outro importante aspecto relacionado à angiogênese deficiente observada na HAS e em modelos experimentais de hipertensão genética, como o SHR, diz respeito às células progenitoras endoteliais (EPCs), as quais são originárias principalmente da medula óssea. Estas células, descritas em 1997 (Asahara e cols., 1997), são recrutadas e contribuem para a formação de microvasos em tecidos isquêmicos, tumorais e inflamados. Especificamente na HAS, estudos demonstraram uma acelerada senescência das EPCs em animais e seres humanos hipertensos (Imanishi e cols., 2005), e o bloqueio farmacológico do sistema

renina-angiotensina induziu um aumento no número de EPCs circulantes em pacientes (Bahlmann e cols., 2005).

Assim como as EPCs, as MSCs também possuem uma importante ação neoangiogênica, confirmada por uma série de estudos que indicam principalmente uma elevada capacidade destas células de secretar os mais variados tipos de fatores bioativos envolvidos no processo de formação de novos vasos, especialmente pelo processo de angiogênese. Além disso, postula-se que os pericitos representem MSCs, as quais se localizariam por todo o organismo associadas aos vasos sanguíneos e, diante de uma lesão vascular ou de tecidos adjacentes, as MSCs seriam liberadas, proliferando e secretando fatores bioativos que funcionariam para proteger, reparar ou regenerar o tecido lesado (Meirelles e cols., 2008). Como os pericitos e as células endoteliais vasculares exibem uma relação interdependente na qual fatores solúveis e interações físicas contribuem sinergicamente para a formação, estrutura e manutenção do vaso sanguíneo (Armulik e cols., 2005), é possível que as MSCs possuam uma ação modulatória sobre a função endotelial. Todas estas idéias reforçam um possível papel das MSCs na fisiopatogênese da HAS, principalmente atuando sobre a resistência vascular periférica, seja interferindo na formação de novos microvasos, seja modulando a função endotelial.

Alguns estudos envolvendo a aplicação terapêutica de MSCs em modelos de hipertensão genética, mais especificamente o SHR, demonstraram que, em modelos experimentais de infarto agudo do miocárdio associados a hipertensão, a infusão destas células, tanto sistemicamente quanto *in situ*, foi capaz de promover melhoras na fração de ejeção ventricular esquerda, de reduzir o *score* de lesão tecidual, de aumentar a densidade capilar e, por fim, de reduzir a taxa de mortalidade destes animais (Braga e cols., 2008a; Braga e cols., 2008b).

A fisiologia das MSCs no contexto da hipertensão ainda não foi investigado, e o presente estudo visa caracterizar algumas propriedades funcionais destas células no modelo experimental de hipertensão arterial espontânea no rato SHR.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar algumas características funcionais das células tronco mesenquimais de medula óssea de animais normotensos (WKY) e hipertensos (SHR).

2.2 Objetivos Específicos

Comparar as células tronco mesenquimais de animais normotensos (WKY) e hipertensos (SHR) em quanto à:

- ❖ Capacidade de formação de colônias semelhantes a fibroblastos (CFU-F);
- ❖ Capacidade de proliferação celular;
- ❖ Capacidade de expansão *in vitro* até a senescência.
- ❖ Capacidade de diferenciação celular em linhagem osteoblástica
- ❖ Capacidade de diferenciação celular em linhagem adipogênica.

3. MATERIAL e METODOS

3.1 Seleção dos animais

Foram utilizados cinco ratos normotensos (Wistar-Kyoto-WKY) e cinco ratos espontaneamente hipertensos (“spontaneously hypertensive rats” -SHR), pareados pela idade, entre 16 e 24 semanas.

Todos os animais foram fornecidos pelo biotério da Disciplina de Fisiologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Os animais foram mantidos em condições estáveis em biotério, onde tiveram livre acesso à água e ração. Todos os procedimentos experimentais empregados neste projeto estiveram de acordo com o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* publicado pelo the US National Institutes of Health (NIH publication No. 85-23, revised 1996). Os protocolo experimental de manuseio dos animais e coleta dos ossos longos para extração de medula foram aprovados pelo Comitê de ética no Uso de Animais (CEUA), protocolo no. 42.

Todos os animais utilizados foram submetidos a um registro de pressão arterial pelo método de pletismografia de cauda, empregando-se o monitor de pressão arterial indireta da artéria caudal, modelo LE5000 (Letica Scientific Instruments, Barcelona, Espanha), o qual permite medir de forma indireta a pressão arterial sistólica dos animais. Somente ratos WKY com pressão arterial sistólica menor que 140 mmHg e ratos SHR com pressão arterial sistólica maior que 180 mmHg foram utilizados no presente estudo.

3.2 Protocolo de isolamento de células tronco mesenquimais

As MSCs não possuem marcadores de superfície celular específicos que possam ser utilizados para separar essa população específica de células, e por essa razão a metodologia mais amplamente utilizada para isolar MSCs se baseia na capacidade destas células de

aderir à superfícies plásticas (Friedenstein, 1970; Makino e cols., 1999). Baseando-se no protocolo descrito por Neuhuber e cols. (2008) com algumas alterações, o protocolo de extração e isolamento das MSCs a partir de ratos das linhagens SHR e WKY consistiu em anestesia dos animais em câmara embebida com éter, extração de fêmur, tíbia e úmero; eluição da medula óssea e processamento celular.

Os ossos (fêmur, tíbia e úmero) retirados dos animais foram embebidos em PBS-EDTA (pH = 7,2) e resfriados até seu posterior processamento. Utilizando-se uma capela de fluxo laminar tipo 2-A, removeu-se as epífises ósseas, colocou-se as metáfises dentro de um tubo hematológico plástico apresentando um orifício na extremidade inferior, introduziu-se este conjunto em um tubo falcon de 15mL, e centrifugou-se por 3 minutos a 400g. A medula óssea obtida foi então ressuspensa em PBS-EDTA (pH = 7,2) e filtrada em filtros Milipore de 70µm. O filtrado foi colocado sobre uma camada de Ficoll e submetido a 40 minutos de centrifugação a 400g, de modo a obter-se uma fração isolada de células mononucleares de medula óssea, a qual foi submetida a lavagens com PBS-EDTA seguidas de centrifugação a 200g por 10 minutos, ressuspensa em Meio de Dulbeco Modificado (DMEM) contendo 10 % de soro bovino fetal (FBS) e penicilina/estreptomicina (1%), e plaqueadas em frascos de cultura de 75 cm² na densidade aproximada de 400.000 células/ cm². Os frascos de cultura foram então colocados em uma estufa a 37°C contendo 5%CO₂.

Cerca de 72 horas após o plaqueamento, foi realizado a troca do meio de cultura, desprezando-se as células que não aderiram à superfície plástica das garrafas de cultura. A troca do meio de cultura das células foi realizada a cada 3-4 dias.

As células obtidas a partir do isolamento e plaqueadas foram consideradas P0, e a cada replaqueamento as células avançavam uma passagem, prosseguindo para P1, depois

para P2 e assim sucessivamente. Todos os procedimentos realizados utilizaram MSCs entre a 1^a e a 6^a passagens.

3.3 Protocolo de replaqueamento de células tronco mesenquimais

Os frascos de cultura cujas MSCs atingiam uma confluência de 80-90% foram submetidos ao replaqueamento.

O replaqueamento consistiu de remoção do meio de cultura, lavagem da superfície celular do frasco 02 vezes com PBS-EDTA (pH = 7.2), aplicação de tripsina-EDTA 0.25% (GIBCO), na proporção de 0,02mL/cm², por 03 minutos, neutralização com 03 vezes o volume de tripsina-EDTA com meio de cultura (DMEM acrescido de 10% FBS e 1% penicilina/estreptomicina). A seguir, as células obtidas foram centrifugadas a 200g por 10 minutos; ressuspensas em meio de cultura e novamente centrifugadas a 200g por 10 minutos. Por fim, as células eram novamente replaqueadas na densidade aproximada de 20000 células/cm², e os frascos de cultura eram colocados na estufa.

3.4 Ensaio de quantificação de Unidades Formadoras de Colônia semelhante a Fibroblastos (CFU-F)

O protocolo de ensaio de quantificação de CFU-F consistiu no plaqueamento das células mononucleares de medula óssea, logo após o seu isolamento, em placas de Petri de 27,5cm², numa densidade aproximada de 30000-40000 células/cm². Para cada animal, foram utilizadas 05 placas de Petri.

O meio de cultura das células foi trocado no 3^o e no 8^o dias após o plaqueamento. No 13^o dia após o plaqueamento, o meio de cultura foi removido, as células foram fixadas

e coradas com corante GIEMSA diluído em metanol P.A., e as colônias contendo 05 ou mais células com formato semelhante a fibroblastos ao microscópio de contraste de fase foram contadas como uma unidade formadora de colônia de fibroblasto (CFU-F). A figura 1 abaixo mostra uma placa de cultura com colônias de medula óssea coradas por GIEMSA de um rato WKY.

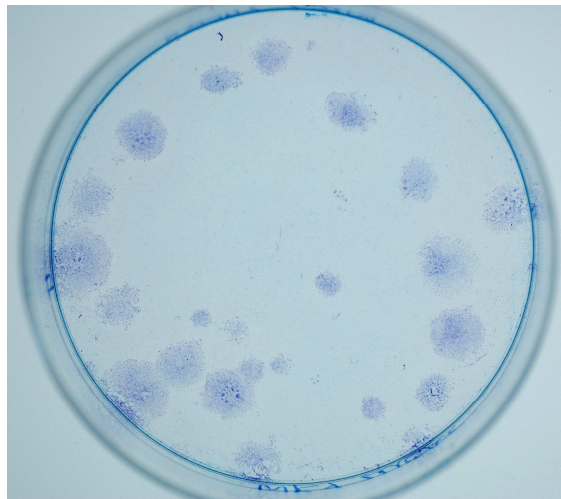


Figura 1: Fotografia ilustrativa da visão macroscópica de uma placa de cultura correspondente ao ensaio de CFU-F de um animal WKY. As imagens em azul representam colônias derivadas de células tronco mesenquimais de medula óssea.

3.5 Caracterização imunofenotípica das MSCs por citometria de fluxo

Após a extração das MSCs das garrafas de cultura na passagem 4, o “pool” de células foi submetido a centrifugação refrigerada (4°C) por 5 minutos com rotação de 200G. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, o pellet homogeneizado e suspenso em 5ml de PBS-SBF (PBS + soro bovino fetal a 1%). O material foi então centrifugado a 350G por 5 minutos e, após essa lavagem, o sobrenadante foi novamente descartado e o “pellet”, homogeneizado em outros 5ml de PBS-SBF. A seguir, as células nucleadas remanescentes foram quantificadas usando um microscópio de luz e um hemocítmetro. Após a contagem, o pool de células foi submetido a concentração ou diluição em PBS-

SBF-1% para se obter uma concentração celular igual a 20.000 células para cada microlitro.

O “pool” de células foi então submetido à marcação com anticorpos monoclonais anti-CD11b, anti-CD29, anti-CD31, anti-CD34, anti-CD45, anti-cKit (BD-Biosciences Inc., San Jose, CA, e Biosciences, San Diego, CA, USA), conjugados a isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou ficoeritrina (PE), os quais reagem com antígenos homólogos de rato. Para cada linhagem de MSCs avaliada, nove tubos de citometria foram preparados, seis para receber os anticorpos acima descritos, dois para receber os anticorpos isotipos controles e um para funcionar como “branco” da reação. Todos os tubos receberam 50µl do pool celular e 1µl do bloqueador da porção Fc (FcBlock - BD-Biosciences Inc., San Jose, CA). Aos tubos que receberam anticorpos marcadores ou os controles isotipos, o volume final foi completado para 100µl com PBS-SBF.

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

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

3.6 Protocolo de avaliação da capacidade de expansão *in vitro*

As MSCs tanto de animais da linhagem SHR quanto WKY foram expandidas em cultura e replaqueadas, segundo o protocolo descrito acima, toda vez que a confluência ultrapassava 80%, com o objetivo de se averiguar quantas passagens seriam necessárias para atingirem a senescência replicativa, a qual foi evidenciada pela perda do aspecto fibroblastóide das células e pela reduzida aderência das células à superfície plástica e conseqüente descarte das células diante da troca do meio de cultura.

3.7 Protocolo de avaliação da proliferação celular

As MSCs em P0 foram removidas dos frascos de cultura segundo o protocolo de replaqueamento de células tronco mesenquimais, e foram replaqueadas em plaquinhas de cultura contendo 24 *wells*, na densidade de 30000 células/*well*. A partir deste dia 0, cada *well* tinha suas células removidas e contadas em câmara de Neubauer nos dias 04, 06, 08, 11, 13, 15, 18, 20, 22, 25, 27 e 29. Para cada animal, o ensaio de proliferação foi realizado em triplicata.

Em todos os dias de experimento, os *wells* que tinham suas células removidas eram avaliados no microscópio invertido por contraste de fase a fim de avaliar a eficiência da remoção das células. Curvas de crescimento celular foram construídas correlacionando número de células contadas em cada poço para cada um dos tempos de contagem acima especificados.

3.8 Protocolo de diferenciação celular

As MSCs em cultura foram estimuladas, mediante protocolo específico, a se diferenciar em osteoblastos e adipócitos. O protocolo de diferenciação celular baseou-se em Neuhuber e cols. (2008).

3.8.1 Protocolo de diferenciação osteogênica

Para a indução de diferenciação osteogênica, as MSCs em P6 foram plaqueadas em placas de cultura contendo 06 *wells*, numa densidade de 3000 células/cm². Dois dias após o plaqueamento, o meio de cultura foi substituído por meio de indução osteogênico,

constituído por DMEM acrescido de 15% FBS, 1% penicilina/estreptomicina, 100nM dexametasona, 50µM ascorbato-2-fosfato e 10mM de glicerol-fosfato. O meio de indução osteogênica foi substituído a cada 3-4 dias e, no 18º dia, foi feita a análise da diferenciação.

A análise da diferenciação consistiu de remoção do meio de indução osteogênica, fixação das células na placa através da utilização de paraformaldeído 4% (20 minutos), seguido pela aplicação do corante Alizarin-Red (SIGMA), o qual cora a matriz óssea em vermelho, por 5-10 minutos e análise microscópica.

Cada poço da placa de seis poços foi então escaneado em microscópio invertido (Axioobserver Z1, Carl Zeiss, Alemanha) e 10 campos por poços foram fotografados para posterior análise quantitativa, empregando-se a rotina “cell counter” do software Image J (NIH, Bethesda, MA, USA). A área de cada campo visual ocupada pela coloração avermelhada do Alizarin Red foi quantificada e expressa em valores relativos como percentual da área total do campo estudado.

3.8.2 Protocolo de diferenciação adipogênica

Para a indução de diferenciação adipogênica, as MSCs em P6 foram plaqueadas em placas de cultura contendo 06 *wells*, numa densidade de 20000 células/cm², e cultivadas até próximo da confluência de 100%, quando o meio de cultura foi substituído por meio de indução adipogênico, constituído por DMEM acrescido de 15% FBS, 1% penicilina/estreptomicina, 1µM dexametasona, 0,5mM isobutil-metil-xantina, 10µg/mL insulina e 100µM indometacina. Após 03 dias, o meio de indução adipogênica foi substituído por meio de manutenção adipogênica, constituído por DMEM acrescido de 15% FBS, 1% penicilina/estreptomicina e 10µg/mL insulina. Após 24 horas, o meio de manutenção adipogênica foi novamente substituído por meio de indução adipogênico por

03 dias, quando foi substituído por meio de manutenção adipogênica por novas 24 horas. Completando-se 03 ciclos de troca de meios de indução e manutenção, as células permaneceram por 05 dias com o meio de manutenção, quando foi realizada a análise da diferenciação.

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

A análise quantitativa da diferenciação adipogênica foi realizada de maneira semelhante à acima descrita para a diferenciação osteogênica.

3.9 Análise Estatística

Todos os parâmetros foram expressos como média (\pm epm). As diferenças nos diversos parâmetros funcionais estudados nos ratos SHR e WKY foram avaliadas pelo teste “t” de Student para medidas independentes ou teste de Mann-Whitney, de acordo com presença ou não de normalidade de distribuição e/ou homogeneidade da variância, respectivamente. As curvas de crescimento celular foram comparadas empregando-se o teste de ANOVA de dois efeitos (linhagem de rato x tempo) para medidas repetidas seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey. A diferença entre os parâmetros foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

Todos os animais utilizados foram submetidos a um registro de pressão arterial pelo método de pletismografia de cauda, com o intuito de se confirmar a elevada pressão arterial nos animais SHR e a normotensão nos WKY.

Tabela 1 – Valores médios de pressão arterial sistólica obtidos através do método de pletismografia de cauda.

Animal	Valor médio de pressão arterial sistólica (mmHg)
SHR 1	180,2
SHR 2	194,4
SHR 3	211,4
SHR 4	192,4
SHR 5	215,4
WKY 1	134,2
WKY 2	135,4
WKY 3	107,4
WKY 4	122,2
WKY 5	130,8
<p>SHR = spontaneously hypertensive rats (ratos espontaneamente hipertensos) WKY = ratos wistar Kyoto.</p>	

Analisando os valores obtidos do ensaio de unidades formadoras de colônias semelhantes a fibroblastos (CFU-F), observou-se, como indicado na figura 2, que as células mononucleares de medula óssea dos animais da linhagem WKY formaram uma média de $4,7 \pm 2,3$ CFU-F a cada 10^6 células plaqueadas no ensaio, o que indica uma porcentagem de 0,0005% de células formadoras de colônias semelhantes a fibroblastos presentes na medula óssea destes animais. Por outro lado, as células mononucleares de

medula óssea dos animais da linhagem SHR formaram uma média de $4,9 \pm 1,8$ CFU-F a cada 10^6 células plaqueadas no ensaio, o que indica também uma porcentagem de 0,0005% de células formadoras de colônias semelhantes a fibroblastos presentes na medula óssea. A diferença observada nos valores médios das unidades formadoras de colônias formadas por células de animais WKY e aquelas formadas por células de SHR não foi estatisticamente significativa ($p = 0.952$).

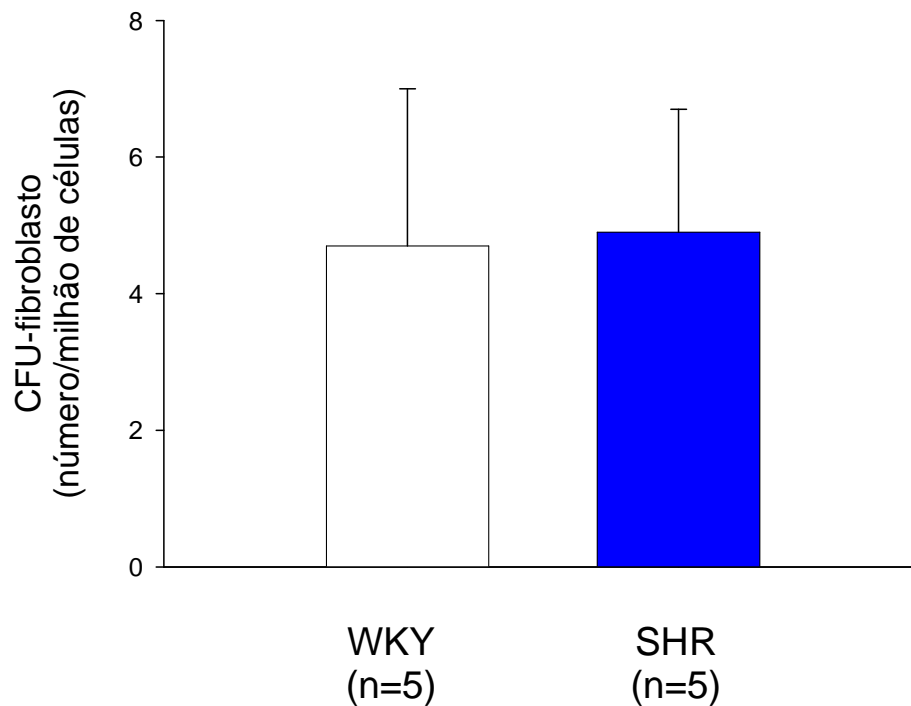


Figura 2: Valores médios (\pm epm) das unidades formadoras de colônias semelhantes a fibroblastos correspondentes aos animais da linhagem SHR e WKY ($p=0,952$).

A citometria de fluxo evidenciou o perfil imunofenotípico das células tronco mesenquimais de medula óssea tanto dos animais WKY quanto dos SHR. Como mostrado na tabela 2, as marcações para CD29 foram positivas em ambos os ratos WKY e SHR e as marcações para CD11b, CD34, CD31, CD45 e c-Kit foram negativas para ambas as linhagens de animais. Estas marcações negativas descartam a contaminação das células cultivadas com macrófagos, células tronco hematopoiéticas, leucócitos e células endoteliais.

Tabela 2 – Valores percentuais de células positivamente marcadas com os marcadores indicados na coluna à esquerda em um exemplar de células tronco mesenquimais extraídas de ratos WKY e SHR.

	WKY (%)	SHR (%)
CD11b	7,83	4,55
CD29	89,64	94,71
CD31	2,47	12,98
CD34	8,67	0,93
CD45	15,80	3,79
c-Kit	8,35	3,29

A análise das curvas de proliferação celular das MSCs tanto de animais da linhagem SHR quanto WKY, observadas na figura 3, demonstrou uma significativa elevação do número de células em cada *well* com o decorrer do tempo, indicando uma elevada taxa de proliferação celular, fato este mais evidenciado nas células dos animais WKY, onde foi possível estabelecer uma diferença significativa na quantidade de células encontradas nesta cepa. A partir do oitavo dia de cultura, o número de células de WKY foi significativamente maior que o número de células de SHR, indicando uma maior capacidade proliferativa das MSCs dos animais WKY em relação aos animais SHR.

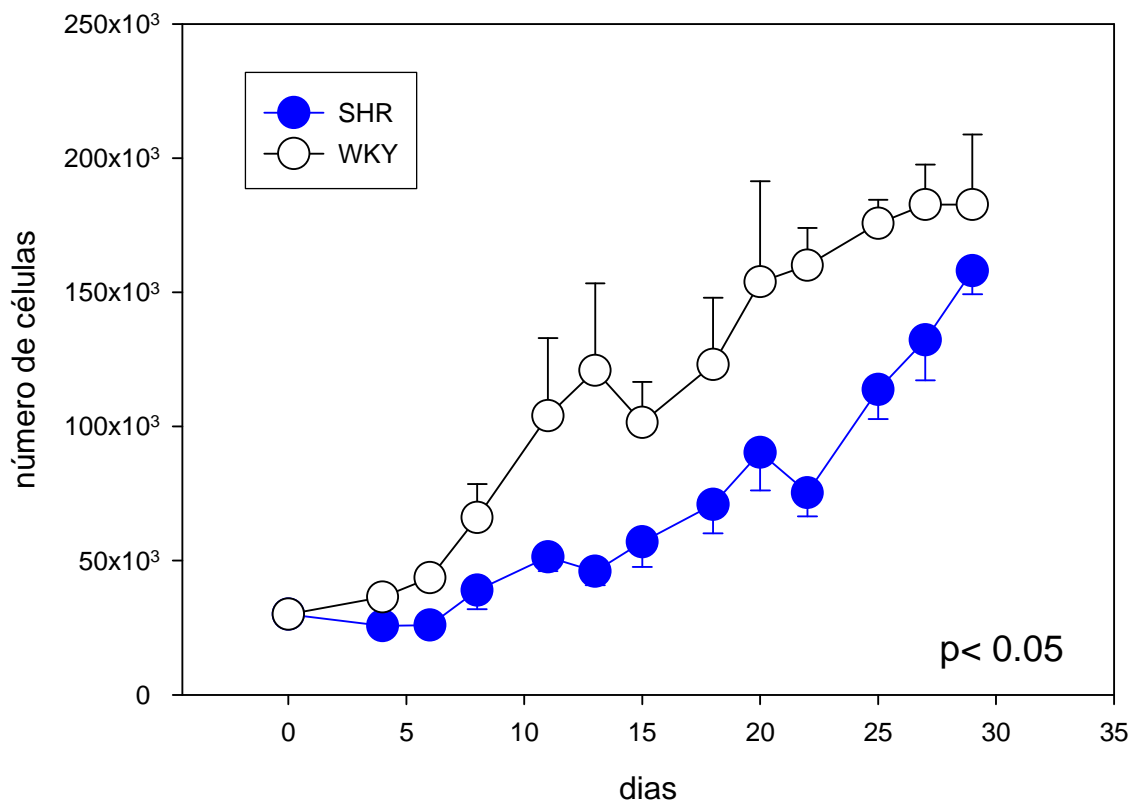


Figura 3: Valores médios (\pm epm) do número de células encontradas em cada *well* nos diferentes dias do experimento. A diferença significativa entre os dois grupos aparece a partir do oitavo dia de cultura até o final do experimento. * $P < 0,05$ entre WKY vs. SHR.

A análise da capacidade de expansão *in vitro* até a senescência replicativa das MSCs, tanto dos animais SHR quanto dos WKY foi também investigada através da capacidade destas células de duplicar sua população em cultura, ou seja, quantificando-se o número de passagens necessárias para as MSCs entrarem em senescência proliferativa, caracterizada, dentre outras, pela reduzida capacidade de aderência à superfície plástica. Observou-se, que as MSCs obtidas a partir de animais da linhagem SHR sofreram 27 passagens em cultura até adquirirem um fenótipo senescente, ou seja, as MSCs de SHR se desgrudaram das garrafinhas em P27; enquanto que as MSCs obtidas a partir de animais da linhagem WKY sofreram 42 passagens em cultura até adquirirem um fenótipo senescente, ou seja, as MSCs de WKY se desgrudaram das garrafinhas em P42, evidenciando uma maior capacidade de expansão *in vitro* das células de WKY, como pode ser atestado na figura 4.

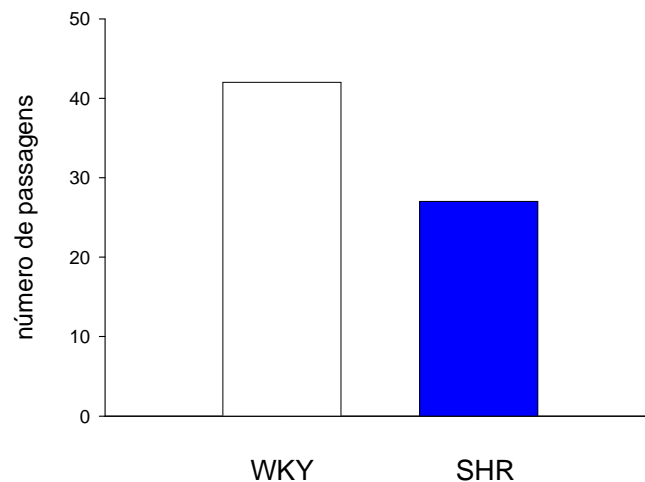
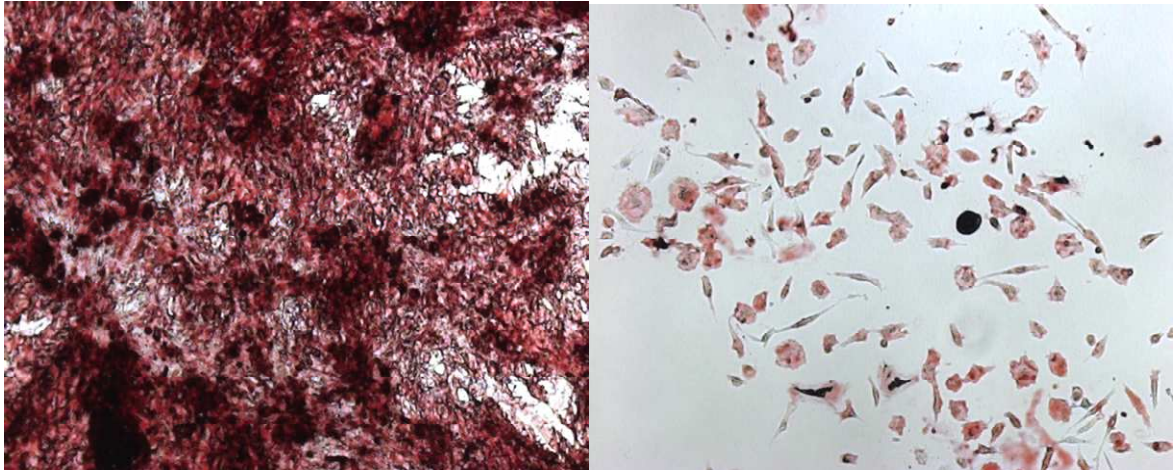


Figura 4: Valores das passagens em cultura nas quais as MSCs dos animais SHR e WKY atingiram um fenótipo senescente.

A análise da capacidade de diferenciação *in vitro* das MSCs, tanto dos animais SHR quanto dos WKY foi analisada qualitativa- e quantitativamente através da medida da área relativa (em percentual) ocupada pela coloração específica em relação à área total do campo microscópico estudado, após a indução da diferenciação, tanto na linhagem osteogênica quanto adipogênica. Como pode ser observado nas figuras 5 e 6, a intensidade de coloração observada após a indução de diferenciação das MSCs obtidas a partir dos animais da linhagem WKY, tanto em osteoblastos quanto em adipócitos, foi claramente maior que aquela observada após a indução de diferenciação das MSCs dos animais SHR sob as mesmas condições.

(A)



(B)

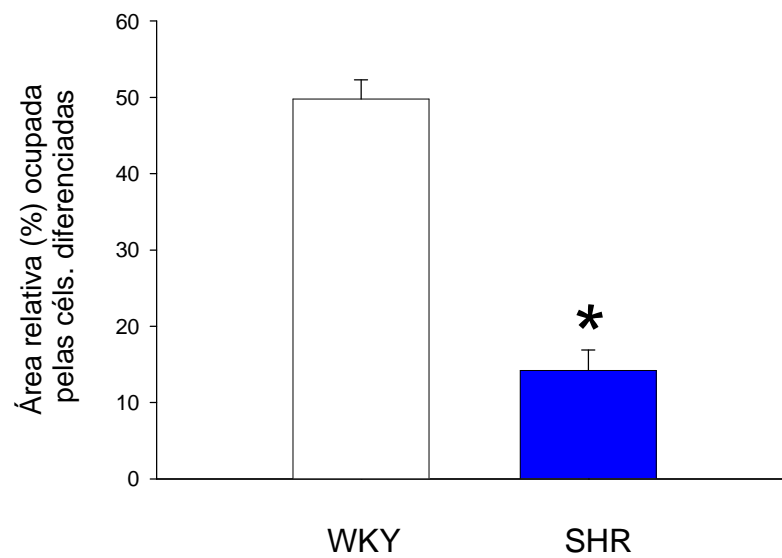
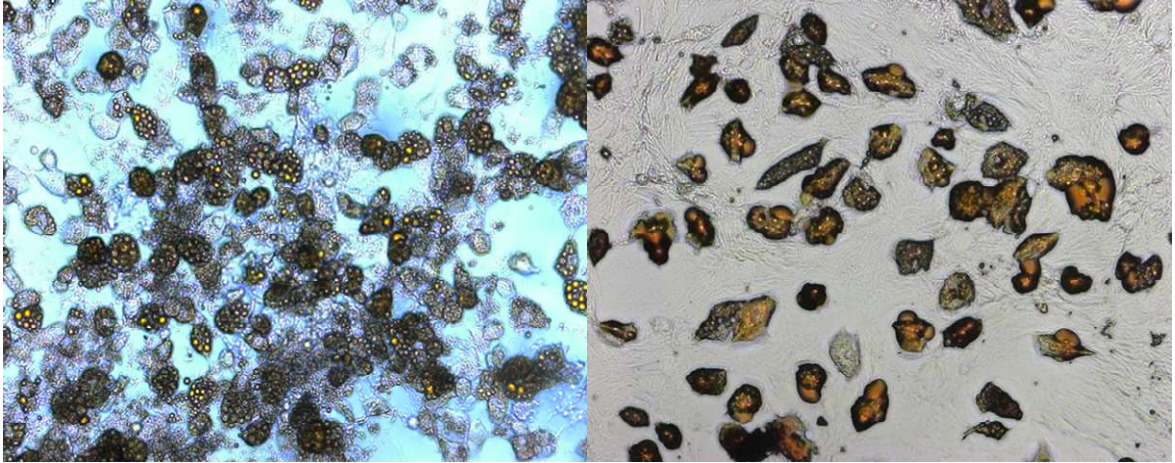


Figura 5: (A) Fotomicrografias das MSCs submetidas à indução de diferenciação em linhagem osteogênica, tanto de WKY (direita) quanto de SHR (esquerda). (B) Quantificação da área relativa ocupada por células diferenciadas em relação à área total do campo microscópico analisado. (* $p < 0,01$).

(A)



(B)

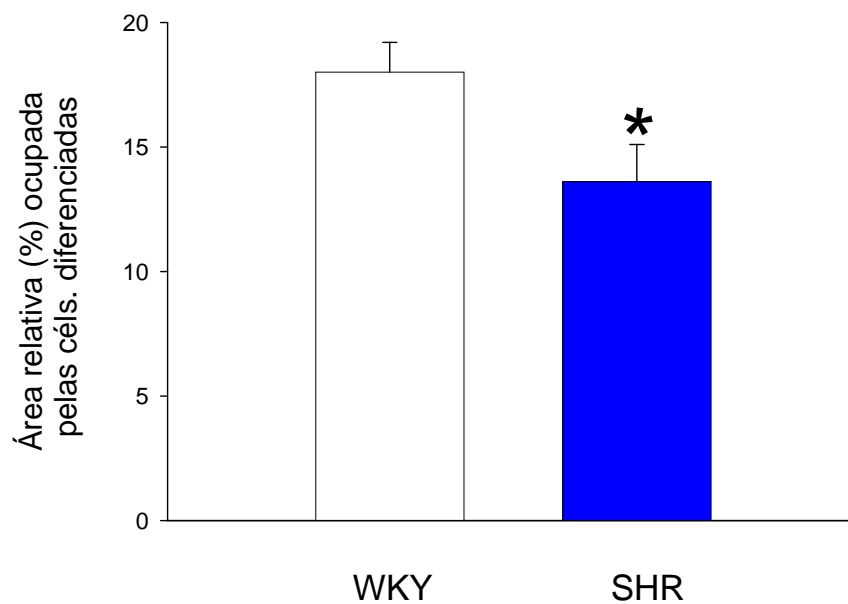


Figura 6: (A) Fotomicrografias das MSCs submetidas à indução de diferenciação em linhagem adipogênica, tanto de WKY (direita) quanto de SHR (esquerda). (B) Quantificação da área relativa ocupada por células diferenciadas em relação à área total do campo microscópico analisado. (* $p < 0,05$)

5. DISCUSSÃO

O presente estudo evidenciou pela primeira vez, ao nosso conhecimento, que algumas características funcionais de células tronco mesenquimais de medula óssea, incluindo a capacidade de proliferação e de expansão *in vitro* até a senescência e a capacidade de diferenciação osteogênica e adipogênica encontram-se prejudicadas no modelo de hipertensão arterial espontânea em ratos, quando comparados aos animais normotensos controles da linhagem WKY. Ainda que as razões para tais diferenças em ratos WKY e SHR não tenham sido investigadas, nossos dados baseados em cultura *in vitro* em condições idênticas sugerem que defeitos genéticos sabidamente presentes nos animais SHR poderiam estar contribuindo para a gênese de tais alterações. Por fim, levando-se em consideração as crescentes evidências do potencial angiogênico destas células e uma grande similaridade das mesmas com os pericitos, células perivasculares importantes na homeostasia dos vasos sanguíneos, nossos dados também parecem sugerir que os defeitos observados nas MSCs poderiam de alguma forma estar implicados na patogênese da hipertensão arterial espontânea em ratos.

Os elevados níveis de pressão arterial encontrados nos animais SHR utilizados no presente estudo confirmaram dados da literatura concernentes a esta linhagem de animais. (Okamoto e Aoki, 1963; Yamori, 1994). Os mecanismos envolvidos na elevação da pressão arterial sistêmica nestes animais parecem estar relacionados a vários fatores, como disfunção endotelial, hiperatividade simpática, rarefação microvascular, angiogênese defeituosa, dentre outros (Le Noble e cols., 1998; Fazan Jr. e cols., 2001).

Em relação à angiogênese, as MSCs parecem possuir uma importante ação neoangiogênica, confirmada por uma série de estudos que indicam principalmente uma elevada capacidade destas células de secretar os mais variados tipos de fatores bioativos envolvidos no processo de formação de novos vasos, especialmente pelo processo de angiogênese. Além disso, postula-se que os pericitos representem MSCs, as quais se

localizariam por todo o organismo associadas aos vasos sanguíneos e, diante de uma lesão vascular ou de tecidos adjacentes, as MSCs seriam estimuladas, proliferando e secretando fatores bioativos que funcionariam para proteger e reparar ou regenerar o tecido lesado (Meirelles e cols., 2008). Um defeito de proliferação e diferenciação das MSCs, como demonstrado no presente trabalho, poderia implicar tais células na angiogênese defeituosa e rarefação microvascular observada em SHR e pacientes hipertensos, o que reforça um possível papel das MSCs na fisiopatogênese da HAS, principalmente atuando sobre a resistência vascular periférica, seja interferindo na formação de novos microvasos, seja modulando a função endotelial.

Os trabalhos pioneiros de Friedenstein na década de 1970 descreveram uma população de células presentes na medula óssea caracterizadas pelo seu formato fusiforme, pela sua aderência à superfície plástica e pela formação de colônias de células semelhantes a fibroblastos, chamadas de unidades formadoras de colônias de fibroblastos (CFU-F), as quais possuíam a capacidade de formar células que produziam pequenos depósitos de osso e cartilagem (Prockop, 1997; Nardi e Meirelles, 2006). Por ser indicativo de células capazes de formar colônias, sendo representativo das células que possuem uma capacidade proliferativa mais elevada dentre as células em cultura, o ensaio de formação de colônias semelhantes a fibroblastos (CFU-F) tem sido considerado como um modo de se quantificar o número de MSCs presentes na medula óssea, embora uma relação direta entre o número de MSCs e CFU-Fs não seja claramente estabelecida, provavelmente devido à grande heterogeneidade relacionada a morfologia, tamanho e potencial de diferenciação observada entre diferentes espécies e entre diferentes condições de cultura (Javazon, e cols., 2004; Nardi e Meirelles, 2006).

A frequência de CFU-F em suspensões de medula óssea é muito diferente entre as espécies, embora ensaios de CFU-F a partir de aspirados de medula óssea geralmente

produzam um número de colônias entre 01 e 20 por 10^5 células mononucleares plaqueadas (Castro-Malaspina e cols., 1980). A incidência variada de CFU-F entre diferentes espécies é, pelo menos em parte, devido a diferenças nas condições de cultura estabelecidas por diferentes investigadores, embora também possa ser devido a diferentes requerimentos para a formação de CFU-F pelas diferentes espécies (Kuznetsov, 1997), ou mesmo por diferentes indivíduos da mesma espécie (Phinney e cols., 1999). Alguns fatores de crescimento podem estimular a proliferação de CFU-F *in vitro*, tais como fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), fator de crescimento epidérmico (EGF) (Gronthos e Simmons, 1995), fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF) (Bianchi e cols., 2003). Já outros fatores podem inibir a formação de CFU-F *in vitro*, dentre eles interferon-alpha (IFN- α) e interleucina-4 (IL-4) (Gronthos e Simmons, 1995; Wang e cols., 1990).

Os resultados do presente estudo demonstram que os animais SHR apresentaram números de CFU-Fs de medula óssea semelhantes aos animais WKY, ambos em torno de 5 unidades por 1 milhão de células mononucleares de medula óssea. Embora a relação direta entre CFU-F e MSC não seja claramente estabelecida, estes resultados podem indicar uma porcentagem de 0,0005% de MSCs na medula óssea em ambas as linhagens de animais, dados estes que se corroboram com outros dados da literatura (Castro-Malaspina e cols., 1980). Em outras palavras, o número de MSCs presentes na medula óssea de SHR parece não ser diferente daquele observado em ratos normotensos.

As MSCs possuem propriedade de auto-renovação. Embora células obtidas a partir de diferentes fontes exibam durações similares de fase *lag* em cultura (Musina e cols., 2005), elas podem apresentar importantes diferenças no seu potencial proliferativo durante o estágio exponencial de crescimento, sendo que, dependendo da fonte das células e das condições de cultura, a porcentagem de MSCs se dividindo ativamente em um dado tempo

na cultura celular é estimada em aproximadamente 3.55 – 10.78% (Conget e Minguell, 1999). Alguns autores observaram que MSCs obtidas a partir de medula óssea possuem uma baixa capacidade de duplicação (Wagner e cols., 2008), enquanto outros estudos apontam uma maior capacidade de duplicação destas mesmas células (Colter e cols., 2000; Bruder e cols., 1997). Estas diferenças provavelmente se devem às diferentes condições de cultura empregadas nos mais variados estudos, e também à idade da fonte celular, como pode ser evidenciado por estudos demonstrando que o comprimento dos telômeros das MSCs obtidas de doadores jovens era significativamente maior que das MSCs obtidas de doadores mais velhos, e também pela demonstração que a expansibilidade de MSCs obtidas a partir de fontes fetais é maior que a de MSCs obtidas de tecidos adultos (Guillot e cols., 2007).

A capacidade proliferativa das MSCs é dependente de algumas variáveis, como a idade do tecido de onde as MSCs são extraídas, a densidade de plaqueamento das células e a composição do meio de crescimento das MSCs. O efeito da idade da fonte doadora sobre a capacidade proliferativa das MSCs *in vitro* é baseado em estudos que têm demonstrado que a capacidade das MSCs de formar colônias de células aderentes diminui com a idade (Stolzing e cols., 2008), o número de duplicações celulares de células obtidas de doadores mais velhos é menor que daquelas obtidas de doadores mais jovens (Shibata e cols., 2007), e também a expansibilidade de MSCs extraídas de tecidos adultos é menor quando comparada com a de MSCs obtidas de fetos (Guillot e cols., 2007). A densidade de plaqueamento é também um importante fator determinante da capacidade proliferativa das MSCs, uma vez que as células necessitam de uma densidade mínima de plaqueamento para iniciar e manter uma proliferação efetiva, e também a densidade em que as células são transferidas para as placas de cultura pode determinar a dinâmica do seu subsequente crescimento (Balin e cols., 2002). Um aspecto determinante do ambiente de cultura é o

soro, o qual constitui a fonte básica de nutrientes, hormônios, fatores de crescimento, vitaminas, e outros microelementos essenciais para manter a própria proliferação celular (Shahdadfar e cols., 2005), sendo que a seleção de um soro apropriado é importante no sentido de se obter condições ótimas de cultura, bem como minimizar a possibilidade de transmissão de alguma infecção zoonótica e de imunização por proteínas do soro (Shahdadfar e cols., 2005).

A capacidade das MSCs de se proliferar é acompanhada de normalidade cromossômica, uma vez que estas células apresentam um cariótipo normal e nenhuma evidência de transformação maligna mesmo com uma capacidade proliferativa geneticamente aumentada (Simonsen e cols., 2002). Além disso, Kulterer e cols. (2007) avaliaram o perfil de expressão gênica de MSCs submetidas a cultivo celular de longo prazo ou a indução de diferenciação osteogênica *in vitro* e não observaram nenhuma alteração significativa no perfil de expressão gênica durante a expansão celular em longo prazo sob condições de crescimento normais, o que é reforçado pelo fato de as MSCs manterem seu fenótipo indiferenciado e sua capacidade de se diferenciar em osteoblastos tanto em passagens iniciais quanto em passagens mais tardias em cultura (Kulterer e cols., 2007).

Várias vias de sinalização intracelulares estão envolvidas na proliferação de MSCs *in vitro*. Dentre elas, a via da quinase regulada por sinais extracelulares (ERK 1/2) parece ser importante, uma vez que há vários estudos demonstrando que a ativação desta via de sinalização contribui para a elevada capacidade proliferativa de MSCs *in vitro* (Dai e cols., 2007), enquanto a inibição da mesma produz o efeito contrário (Gruber e cols., 2004).

A análise da taxa de proliferação das MSCs tanto de animais da linhagem SHR quanto WKY neste estudo indicou uma elevada taxa de proliferação celular, fato este mais evidenciado nas células dos animais WKY. Além disso, observou-se que a partir do oitavo

dia de cultivo até o final do experimento o número de células de WKY foi maior que o número de células de SHR, indicando uma maior capacidade proliferativa *in vitro* das MSCs dos animais WKY em relação aos animais SHR.

Ao contrário das células tronco embrionárias, as MSCs possuem uma capacidade limitada de auto-renovação, ou seja, elas são capazes de se dividir até um certo limite, onde alcançam a senescência replicativa, que é definida como um fenômeno que restringe a proliferação celular *in vitro* quando a célula alcança um determinado número de duplicações (Ksiazek, 2009). Uma determinada célula que alcança o limite de sua capacidade proliferativa adquire alguns marcadores que a distinguem de outras células em proliferação ou quiescentes, sendo que as características clássicas do fenótipo senescente incluem a interrupção do crescimento na fase G₁ do ciclo celular, morfologia arredondada e expressão aumentada de β-galactosidase associada à senescência (Campisi e d'Adda di Fagagna, 2007). Especificamente as MSCs senescentes se tornam hipertróficas e arredondadas, apresentam granulações citoplasmáticas, reduzida aderência a superfícies plásticas e aumentado nível de autofluorescência; enquanto o nível de expressão de β-galactosidase associada à senescência não parece constituir um marcador eficiente de senescência de MSCs *in vitro* (Stenderup e cols., 2003; Ksiazek, 2009). As MSCs senescentes são também caracterizadas por expressão reduzida de genes associados à progressão do ciclo celular, à replicação de DNA, à mitose e ao reparo de danos ao DNA; enquanto há um aumento na expressão de inibidores do ciclo celular, como o p16^{Ink4a} (Wagner e cols., 2008; Ryu e cols., 2008); citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-6 (Ryu e cols., 2008) e agentes antifibrinolíticos, como inibidor-1 do ativador de plasminogênio (Wagner e cols., 2008). Além disso, MSCs senescentes apresentam uma expressão alterada de microRNAs, que são moléculas de RNA fita-simples envolvidas na regulação da expressão gênica em nível pós-transcricional (Ksiazek, 2009; Wagner e cols.,

2008), e também uma tendência a perder sua multipotencialidade, o que é evidenciado por estudos demonstrando que a capacidade das MSCs de se diferenciarem em linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica tende a diminuir com sucessivas passagens em cultura (Wagner e cols., 2008; Neuhuber e cols., 2008).

A senescência celular possui uma natureza complexa, sendo determinada por variáveis genéticas e ambientais (Ksiazek, 2009). Alguns mecanismos moleculares têm surgido como candidatos ao envolvimento na senescência replicativas das MSCs, como os telômeros e o estresse oxidativo. As MSCs possuem extremidades cromossômicas denominadas telômeros, cujo comprimento em uma MSC recém-extraída depende da idade do tecido doador (Guillot e cols., 2007), sendo que o DNA telomérico sofre erosão gradual na medida em que as MSCs vão se duplicando em cultura (Parsch e cols., 2004). Várias investigações têm demonstrado que as MSCs possuem uma baixa (Parsch e cols., 2004), ou mesmo indetectável (Ryu e cols., 2008), atividade da enzima telomerase, que é uma transcriptase reversa responsável por neutralizar a erosão telomérica através de contínua reconstituição da extremidade cromossômica (Masutomi e cols., 2003); e uma prova direta do envolvimento do encurtamento telomérico na senescência das MSCs é a demonstração de que a introdução de telomerase humana (hTERT) em MSCs resulta em pronunciado aumento da capacidade de duplicação celular, o que é acompanhado de preservação do cariótipo normal (Takeuchi e cols., 2007), alongamento dos telômeros (Kang e cols., 2004), perda do fenótipo senescente (Ryu e cols., 2008) e manutenção do seu potencial de diferenciação (Kang e cols., 2004). O estresse oxidativo é apontado como um importante indutor de danos ao DNA e de senescência celular (Von Zglinicki, 2002; Passos e cols., 2006), e no caso específico das MSCs existem algumas evidências indiretas do envolvimento de espécies reativas de oxigênio (ROS) na proliferação de MSCs, uma vez que a taxa proliferativa destas células está aumentada mediante tratamento com agentes

anti-oxidantes, como ácido ascórbico e resveratrol (Choi e cols., 2008; Dai e cols., 2007) e também mediante o cultivo celular sob baixas tensões de oxigênio (Li e cols., 2005). Entretanto, algumas questões importantes, como aquelas relacionadas ao nível de dano oxidativo no DNA, eficiência dos processos de reparo de danos ao DNA, alterações no status anti-oxidante endógeno e mecanismos de disfunção mitocondrial, ainda necessitem ser esclarecidas a fim de se estabelecer uma relação concreta entre ROS e senescência de MSCs (Ksiazek, 2009).

O nosso estudo demonstra uma nítida diferença entre MSCs obtidas a partir de animais da linhagem SHR e aquelas obtidas de animais WKY no que se refere à capacidade de expansão *in vitro* até a senescência replicativa, uma vez que as células dos animais SHR apresentaram um fenótipo senescente, caracterizado pela interrupção da proliferação celular e pela marcante redução da capacidade de aderência à superfícies plásticas, em passagens mais recentes (P27) do que as MSCs dos animais WKY (P42), o que evidencia uma maior capacidade de expansão *in vitro* das células dos animais normotensos em relação aos hipertensos. Uma possível participação de telômeros mais curtos em células de SHR, como evidenciado por Imanishi e cols. (2005) em células progenitoras endoteliais, poderia explicar nossos achados.

De acordo com a International Society for Cellular Therapy, para se definir uma célula como sendo uma célula estromal mesenquimal multipotente, é necessário que esta célula possua a propriedade de aderência ao plástico sob condições de cultura padrão, a capacidade de se diferenciar *in vitro* em osteoblastos, adipócitos e condroblastos; expresse os marcadores de superfície CD29, CD73, CD90 e CD105; e não expresse os marcadores de superfície CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 ou CD19, e HLA-DR (Keating, 2006; Horwitz, 2005). Os dados obtidos pela citometria de fluxo em nosso estudo evidenciaram que as MSC de medula óssea de ambas as linhagens de ratos apresentaram perfis

imunofenotípicos similares, ou seja, elas são positivas para CD29 e negativas para CD11b, CD31, CD34, CD45 e c-kit. Tais achados também indicam que as condições de isolamento e cultura empregadas foram adequadas para a caracterização das MSCs de medula óssea.

A indução de diferenciação *in vitro* destas células é relativamente fácil de se conseguir, e a determinação do fenótipo das células diferenciadas depende de critérios morfológicos, imunofenotípicos e funcionais (Nardi e Meirelles, 2006). MSCs cultivadas *in vitro* mostram grande heterogeneidade no seu potencial de diferenciação, haja visto que as culturas muito provavelmente são compostas por uma mistura de células com diferentes potenciais de diferenciação, sendo que alguns ensaios clonais mostram que apenas um-terço dos clones de MSCs derivados de culturas estabelecidas são multipotentes (Pittenger e cols., 1999), ou seja, a maioria das células em cultura possuem uma capacidade de diferenciação mais restrita, geralmente em uma ou, no máximo, duas linhagens celulares diferentes (Digirolamo e cols., 1999).

A indução de diferenciação osteogênica em MSCs *in vitro* pode ser realizada através do tratamento específico das células com dexametasona, ácido ascórbico e glicerol-fosfato (Neuhuber e cols., 2008). Kulterer e cols. (2007) avaliaram o perfil de expressão gênica de MSCs durante a indução de diferenciação osteogênica *in vitro*, observando que as MSCs exibiram três estágios distintos de desenvolvimento osteogênico a nível molecular, de forma que grupos específicos de genes estão associados com estágios distintos de proliferação, maturação de matriz óssea e mineralização durante o desenvolvimento do fenótipo osteoblástico (Kulterer e cols., 2007).

A indução de diferenciação adipogênica em MSCs *in vitro* pode ser realizada através do tratamento específico das células com dexametasona, insulina, indometacina e isobutil-metil-xantina (Neuhuber e cols., 2008). Uma análise, baseada em microarray, do perfil de expressão gênica das MSCs associados ao potencial adipogênico destas células

demonstrou que o início da adipogênese ocorre logo após a indução da diferenciação, evidenciado pela presença de mRNAs de vários marcadores adipogênicos, como lipoproteína lipase (LPL), proteína ligadora de ácido graxo – 4, peroxisome proliferator-activated receptor gamma-2 (PPAR γ -2). Além disso, comparando-se os perfis de expressão gênica das MSCs e dos adipócitos gerados pela diferenciação das MSCs, observou-se que 82 genes estavam supra-regulados e 31 genes estavam inibidos, o que sugere que o início e a progressão da adipogênese a partir das MSCs está associado à perda do fenótipo multipotente por parte das MSCs (Hung e cols., 2004).

Nosso estudo avaliou, dentre outras, a capacidade das MSCs de medula óssea de se diferenciarem em osteoblastos e adipócitos, observando-se que a quantidade de células diferenciadas observada após a indução de diferenciação das MSCs obtidas a partir dos animais da linhagem WKY, tanto em osteoblastos quanto em adipócitos, foi claramente maior que aquela observada após a indução de diferenciação das MSCs dos animais SHR sob as mesmas condições. As razões pelas quais MSCs de SHR apresentaram um déficit de diferenciação tanto osteogênica como adipogênica não são conhecidas e não foram objeto de estudo do presente trabalho. Entretanto, mais um vez, a título de especulação, tal déficit pode ser decorrente das alterações genéticas sabidamente presentes na linhagem de ratos SHR, ou então, uma consequência da exposição crônica das MSCs a um micro-ambiente agressivo caracterizado por elevado conteúdo de estresse oxidativo, estímulo apoptóticos, estímulos pró-senescentes, etc., já demonstrados presentes em SHR (Kobayashi e cols., 2006). Estudos adicionais, entretanto, são necessários para esclarecer melhor esta questão.

Embora não avaliado neste estudo, é provável que estas deficiências funcionais (de proliferação e de diferenciação) também se estenda ao efeito pró-angiogênico destas células, indicando uma menor capacidade de promover neoangiogênese nos animais SHR, o que poderia ser, pelo menos em parte, responsável pela rarefação microvascular

característica deste modelo genético experimental de HAS. Além disso, um possível papel modulador das MSCs sobre a função endotelial também é plausível e merece ser investigado, uma vez que a deficiência funcional das MSCs observada nos animais SHR pode refletir em uma modulação endotelial deficiente e, conseqüentemente, em uma disfunção endotelial, característica da HAS.

Algumas limitações do estudo merecem consideração especial, especialmente aquelas relacionadas às condições diferenciais inerentes aos estudos *in vitro* em geral, e também à heterogeneidade de células presentes em cultura. Embora se trate de um estudo observacional, o fato de os experimentos terem sido realizados *in vitro* impõe algumas limitações, uma vez que tais estudos falham em mimetizar fielmente o microambiente ao qual as células estão inseridas *in vivo*, o que poderia induzir alterações no comportamento e na fisiologia destas células (Devlin e cols., 2005). As culturas padrões de MSCs estabelecidas a partir de várias espécies, várias fontes e em diferentes laboratórios são caracterizadas pela sua heterogeneidade, dada a variabilidade das condições de isolamento e cultura destas células utilizada pelos diversos laboratórios; muito embora não esteja completamente estabelecido se as diferentes condições de cultura favorecem a expansão de diferentes precursores da medula óssea, ou induzem populações de células similares a adquirirem fenótipos distintos (Nardi e Meirelles, 2006). Assim, as condições de cultura podem ter um grande impacto sobre a função das MSCs, o que vem sendo demonstrado por alguns estudos que demonstram que a confluência de MSCs em cultura antes de serem infundidas pode afetar seu potencial migratório dentro do hospedeiro, já que uma confluência aumentada é capaz de inibir a migração transendotelial de MSCs através do aumento na produção de um inibidor natural de metaloproteinase (De Becker e cols., 2007; Karp e cols., 2009). Além disso, a própria identidade destas células como MSCs tem sido alvo de questionamentos em razão da grande similaridade, tanto morfológica quanto

funcional, entre estas células e os já bem descritos fibroblastos; além do fato de a definição de MSC proposta pela International Society of Cellular Therapy (ISCT) ser incapaz de distinguir MSC de fibroblastos em geral, o que reforça a necessidade de uma compreensão maior acerca da identidade e características das MSCs (Haniffa e cols., 2009).

6. CONCLUSÕES

Todos os resultados encontrados neste estudo apontam para um déficit funcional nas células tronco mesenquimais de SHR, evidenciado pelos ensaios de proliferação celular, de expansão até a senescência e diferenciação osteogênica e adipogênica, os quais se encontram significativamente alterados em comparação aos ratos WKY. Tais achados poderiam ser decorrentes das modificações genéticas conhecidamente existentes no modelo de hipertensão do SHR, ou então ser uma consequência da exposição das MSCs ao micro-ambiente hipertensivo dos SHRs por tempo prolongado. As repercussões destas alterações sobre a fisiopatologia da própria hipertensão arterial sistêmica necessitam ser futuramente investigadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABEDIN M, TINTUT Y, DEMER LL. **Mesenchymal stem cells and the artery wall.** *Circ Res* 2004, 95:671-676.
2. ARMULIK A, ABRAMSSON A, BETSHOLTZ C. **Endothelial/pericyte interactions.** *Circ Res* 2005, 97:512-523.
3. ASAHARA T, et al. **Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis.** *Science* 1997, 275:964-967.
4. BACIGALUPO A, et al. **T-cell suppression mediated by mesenchymal stem cells is deficient in patients with severe aplastic anemia.** *Exp Hematol* 2005, 33:819-827.
5. BAHLMANN FH, et al. **Stimulation of endothelial progenitor cells: a new putative therapeutic effect of angiotensin II receptor antagonists.** *Hypertension* 2005, 45:526-529.
6. BALIN AK, et al. **Effects of establishing cell cultures and cell culture conditions on the proliferative life span of human fibroblasts isolated from different tissues and donors of different ages.** *Exp Cell Res* 2002, 274:275-287.
7. BARRY FP, MURPHY JM, ENGLISH K, MAHON BP. **Immunogenicity of adult mesenchymal stem cells: lessons from the fetal allograft.** *Stem Cells Dev* 2005, 14:252-265.
8. BEEVERS G, LIP GYH; O'BRIEN E. **The pathophysiology of hypertension.** *BMJ* 2001, 322:912-916.
9. BELGORE F, et al. **Plasma levels of vascular endothelial growth factor and its soluble receptor (SFlt-1) in essential hypertension.** *Am J Cardiol* 2001, 87:805-807.
10. BIANCHI G, et al. **Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2.** *Exp Cell Res* 2003, 287:98-105.

11. BIEBACK K, KERN S, KLUTER H, EICHLER H. **Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood.** Stem Cells 2004, 22:625-634.
12. BINDER A. **A review of the genetics of essential hypertension.** Curr. Opin. Cardiol 2007, 22:176-184.
13. BLAU HM, BRAZELTON TR, WEIMANN JM. **The envolving concept of a stem cell: entity or function?** Cell 2001, 105:829-841.
14. BRAGA LMGM, et al. **Systemic delivery of adult stem cells improves cardiac function in spontaneously hypertensive rats.** Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 2008b, 35:113-119.
15. BRAGA LMGM, et al. **In situ delivery of bone marrow cells and mesenchymal stem cells improves cardiovascular function in hypertensive rats submitted to myocardial infarction.** J Biomed Sci 2008a, 15:365-374.
16. BRUDER SP, JAISWAL N, HAYNESWORTH SE. **Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation.** J Cell Biochem 1997, 64:278-294.
17. CAMPISI J, d'ADDA DI FAGAGNA F. **Cellular senescence: When bad things happen to good cells.** Nat Rev Mol Cell Biol 2007, 8:729-740.
18. CASTRO-MALASPINA H, et al. **Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny.** Blood 1980, 56:289-301.
19. CHOI KM, et al. **Effect of ascorbic acid on bone marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation and differentiation.** J Biosci Bioeng 2008, 105:586-594.

20. COLTER DC, CLASS R, DIGIROLAMO CM, PROCKOP DJ. **Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow.** Proc Natl Acad Sci USA 2000, 97:3213-3218.
21. CONGET PA, MINGUELL JJ. **Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells.** J Cell Physiol 1999, 181:67-73.
22. DAI Z, et al. **Resveratrol enhances proliferation and osteoblastic differentiation in human mesenchymal stem cells via ER-dependent ERK1/2 activation.** Phytomedicine 2007, 14:806-814.
23. DE BECKER A, et al. **Migration of culture-expanded human mesenchymal stem cells through bone marrow endothelium is regulated by matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3.** Haematologica 2007, 92:440-449.
24. DEL PAPA N, et al. **Bone marrow endothelial progenitors are defective in systemic sclerosis.** Arthritis Rheum 2006, 54:2605-2615.
25. DEVLIN RB, FRAMPTON ML, GHIO AJ. **In vitro studies: What is their role in toxicology?** Experimental and Toxicologic Pathology 2005, 57:183-188.
26. DIAZ-FLORES L, et al. **Inducible perivascular cells contribute to the neochondrogenesis in grafted perichondrium.** Anat Rec 1991, 229:1-8.
27. DIAZ-FLORES L, et al. **Pericytes as a supplementary source of osteoblasts in periosteal osteogenesis.** Clin Orthop Relat Res 1992, 280-286.
28. DIGIROLAMO CM, et al. **Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate.** Br J Haematol 1999, 107:275-281.

29. DJOUAD F, et al. **Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals.** Blood 2003, 102:3837-3844.
30. DONOVAN PJ, GEARHART J. **The end of the beginning for pluripotent stem cells.** Nature Insight Review 2001, 414:92-97.
31. DULAK J, et al. **Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells.** Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000, 20:659-666.
32. FAZAN Jr.R, DIAS DA SILVA VJ, SALGADO HC. **Modelos de hipertensão arterial.** Rev. Bras. Hipertens. 2001, 8: 19-29.
33. FEIHL F, LIAUDET L, WAEBER B, LEVY B. **Hypertension: A Disease of the Microcirculation?** Hypertension 2006, 48:1012-1017.
34. FERNANDEZ M, SIMON V, HERRERA G. **Detection of stromal cells in peripheral blood progenitor cell collections from breast cancer patients.** Bone Marrow Transplant, 1997; 20: 265-271.
35. FRIEDENSTEIN AJ, CHAILAKHJAN RK, LALYKINA KS. **The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells.** Cell Tissue Kinet, 1970; 3: 393-403.
36. FUJIYAMA S, et al. **Bone marrow monocyte lineage cells adhere on injured endothelium in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent manner and accelerate reendothelization as endothelial progenitor cells.** Circ Res 2003, 93:980-989.
37. GALMICHE MC, et al. **Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway.** Blood 1993, 82:66-76.

38. GNECCHI M, et al. **Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells.** Nat Med 2005, 11:367-368.
39. GRONTHOS S, SIMMONS PJ. **The growth factor requirements of STRO-1⁺ human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions.** Blood 1995, 85:929-940.
40. GRUBER R, et al. **Platelet-released supernatants increase migration and proliferation, and decrease osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells under in vitro conditions.** Platelets 2004, 15:29-35.
41. GUILLOT PV, GOTHERSTROM C, CHAN J, KURATA H, FISK NM. **Human first-trimester fetal MSC express pluripotency markers and grow faster and have longer telomeres than adult MSC.** Stem Cells 2007, 25:646-654.
42. HAACK H, SCHAFFER JJ, SIMPSON JG. **Comparisons of cutaneous microvessels from spontaneously hypertensive, normotensive Wistar-Kyoto, and normal Wistar rats.** Proc Soc Exp Biol Med 1980, 164:453-458.
43. HANIFFA MA, COLLIN MP, BUCKLEY CD, DAZZI F. **Mesenchymal stem cells: the fibroblasts' new clothes?** Haematologica 2009, 94(2):258-263.
44. HAVLIK RJ, et al. **Blood pressure aggregation in families.** Am. J. Epidemiol. 1979, 110:304-312.
45. HENRICH H, HERTEL R, ASSMANN R. **Structural differences in the mesentery microcirculation between normotensive and spontaneously hypertensive rats.** Pflugers Archiv 1978, 375:153-159.
46. HIRSCHI KK, D'AMORE PA. **Pericytes in the microvasculature.** Cardiovasc Res 1996, 32:687-698.

47. HONG HS, et al. **A new role of substance P as an injury-inducible messenger for mobilization of CD29⁺ stromal-like cells.** Nature Medicine, 2009; vol. 15, nº4, pág. 425-435.
48. HORWITZ EM, et al. **Clarification of the nomenclature for MSC: International Society for Cellular Therapy position statement.** Cytotherapy 2005, 7:393-395.
49. HUNG SC, et al. **Gene expression profiles of early adipogenesis in human mesenchymal stem cells.** Gene 2004, 340:141-150.
50. IMANISHI T, MORIWAKI C, HANO T, NISHIO I. **Endothelial progenitor cell senescence is accelerated in both experimental hypertensive rats and patients with essential hypertension.** J Hypertens 2005, 23:1831-1837.
51. IN 'T ANKER PS, NOORT WA, SCHERJON SA. **Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential.** Haematologica, 2003b; 88: 845-852.
52. IN 'T ANKER PS, et al. **Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation.** Blood 2003a,102:1548-1549.
53. IN 'T ANKER PS, et al. **Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta.** Stem Cells, 2004; 22: 1338-1345.
54. JAVAZON EH, BEGGS KJ, FLAKE AW. **Mesenchymal stem cells: Paradoxes of passaging.** Experimental Hematology 2004, 32:414-425.
55. KAMIHATA H, MATSUBARA H, NISHIUE T. **Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines.** Circulation 2001, 104:1046-1052.

56. KANG SK, et al. **Expression of telomerase extends the lifespan and enhances osteogenic differentiation of adipose tissue-derived stromal cells.** *Stem Cells* 2004, 22:1356-1372.
57. KARP JM, TEO GSL. **Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details.** *Cell* 2009, 4:206-216.
58. KEATING A. **Mesenchymal stromal cells.** *Curr Opin Hematol* 2006, 13:419-425.
59. KEATING A, POWELL J, TAKAHASHI M, SINGER JW. **The generation of human long-term marrow cultures from marrow depleted of Ia (HLA-DR) positive cells.** *Blood* 1984, 64:1159-1162.
60. KIEFER FN, et al. **Inhibition of NO biosynthesis, but not elevated blood pressure, reduces angiogenesis in rat models of secondary hypertension.** *Blood Press* 2002, 11:116-124.
61. KINNAIRD T, et al. **Marrow-derived cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms.** *Circ. Res.* 2004a, 94:678-685.
62. KINNAIRD T, et al. **Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms.** *Circulation* 2004b, 109:1543-1549.
63. KOBAYASHI N, DELANO FA, SCHMID-SCHONBEIN GW. **Oxidative stress promotes endothelial cell apoptosis and loss of microvessels in the spontaneously hypertensive rats.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005, 25:2114-2121.
64. KOC ON, et al. **Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy.** *J Clin Oncol* 2000, 18:307-316.

65. KSIAZEK K. **A comprehensive review on mesenchymal stem cell growth and senescence.** Rejuvenation Research 2009, 12 (2):105-116.
66. KULTERER B, et al. **Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation.** BMC genomics 2007, 8:70. doi 10.1186/1471-2164-8-70.
67. KUZNETSOV SA, FRIEDENTEIN AJ, ROBEY PG. **Factors required for bone marrow stromal fibroblast colony formation *in vitro*.** Br J Haematol 1997, 97:561-570.
68. KUZNETSOV SA, et al. **Circulating skeletal stem cells.** J Cell Biol. 2001, 153:1133-1140.
69. LAZARUS HM, et al. **Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients.** Biol Blood Marrow Transplant 2005, 11:389-398.
70. LE BLANCK K, et al. **HLA expression and immunological properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells.** Exp Hematol 2003, 31:890-896.
71. LE NOBLE FAC, et al. **Angiogenesis and hypertension.** J Hypertens 1998, 16:1563-1572.
72. LE NOBLE JL, et al. **A functional morphometric study of the cremaster muscle microcirculation in young spontaneously hypertensive rats.** J Hypertens 1990, 8:741-748.
73. LEVY D, et al. **Genome-wide association study of blood pressure and hypertension.** Nature Genetics 2009, 41:677-687.

74. LI HS, CHEN JW, ZHU LL. **Continuous hypoxia improves the proliferation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells *in vitro*.** Basic Med Sci Clin 2005, 25:268-271.
75. LIN SZ, et al. **Cerebral capillary bed structure of normotensive and chronically hypertensive rats.** Microvasc Res 1990, 40:341-357.
76. MAKINO S, et al. **Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*.** J. Clin. Invest. 1999, 103:697-705.
77. MASUTOMI K, YU EY, KHURTS S, et al. **Telomerase maintains telomere structure in normal human cells.** Cell 2003, 114:241-253.
78. MEIRELLES LS, CAPLAN AI, NARDI NB. **In Search of the In Vivo Identity of Mesenchymal Stem Cells.** Stem Cells 2008, 26:2287-2299.
79. MEIRELLES LS, CHAGASTELLES PC, NARDI NB. **Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues.** Journal of Cell Science 2006, 119:2204-2213.
80. MUGURAMA Y, et al. **Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment.** Blood 2006, v. 107, p. 1878-1887.
81. MUSINA RA, BEKCHANOVA ES, SUKHIKH GT. **Comparison of mesenchymal stem cells obtained from different human tissues.** Bull Exp Biol Med 2005, 139:504-509.
82. MYLOTTE L A, et al. **Metabolic flexibility permits mesenchymal stem cell survival in an ischemic environment.** Stem Cells 2008,
83. NAGAYA N, FUJII T, IWASE T, 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, 287:H2670-2676.
84. NARDI NB, MEIRELLES LS. **Mesenchymal Stem Cells: Isolation, In Vitro Expansion and Characterization.** HEP 2006, 174:249-282.
85. NAUTA A J, e FIBBE W. **Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells.** Blood, 2007; 110:3499-3506.
86. NEUHUBER B, SWANGER SA, HOWARD L, et al. **Effects of plating density and culture time on bone marrow stromal cell characteristics.** Experimental Hematology 2008, 36:1176-1185.
87. NEWTON-CHEH C, et al. **Genome-wide association study identifies eight loci associated with blood pressure.** Nature Genetics 2009, 41:666-676.
88. NOON JP, et al. **Impaired microvascular dilatation and capillary rarefaction in young adults with a predisposition to high blood pressure.** J Clin Invest 1997, 99:1873-1879.
89. OKAMOTO K, AOKI K. **Development of a strain of spontaneously hypertensive rats.** Jap. Cir. J. 1963; 27: 282-293.
90. OSWALD J, et al. **Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro.** Stem Cells 2004, 22:377-384.
91. PARSCH D, FELLEBERG J, BRUMMENDORF TH, et al. **Telomere length and telomerase activity during expansion and differentiation of human mesenchymal stem cells and chondrocytes.** J Mol Med 2004, 82:49-55.
92. PASSOS JF, VON ZGLINICKI T, SARETZKI G. **Mitochondrial dysfunction and cell senescence: cause or consequence?** Rejuvenation Res 2006, 9:64-68.

93. PHINNEY DG, KOPEN G, ISAACSON RL, PROCKOP DJ. **Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used Straits of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation.** J Cell Biochem 1999, 72:570-585.
94. PITTENGER MF, MACKAY AM, BECK SC, et al. **Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.** Science 1999, 284:143-147.
95. PROCKOP DJ. **Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues.** Science 1997, 276:71-74.
96. RICHARDSON RL, HAUSMAN GJ, CAMPION DR. **Response of pericytes to thermal lesion in the inguinal fat pad of 10-day-old rats.** Acta Anat (Basel) 1982, 114:41-57.
97. ROCHEFORT GY, DELORME B, LOPEZ A, et al. **Multipotential mesenchymal stem cells are mobilized into peripheral blood by hypoxia.** Stem Cells 2006, 24:2202-2208.
98. ROSOVÁ I, DAO M, CAPOCCIA B, LINK D, NOLTA JA. **Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells.** Stem Cells 2008, 26:2173-2182.
99. RYU E, HONG S, KANG J, et al. **Identification of senescence-associated genes in human bone marrow mesenchymal stem cells.** Biochem Biophys Res Commun 2008, 371:431-436.
100. SABRI A, SAMUEL JL, MAROTTE F, POITEVIN P, RAPPAPORT L, LEVY BI. **Microvasculature in angiotensin II-dependent cardiac hypertrophy in the rat.** Hypertension 1998, 32:371-375.
101. SCHLONDORFF, D. **The glomerular mesangial cell: An expanding role for a specialized pericyte.** FASEB J 1987, 1:272-281.

102. SHAHDADFAR A, FRONSDAL K, HAUG T, et al. **In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability.** *Stem Cells* 2005, 23:1357-1366.
103. SHIBATA K R, AOYAMA T, SHIMA Y, et al. **Expression of the p16INK4A gene is associated closely with senescence of human mesenchymal stem cells and is potentially silenced by DNA methylation during in vitro expansion.** *Stem Cells* 2007, 25:2371-2382.
104. SIMONSEN JL, ROSADA C, SERAKINCI N, et al. **Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells.** *Nat Biotechnol* 2002, 20:592-596.
105. STENDERUP K, JUSTESEN J, CLAUSEN C, KASSEM M. **Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells.** *Bone* 2003, 33:919-926.
106. STOLZING A, JONES E, MCGONALE D, SCUTT A. **Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies.** *Mech Ageing Dev* 2008, 129:163-173.
107. STRAUER BE, KORNOWSKI R. **Stem Cell Therapy in Perspective.** *Circulation* 2003, 107:929-934.
108. TAKEUCHI M, TAKEUCHI K, KOHARA A, et al. **Chromosomal instability in human mesenchymal stem cells immortalized with human papilloma virus E6, E7, and hTERT genes.** *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2007, 43:129-138.
109. THOMAS CJ, RANKIN AJ, HEAD GA, WOODS RL. **ANP enhances bradycardic reflexes in normotensive but not spontaneously hypertensive rats.** *Hypertension* 1997, 5:1126-1132.

110. TOMA C, et al. **Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart.** *Circulation* 2002, 105:93-98.
111. TONDREAU T, MEULEMAN N, DELFORGE A, et al. **Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilizes peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression and plasticity.** *Stem Cells* 2005, 23; 1105-1112.
112. TRIPPODO NC, FROHLICH ED. **Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat.** *Circulation Research* 1981, 48(3):309-19.
113. VON ZGLINICKI T. **Oxidative stress shortens telomeres.** *Trends Biochem Sci* 2002, 27:339-344.
114. WAGNER W, HORN P, et al. **Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process.** *PLoS ONE* 2008, 3 (5): e2213.
115. WANG CH, CHERNG WJ, YANG NI, et al. **Late-outgrowth endothelial cells attenuate intimal hyperplasia contributed by mesenchymal stem cells after vascular injury.** *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008; 28, 54-60.
116. 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; 315:363-368.
117. WANG Q-R, YAN Z-J, WOLF NS. **Dissecting the hematopoietic microenvironment. VI. The effects of several growth factors on the growth of murine bone marrow CFU-F.** *Exp Hematol* 1990, 18:341-347.
118. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension: Guidelines Subcommittee. J.** *Hypertens.* 1999, 17:151-183.
119. YAMORI Y. **Development of the spontaneously hypertensive rats (SHR) and of various spontaneous rat models and their implications.** In: De Jong W.

- Experimental and genetic models of hypertension. Handbook of Hypertension.**
Elsevier Science, 1994.
120. YANEZ R, LAMANA M L, GARCIA-CASTRO J, et al. **Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (AD-MSC) have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of graft-versus-host disease (GVHD).** Stem Cells 2006, 24:2582-2591.
121. YIN T e LI L. **The stem cell niches in bone.** The Journal of Clinical Investigation 2006, 116:1195-1201.
122. ZAPPIA E, CASAZZA S, PEDEMONTE E, et al. **Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy.** Blood 2005, 106:1755-1761.
123. ZUK PA, ZHU M, MIZUNO H, et al. **Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies.** Tissue Eng, 2001; 7: 211-228.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)