



TÂNIA MARIA ROCHA GUIMARÃES

**PERFIL DE EXPRESSÃO DE CÉLULAS PROGENITORAS
ENDOTELIAIS CIRCULANTES CD45⁻/CD34⁺/KDR⁺ EM MULHERES
HIPERTENSAS NA PRÉ-MENOPAUSA EM COMPARAÇÃO COM
MULHERES SAUDÁVEIS NORMOTENSAS.**

**EXPRESSION PROFILE OF CIRCULATING ENDOTHELIAL
PROGENITOR CELLS CD45⁻/CD34⁺/KDR⁺ IN HYPERTENSIVE
PREMENOPAUSAL WOMEN COMPARED WITH HEALTHY
NORMOTENSIVE WOMEN.**

Campinas, 2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

TÂNIA MARIA ROCHA GUIMARÃES

**PERFIL DE EXPRESSÃO DE CÉLULAS PROGENITORAS
ENDOTELIAIS CIRCULANTES CD45⁻/CD34⁺/KDR⁺
EM MULHERES HIPERTENSAS NA PRÉ-MENOPAUSA EM
COMPARAÇÃO COM MULHERES SAUDÁVEIS NORMOTENSAS.**

Orientadora: Dra. Cristina Pontes Vicente
Coorientadora: Dra. Patrícia Muniz Mendes Freire de Moura

**EXPRESSION PROFILE OF CIRCULATING ENDOTHELIAL
PROGENITOR CELLS CD45⁻/CD34⁺/KDR⁺ IN HYPERTENSIVE
PREMENOPAUSAL WOMEN COMPARED WITH HEALTHY
NORMOTENSIVE WOMEN.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor em Biologia Celular e Estrutural, na área de Biologia Celular.

Doctorate thesis presented to the State University of Campinas in fulfillment of the requirements for the degree of Doctor on Cellular and Structural Biology Postgraduate Programme, in the Biology Institute, in the area of Cellular Biology.

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pela aluna **Tânia Maria Rocha Guimarães** e orientada pela Dra. Cristina Pontes Vicente.


Assinatura da Orientadora

Campinas, 2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

G947p Guimarães, Tânia Maria Rocha, 1963-
Perfil de expressão de células progenitoras endoteliais circulantes CD45/
CD34⁺/KDR⁺ em mulheres hipertensas na pré-menopausa em comparação com
mulheres saudáveis normotensas / Tânia Maria Rocha Guimarães. – Campinas,
SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Cristina Pontes Vicente.

Coorientador: Patrícia Muniz Mendes Freire de Moura.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Células endoteliais. 2. Células-tronco. 3. Hipertensão. 4. Síndrome
metabólica. I. Vicente, Cristina Pontes, 1965-. II. Moura, Patrícia Muniz Mendes
Freire de. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Expression profile of circulating endothelial progenitor cells CD45/
CD34⁺/KDR⁺ in hypertensive premenopausal women compared with healthy normotensive
women

Palavras-chave em inglês:

Endothelial cells

Stem cells

Hypertension

Metabolic syndrome

Área de concentração: Biologia Celular

Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Cristina Pontes Vicente [Orientador]

Robson de Queiroz Monteiro

Simone Maria Muniz da Silva Bezerra

Ana Paula Couto Davel

Silvia Borges Pimentel de Oliveira

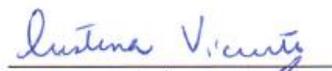
Data de defesa: 11-06-2014

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 11 de Junho de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Cristina Pontes Vicente (Orientadora)


Assinatura

Dr. Robson de Queiroz Monteiro


Assinatura

Dra. Simone Maria Muniz da Silva Bezerra


Assinatura

Dra. Ana Paula Couto Davel


Assinatura

Dra. Silvia Borges Pimentel de Oliveira


Assinatura

Dr. Arnaldo Rodrigues dos Santos Júnior

Assinatura

Dra. Ana Leda Figueiredo Longhini

Assinatura

Dra. Taize Machado Augusto

Assinatura

RESUMO

As células progenitoras endoteliais (EPCs) estão envolvidas em neovascularização e na manutenção da homeostase vascular, sua deficiência pode ter papel na patogênese da hipertensão. Este estudo teve como objetivo analisar o perfil de expressão das EPCs circulantes e diferentes fatores de risco cardiovascular em mulheres hipertensas, na pré-menopausa, em comparação com mulheres normotensas saudáveis. Realizou-se um estudo caso-controle com 45 mulheres voluntárias, faixa etária de 30 a 50 anos (41 ± 6) no Ambulatório do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco. As EPCs definidas como $CD45^-/CD34^+/KDR^+$ foram coletadas em sangue venoso periférico e analisadas por citometria de fluxo. As mulheres foram classificadas como controles (CT) saudáveis normotensas com PAS (pressão arterial sistólica) < 130 mmHg e PAD (pressão arterial diastólica) < 85 mmHg ($n=15$), com hipertensão primária: a) Leve (HL) PAS= $140-159$ mmHg e PAD= $90-99$ mmHg ($n=15$) e b) Severa (HS) PAS > 180 mmHg e PAD > 110 mmHg ($n=15$). Os grupos foram entrevistados quanto aos hábitos de fumo, prática de exercícios físicos e Índice de Massa Corporal (IMC), sendo aferido o nível da PA em repouso. Realizou-se análise nos prontuários dos resultados dos exames séricos de colesterol total, lipoproteínas de alta densidade-colesterol (HDL-c), lipoproteínas de baixa densidade-colesterol (LDL-c), triglicerídeos e glicemia de jejum, no mês da coleta das amostras sanguíneas. Os resultados comprovaram redução significativa ao número de EPCs no HL (74%) e HS (88%) *versus* CT; e redução de 67% no HS *versus* HL, evidenciando relação inversa entre o número de células e o estágio da hipertensão. O grupo HS apresentou aumento de 49% de células $CD45^+$ demonstrando padrão inflamatório e redução de 61% de $CD45^-/CD34^+$. Quanto aos níveis séricos verificou-se: HDL-c [HL (52 ± 7); HS (48 ± 5)]; LDL-c [HL (130 ± 8); HS (143 ± 15)]; triglicerídeos [HL (138 ± 19); HS (153 ± 40)]; glicemia de jejum [HL (95 ± 7); HS (121 ± 39)] e IMC [HL (31 ± 4); HS (29 ± 3)]; revelando que 67% das mulheres com hipertensão severa apresentavam síndrome metabólica (SM). O desenvolvimento da hipertensão e da SM foi diretamente correlacionado com a diminuição das EPCs. Portanto, a contagem de EPCs pode ser considerada um marcador biológico adequado para indicar a gravidade do estado hipertensivo em mulheres.

Palavras-chaves: Células endoteliais, Células-tronco, Hipertensão; Síndrome metabólica.

ABSTRACT

Endothelial progenitor cells (EPCs) are involved in neovasculogenesis and maintenance of vascular homeostasis and their impairment may have a role in the pathogenesis of hypertension. This study aimed analyzes the expression profile of circulating EPCs and different cardiovascular risk factors in hypertensive premenopausal women compared with healthy normotensive women. A case-control study was conducted enrolling 45 women volunteers, aged from 30- 50 years (41 ± 6) in Ambulatory of the Cardiologic Emergency Hospital of Pernambuco. EPCs numbers were determined by flow cytometry in peripheral blood as the $CD45^-/CD34^+/KDR^+$ cells. The women were classified as healthy normotensive controls (CT) with SBP (systolic blood pressure) <130 mmHg and DBP (diastolic blood pressure) < 85 mmHg ($n=15$), and with essential hypertension; a) mild (MH), SBP= $140-159$ mmHg and DBP= $90-99$ mmHg ($n=15$); and b) severe (SH), SBP >180 mmHg and DBP >110 mmHg ($n=15$). The group were interviewed regarding smoking habits, physical exercise and body mass index (BMI), and measured the level of blood pressure at quiescent. An analysis in records of test results cholesterol, high density lipoprotein-cholesterol (HDL-c), low density lipoprotein-cholesterol (LDL-c), triglycerides and fasting glucose in the month of collection of blood samples. The results found a significant reduction in circulating EPCs numbers in MH (74%) and SH (88%) when compared to the CT and reduction of 67% in SH when compared to MH, an inverse relationship between the number of cells and the stage of hypertension. SH group showed an increase of 49% $CD45^+$ cells demonstrating inflammation and reduction of 61% $CD45^-/CD34^+$ cells. Regarding the biochemical serum was found: HDL-c [MH (52 ± 7); SH (48 ± 5)]; LDL-c [MH (130 ± 8); SH (143 ± 15)]; triglycerides [MH (138 ± 19); SH (153 ± 40)]; fasting glucose [MH (95 ± 7); SH (121 ± 39)] and BMI [MH (31 ± 4); SH (29 ± 3)]; revealing that 67% of women with severe hypertension had metabolic syndrome (MS). Development of hypertension and the parameters related to MS are directly correlated with a decrease of circulating EPCs. Therefore, the EPCs counting may be considered a suitable biological marker to follow up the evolution of the hypertensive state in women.

Keywords: Endothelial cells, Stem cells, Hypertension; Metabolic syndrome.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Células progenitoras endoteliais: Mecanismos de migração e diferenciação.....	3
1.2 Células progenitoras endoteliais, óxido nítrico e fator de crescimento endotelial vascular.....	9
1.3 Hipertensão arterial sistêmica.....	13
1.4 O Controle do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona.....	17
1.5 Hipertensão e mecanismos inflamatórios.....	18
1.6 Síndrome metabólica.....	21
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo geral.....	29
2.2 Objetivos específicos.....	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Desenho do estudo.....	33
3.2 Local do estudo.....	33
3.3 População e amostra.....	33
3.4 Seleção dos participantes.....	34
3.5 Definição das variáveis.....	34
3.5.1 Variáveis desfechos.....	34
3.5.2 Variáveis dependentes.....	35
3.5.3 Variáveis independentes.....	35
3.5.4 Variáveis controles.....	36
3.6 Aspectos operacionais.....	37
3.7 Técnica de citometria de fluxo.....	38
3.8 Protocolo de imunomarcção celular.....	39
3.9 Quantificação das EPCs circulantes por citometria de fluxo.....	40
3.10 Análise estatística.....	42
3.11 Riscos e benefícios.....	42
4 RESULTADOS	43
4.1 Caracterização da população do estudo e fatores de risco cardiovascular.....	45
4.2 Quantificação das células mononucleares circulantes CD45 ⁻ /CD45 ⁺	45
4.3 Quantificação das células progenitoras endoteliais circulantes.....	46
5 DISCUSSÃO	59

6 CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS	73
APÊNDICES	83
A- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	85
B- Instrumento para coleta de dados.....	87
C- Artigo submetido.....	89
ANEXOS	109
A- Parecer CEP FCM/UNICAMP	111
B- Parecer CEP-HUOC/PROCAPE	113
C- Carta de Anuência PROCAPE.....	115
D- Deferimento do CEP-FCM-UNICAMP.....	117

DEDICATÓRIA

Aos meus pais *Daniel e Eunice* (in memoriam) pelos exemplos de vida e ensino da ética cristã evangélica; valores como integridade, dignidade e verdade foram alicerces de minha formação e orientação pelos caminhos árduos da vida.

À *Eunice Rocha Guimarães, analista de finanças e controle*, primeira mulher a entrar por concurso público na Receita Federal de Recife.....em uma época em que as mulheres mal podiam estudar....me lembro de minha mãe fazendo de madrugada o balancete anual da Receita Federal (sem calculadoras...apenas sua mente, grandes cadernos de capa dura, lápis, borracha e muitos números anotados em colunas.....e anos depois com calculadoras....que ela dizia ser mais fácil de errar). Com seu exemplo e independência mostrou para suas seis filhas que o conhecimento é libertador:

- Cássia tornou-se professora licenciada em ciências sociais e pedagogia; pós-graduada em psicopedagogia/Universidade Católica de Pernambuco. Exerceu a função de diretora dos Colégios Batistas de São Luís e de Recife. Hoje exerce o cargo de Ministra da Família na Igreja Batista da Capunga e realiza Terapia de Casais e Família em consultório.
- Evanir, relações públicas, agente de telecomunicações e eletricidade concursada do extinto Departamento de Telecomunicações (DENTEL);
- Elenice, médica pediatra/Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), concursada do Hospital das Clínicas/UFPE, especialista em gestão da clínica do SUS/Instituto Sírio Libanês, exerceu a função de diretora do Hospital Agamenon Magalhães, atualmente Coordena a Regulação dos Exames de Alta Complexidade.
- Eliane, médica pediatra/UFPE, concursada do Hospital Correia Picanço (HCP) e do Núcleo de Epidemiologia (NEPI)/MS, mestre em saúde pública pelo Centro de Pesquisas Aggeu Magalhaes-Fiocruz-PE, atual gerente do NEPI/HCP;
- Edilene, arquiteta/UFPE, professora de desenho concursada do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco (IFPE), doutora em educação/ UFPE, pós-doutorado em educação/Universidade do Minho-PT; atual Pró-reitora de Ensino do IFPE.

Que nosso exemplo seja seguido por nossas filhas!

AGRADECIMENTOS

À Deus, fonte de amor e luz, por sempre cuidar de mim, me abençoar e proteger, e especialmente por ter me concedido ajuda necessária para finalização desse estudo;

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural da Universidade Estadual de Campinas, em especial, aos mestres pelo excelente curso oferecido;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Programa de Doutorado Interinstitucional - Novas Fronteiras (DINTER-NF) por viabilizar o curso de doutorado e ao auxílio financeiro concebido;

À Dra. Cristina Pontes Vicente por ter aceitado ser minha orientadora, por sua competência, inteligência, simplicidade, exemplo de dedicação à pesquisa e ao ensino; por fazer desabrochar em mim a paixão pela bioquímica, especificamente pelos receptores celulares;

À Dra. Patrícia Muniz Mendes Freire de Moura - co-orientadora - por sua ajuda fundamental nos momentos cruciais deste estudo, da viabilização do local da pesquisa e análise dos resultados em Recife;

À Dra. Valéria Rêgo Alves Pereira, Departamento de Imunologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhaes-Fiocruz-PE, por viabilizar a análise dos resultados da pesquisa.

Em especial, à Dra. Maria Carolina Accioly Brelaz-de-Castro do Laboratório de Imunogenética do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhaes-Fiocruz-PE, por sua amizade, pelo ensino e realização da citometria de fluxo, pelo ensino do seu protocolo de imunomarcção celular de forma simples e eficiente.

Ao estatístico George Tadeu Nunes Diniz, do Centro de Pesquisas Ageu Magalhães Fiocruz, pelas orientações e avaliação estatística;

Ao Laboratório de Aterosclerose, Trombose e Terapia Celular da UNICAMP por ter viabilizado esta pesquisa, e especialmente às colegas Giane e Juliana pela amizade e compartilhamento da teoria sobre as células-tronco;

Ao Dr. Cláudio C. Werneck e aos colegas do Laboratório de Fibras Elásticas da UNICAMP pelo acolhimento e incentivo durante a fase de qualificação da pesquisa;

Ao Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco, funcionários do Ambulatório de Hipertensão pelo acolhimento e por ceder o campo de pesquisa;

À Fundação de Hemoterapia e Hematologia de Pernambuco (HEMOPE), em especial a Ms. Valderez Ribeiro de Andrade, Gerente de Enfermagem, e Maria de Fátima Dias, Supervisora de Enfermagem de pacientes externos, pelo apoio e liberação para participar do doutorado em Campinas;

Às mulheres hipertensas que consentiram a realização deste estudo, cederam amostras sanguíneas e retornaram com interesse para saber dos resultados, muito obrigada!

A Paulo Fernando (irmão) por suas luta diária contra suas doença.....que me fortalece e ensina que nunca devo desistir...que sempre é possível melhorar, mudar e recomeçar!

À minha filha Camilla e neta Violeta pelo amor que nos une.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Mobilização das células progenitoras endoteliais da medula óssea.	5
Figura 2	Mecanismos de ativação do óxido nítrico pelo fator de crescimento endotelial vascular e fator de células derivadas do estroma-1 no tecido isquêmico e na medula óssea.	6
Figura 3	Mecanismo de angiogênese e vasculogênese. Sequência de múltiplos passos: mobilização, proliferação, diferenciação, quimiotaxia, migração e adesão das células progenitoras endoteliais.	8
Figura 4	Efeito do exercício físico no reparo endotelial.	11
Figura 5	Classificação da pressão arterial de acordo com a medida casual no consultório. Indivíduos adultos maiores de 18 anos.	14
Figura 6	Esquema de ativação da enzima óxido nítrico sintase endotelial pelo estradiol.	16
Figura 7	Fisiopatologia das lesões vasculares induzidas pela angiotensina II e pela aldosterona.	20
Figura 8	Definições de síndrome metabólica.	22
Figura 9	Agrupamento dos componentes da síndrome metabólica e risco cardiovascular.	25
Figura 10	Esquema teórico da técnica de citometria de fluxo e do gráfico de dispersão e densidade celular.	39
Figura 11	Protocolo de imunomarcção celular.	40
Figura 12	Painel representativo da técnica de citometria de fluxo.	41
Figura 13	Programa CellQuest e análise das células progenitoras endoteliais circulantes. Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães-Recife-2013.	41
Figura 14	Análise por citometria de fluxo das células mononucleares circulantes imunomarcadas CD45 ⁻ /CD45 ⁺ da população de mulheres normotensas e hipertensas do estudo. Recife, Pernambuco, Brasil, 2013.	52
Figura 15	Gráfico do número de células mononucleares circulantes imunomarcadas CD45 ⁻ /CD34 ⁺ , CD45 ⁻ /KDR ⁺ e EPCs (CD45 ⁻ /CD34 ⁺ /KDR ⁺) da população de mulheres normotensas e hipertensas do estudo. Recife, Pernambuco, Brasil, 2013.	55

- Figura 16** Gráfico do percentual de células mononucleares circulantes imunomarcadas CD45⁻/CD34⁺, CD45⁻/KDR⁺ e EPCs (CD45⁻/CD34⁺/KDR⁺) da população de mulheres normotensas e hipertensas do estudo. Recife, Pernambuco, Brasil, 2013. **55**
- Figura 17** Análise por citometria de fluxo das células mononucleares circulantes imunomarcadas CD45⁻/CD34⁺, CD45⁻/KDR⁺ e EPC (CD45⁻/CD34⁺/KDR⁺) da população de mulheres normotensas e hipertensas do estudo. Recife, Pernambuco, Brasil, 2013. **56**
- Figura 18** Análise estatística das células mononucleares circulantes imunomarcadas CD45⁻/CD34⁺, CD45⁻/KDR⁺ e EPC (CD45⁻/CD34⁺/KDR⁺) pelo Programa CellQuest da população de mulheres normotensas e hipertensas do estudo. Recife, Pernambuco, Brasil, 2013. **57**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Fatores de risco cardiovascular da população de mulheres normotensas e hipertensas do estudo. Recife, Pernambuco, Brasil, 2013.	47
Tabela 2	Parâmetros séricos bioquímicos da população de mulheres normotensas e hipertensas do estudo. Recife, Pernambuco, Brasil, 2013.	48
Tabela 3	Parâmetros séricos bioquímicos e síndrome metabólica da população de mulheres normotensas e hipertensas do estudo. Recife, Pernambuco, Brasil, 2013.	49
Tabela 4	Expressão do número de células mononucleares circulantes imunomarcadas CD45 ⁻ /CD45 ⁺ da população de mulheres normotensas e hipertensas do estudo. Recife, Pernambuco, Brasil, 2013.	50
Tabela 5	Expressão do percentual de células mononucleares circulantes imunomarcadas CD45 ⁻ /CD45 ⁺ da população de mulheres normotensas e hipertensas do estudo. Recife, Pernambuco, Brasil, 2013.	51
Tabela 6	Expressão do número de células mononucleares circulantes imunomarcadas CD45 ⁻ /CD34 ⁺ , CD45 ⁻ /KDR ⁺ e EPCs (CD45 ⁻ /CD34 ⁺ /KDR ⁺) da população de mulheres normotensas e hipertensas do estudo. Recife, Pernambuco, Brasil, 2013.	53
Tabela 7	Expressão do percentual de células mononucleares circulantes imunomarcadas CD45 ⁻ /CD34 ⁺ , CD45 ⁻ /KDR ⁺ e EPCs (CD45 ⁻ /CD34 ⁺ /KDR ⁺) da população de mulheres normotensas e hipertensas do estudo. Recife, Pernambuco, Brasil, 2013.	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADH - Hormônio Antidiurético
Ang II - Angiotensina II
AKT - Via de sinalização serina/treonina-específica da proteína cinase B
AMPK- Monofosfato de Adenosina ativados por Proteína Cinase
AP-1 - Ativador da Proteína-1
AT1 - Receptor 1 da Angiotensina II
CT- Grupo Controle
CTGF- Fator de Crescimento do Tecido Conjuntivo
CXCL4 - Quimiocina (padrão-C-X-C) ligante 4
CXCL12 - Quimiocina (padrão-C-X-C) ligante 12
c-Kit - Receptor c-Kit
DAG - Diacilglicerol
DAC- Doenças do Aparelho Circulatório
DCV- Doenças Cardiovasculares
DM2 - Diabetes Mellitus tipo 2
DP- Desvio Padrão
ECA- Enzima Conversora da Angiotensina
EDTA- Ácido Etilenodiamino Tetra Acético
EP- Erro Padrão
EPCs - Células Progenitoras Endoteliais
EPO - Eritropoetina
ERs - Receptores de Estrógenos
ERO - Espécies Reativas de Oxigênio
KDR - Receptor de Domínio de inserção Cinase
FACS - Separador de células por fluorescência ativada
FGF- Fator de Crescimento de Fibroblasto
Fl - Fluorescência celular
Flk-1 - Cinase do fígado fetal 1
FSC - Foto-sensor de Dispersão Frontal
GCs - Guanilato Ciclase solúvel
G-CSF-Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos
GLUT-4 - Transportador de Glicose-4
GMPC - Monofosfato de Guanosina cíclico
Gp: Proteína G
GTP- Trifosfato de Guanosina
HAS - Hipertensão Arterial Sistêmica
HABL- Hemangioblastos
HDL-c - Lipoproteínas plasmáticas de alta densidade-colesterol
HGF- Fator de Crescimento de Hepatócitos
HIF-1-Fator Induzido por hipóxia-1
HL- Grupo de mulheres com hipertensão leve ou em estágio 1
HPCs- Células Progenitoras Hematopoiéticas
HS- Grupo de mulheres com hipertensão severa ou em estágio 3
IDF- International Diabetes Federation
IGF-1- Fator de Crescimento da proteína 1

IL-6- Interleucina 6
IMC- Índice de Massa Corpórea
IP2- Fosfatidil-Inositol-4,5-Bifosfato
IP3- Inositol Trifosfato
IR - Receptor de Insulina
IRS-1 e IRS-2- Substratos do Receptor de Insulina 1 e 2
LDL-c- Lipoproteínas plasmáticas de baixa densidade-colesterol
MEC- Matriz Extracelular
MMP-9- Metaloproteinase da Matriz-9
mKitL- Ligante Kit de membrana
NADPH- Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NCEP-ATPIII-National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III
NF- κ B - Factor Nuclear kappa B
NO - Óxido Nítrico
NOS- Óxido Nítrico Sintase
NOS-1/nNOS- Óxido Nítrico Sintase neuronal
NOS-3/eNOS - Óxido Nítrico Sintase endotelial
OEC – Célula endotelial madura
OMS-Organização Mundial da Saúde
PA- Pressão Arterial
PAI-1- Inibidor do Ativador do Plasminogênio-1
PAS- Pressão Arterial Sistólica
PAD- Pressão Arterial Diastólica
PBS - Tampão Fosfato Salina
PIGF - Fator de Crescimento Placentário
PI3K - Fosfatidil Inositol três Cinase
PL-C- Fosfolipase
SCF- Fator de Célula Tronco
SDF-1- Fator de Células Derivadas do Estroma-1
sKitL - Ligante Kit solúvel
SM - Síndrome Metabólica
SNA - Sistema Nervoso Autônomo
SNAS - Sistema Nervoso Autônomo Simpático
SNC- Sistema Nervoso Central
SOD - Superóxido Dismutase
SRAA-Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
SSC-Foto-Sensor de Dispersão Lateral
TGF- β - Fator de Crescimento Transformante-beta
TIMPs-Inibidores Teciduais de Metaloproteinases
TNF- α - Fator de Necrose Tumoral- α
VLDL - Lipoproteínas plasmáticas de densidade muito baixa
VEGF- Fator de Crescimento Endotelial Vascular
VEGFR1/Flt-1- Receptor-1 do Fator de Crescimento Endotelial
VEGFR2 /Flk-1 Receptor-2 do Fator de Crescimento Endotelial
VEGFR3/Flt-4 - Receptor-3 do Fator de Crescimento Endotelial
vWF - Fator Von Willebrand

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Células progenitoras endoteliais: Mecanismos de migração e diferenciação.

A arquitetura vascular em vertebrado resulta da associação de dois processos distintos: a angiogênese e vasculogênese. A angiogênese é a extensão de uma rede vascular já formada pelo surgimento de novos capilares e proliferação de células previamente diferenciadas; já a vasculogênese é o processo de formação *in situ de* vasos sanguíneos a partir de angioblastos, que migram e se fundem com outras células endoteliais formando novos vasos (EGUCHI, et al.,2007). Entretanto, a medula óssea em adultos é um vasto reservatório de células-tronco capazes de gerar células linhagem-específica, em particular as células progenitoras hematopoiéticas (HPCs) e as células progenitoras endoteliais (EPCs), especificamente, que podem contribuir para o processo de neovascularização e reendotelização (MORISHITA, et al.,2012).

Por vários anos o crescimento e o remodelamento dos vasos sanguíneos em tecidos adultos foram explicados como resultados da capacidade proliferativa e migratória de células endoteliais maduras. O estudo pioneiro de Asahara et al. (1997) desafiou este dogma, quando isolaram e caracterizaram uma população de EPCs circulantes humanas que expressavam antígenos de superfície de células estaminais hematopoiéticas CD34 e de células endoteliais CD309 ou Receptor-2 do Fator de Crescimento Endotelial (*VEGFR-2 Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2*), conhecido como Receptor de Domínio de inserção Cinase (KDR- *Kinase insert Domain Receptor*) e Cinase do Fígado fetal 1 (*Flk-1-Fetal Liver Kinase 1*) que podiam se diferenciar em células endoteliais maduras, migrando da medula óssea para o interior dos vasos sanguíneos providenciando sinais parácrinos às células endoteliais adjacentes (GNECCHI et al.,2008) contribuindo simultaneamente na angiogênese, vasculogênese e na manutenção da integridade vascular (ASAHARA et al.,1997).

Dessa forma, a descoberta das EPCs contribuiu para quebrar o paradigma existente de que a neovascularização em adultos não está restrita a angiogênese, envolvendo também o mecanismo de vasculogênese no período pós-natal (FADINI et al.,2012; MORISHITA, et al.,2012; SINGH et al.,2012; ALBA et al.,2013; PADFIELD et al.,2013).

Existem controvérsias a respeito da origem das EPCs, que representam apenas 0,01-0,0001% da fração de células mononucleares do sangue periférico correspondendo a aproximadamente 70-210 células/ml (MÖBIUS-WINKLER et al.,2009). Acredita-se que as células-tronco hematopoiéticas e as EPCs são derivadas de um precursor comum na medula óssea, o hemangioblasto. Entretanto, diferentes fontes de células-tronco podem se diferenciar em células endoteliais, tais como, as mesenquimais (multipotentes), mielóide (monócitos e macrófagos) e as células-tronco residentes nos tecidos (adiposo, cardíaco e nervoso). Portanto, o conceito de fonte de EPCs circulantes não se limita à medula óssea, podendo ser encontradas em diferentes nichos teciduais (VAN BEEM et al.,2009).

As células-tronco se localizam em um microambiente conhecido como “nicho de células-tronco”, onde ficam em estado indiferenciado e quiescente. Em condições basais, os hemangioblasto permanecem na fase G0 do ciclo celular e ficam associados às células-tronco do estroma na medula óssea. A transformação do estado quiescente para o proliferativo na medula depende de fatores específicos que precedem a mobilização destas células para a circulação (HRISTOV; WEBER, 2004).

O recrutamento das células-tronco do nicho quiescente da medula óssea para o local da injúria vascular (**Figura 1**) tem sido associado com a ativação de proteínases como a elastase, a catepsina G e principalmente da metaloproteinase da matriz-9 (MMP-9). Estas enzimas proteolíticas clivam a matriz extracelular ou as moléculas de adesão dos hemangioblastos sobre as células estromais da medula, que expressam o ligante Kit de membrana (mKitL) ou Fator de Células-Tronco (SCF-*Stem Cell Factor*), que se liga ao receptor c-Kit (CD117) na membrana dos hemangioblastos. A MMP-9 cliva proteoliticamente o mKitL para sKitL (ligante Kit solúvel), o qual interage com o receptor c-Kit nos hemangioblastos produzindo o sinal essencial para diferenciação celular e posterior migração para a circulação (HRISTOV et al., 2003).

Estudo experimental realizado com camundongos deficientes para o gene MMP-9 demonstrou que o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF-*Vascular Endothelial Growth Factor*), o Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos (G-CSF-*Granulocyte Colony Stimulating Factor*) e o Fator de Células Derivadas do Estroma-1 (SDF-1-*Stromal Cell Derived Factor-1* ou CXCL12 - (*Chemokine type C-X-C- ligand 12*) provocaram aumento na concentração plasmática de sKitL, comparado ao grupo de camundongos não

tratados. Estes resultados evidenciaram que estas citocinas têm importante papel na indução da MMP-9, precursor da biossíntese, secreção e mobilização das EPCs da medula óssea para o sangue periférico (URBICH; DIMMELER,2004).

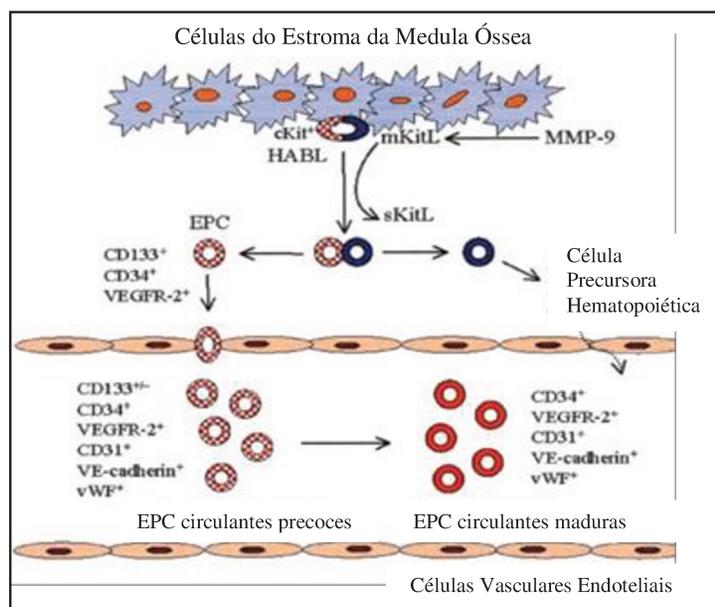


Figura 1: Mobilização da célula progenitora endotelial (EPC) da medula óssea. cKit: Receptor cKit. HABL: Hemangioblastos. mKitL: ligante Kit de membrana. MMP-9: Metaloproteínase da Matriz-9. sKitL: ligante Kit solúvel. VEGFR-2: Receptor 2 do Fator de Crescimento Endotelial Vascular. vWF: Fator Von Willebrand. Adaptado de HRISTOV et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003.

Embora a neovascularização em adultos seja um assunto bastante investigado, os mecanismos de diferenciação das EPCs e direcionamento para o local da lesão ou injúria vascular ainda não estão totalmente compreendidos. O passo inicial deste processo envolve adesão das EPCs às células endoteliais, as quais são ativadas por citocinas, fatores de crescimento, hormônios, situações de hipóxia e isquemia. As EPCs expressam β 2-integrinas, as quais mediam a adesão celular na monocamada de células endoteliais e promovem sua posterior transmigração. Estudos com camundongos deficientes para o gene da β 2-integrina demonstraram reduzida migração celular e baixa capacidade de neovascularização após isquemia (URBICH; DIMMELER, 2004).

Outra possibilidade importante no processo de migração é a atração química conhecida como quimiotaxia. Dado os baixos níveis de EPCs na circulação, acredita-se que a quimiotaxia seja o processo mais importante para o recrutamento destas células para o tecido isquêmico. Evidências têm comprovado que o SDF-1 estimula o recrutamento das EPCs para tecidos isquêmicos (**Figura 2**). A isquemia ou hipóxia estão entre as condições acreditadas de serem mais determinantes para induzir a mobilização das células da medula óssea por induzir o aumento nos níveis do SDF-1 e do VEGF circulantes que estimulam a produção do óxido nítrico (NO), e conseqüentemente promovem a mobilização das EPCs via mecanismo dependente de MMP-9. Além disso, os níveis de VEGF são aumentados durante isquemia e hipóxia atuando como um fator de atração química para as EPCs (BALLIGAND et al.,2009; DAHER et al.,2010; RAVI et al.,2012).

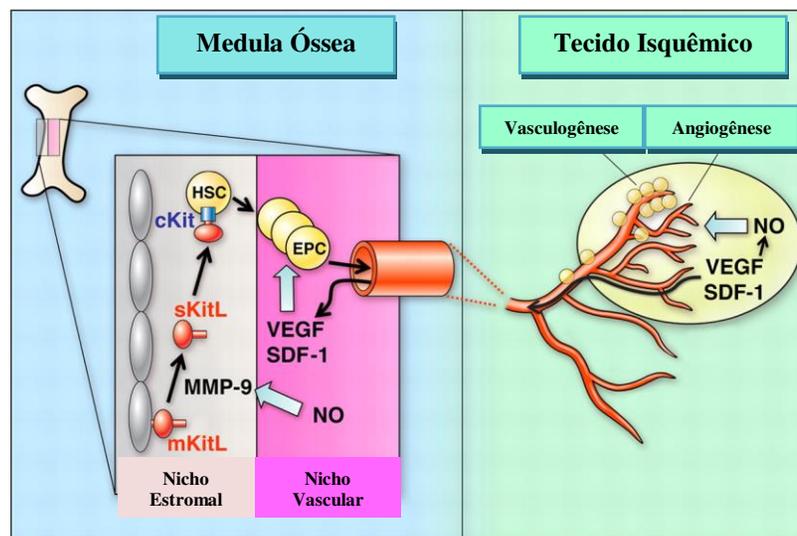


Figura 2: Mecanismos de ativação do óxido nítrico (NO) pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de células derivadas do estroma-1 (SDF-1) no tecido isquêmico e na medula óssea. EPC: Célula Progenitora Endotelial. cKit: Receptor cKit. HSC: Célula Progenitora Hematopoiética. mKitL: ligante Kit de membrana. MMP-9: Metaloproteinase da Matriz-9. sKitL: ligante Kit solúvel. Adaptado de BALLIGAND et al. *Physiol Rev*, 2009.

O VEGF é um dímero proteico sinalizador com ação autócrina e parácrina que ativa os receptores de membrana expressos, principalmente, em células endoteliais. Esta proteína se caracteriza como um dos membros da superfamília de fatores de crescimento, formada por oito resíduos de cisteínas ligadas por pontes dissulfeto. Em humanos foram identificados seis membros: VEGF-A,-B,-C,-D,-E e PlGF (fator de crescimento placentário), sendo o VEGF-A comumente referenciado como VEGF e apresenta um papel mais ativo na angiogênese. Até o presente momento, três diferentes receptores do tipo tirosina cinase para o VEGF têm sido descritos: VEGFR1 ou Flt-1, VEGFR2 ou Flk-1 e VEGFR3 ou Flt-4; a ativação de cada receptor induz efeitos distintos (DAHER et al.,2010).

O KDR ou FLK-1 é o receptor de maior importância na angiogênese, provoca o aumento dos efeitos da permeabilidade vascular ao VEGF, estando envolvido no processo de migração e diferenciação das células endoteliais, quimiotaxia e sobrevivência celular. Entretanto, apresenta uma menor atividade com o VEGF quando comparado ao VEGFR1, porém uma maior atividade sinalizadora através da fosforilação da tirosina desencadeando a mitogênese, enquanto que o VEGFR1 apresenta fraca e indetectável resposta. Dessa forma, o KDR é reconhecido como uma proteína reguladora chave da angiogênese tanto na fase embriogênica como na pós-natal, envolvido na formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes. Além disso, induz a expressão de proteínas anti-apoptose nas células endoteliais, auxilia na formação de capilares e inibe simultaneamente os processos que envolvem sua perda (DAHER et al.,2010).

Portanto, que os mecanismos de migração e diferenciação das EPCs requerem uma sequência de múltiplos passos e eventos de sinalização (**Figura 3**) incluindo a mobilização, proliferação, diferenciação, quimiotaxia, migração, adesão e finalmente a diferenciação em células endoteliais para reparo e formação de novos vasos (IWAMI et al., 2004).

Na circulação periférica dos adultos, três diferentes grupos de EPCs com distintos antígenos de superfície são considerados: CD34⁺/133⁺, CD34⁺/133⁺/KDR⁺ e CD34⁺/KDR⁺. O último grupo é o mais diferenciado, representa 80% das EPCs circulantes, apresentam alta capacidade proliferativa e têm a capacidade angiogênica de formar vasos *in vitro* (FADINI et al.,2012).

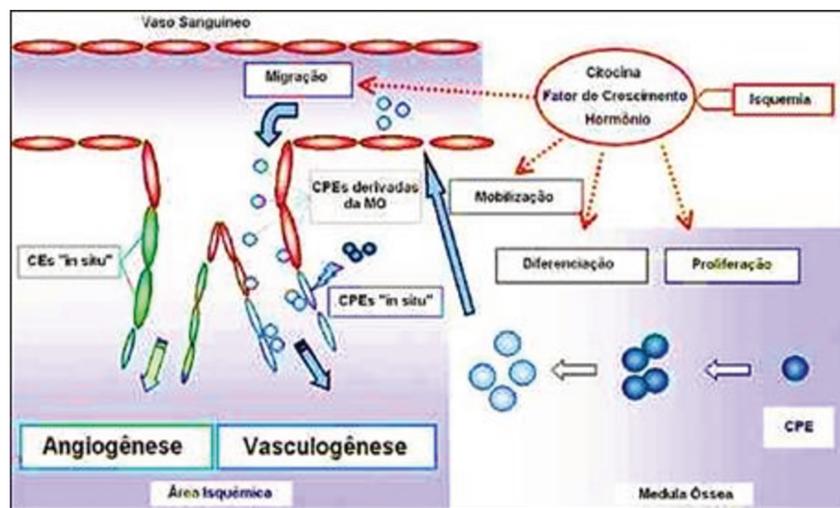


Figura 3: Mecanismo de angiogênese e vasculogênese. Sequência de múltiplos passos e eventos de sinalização incluindo a mobilização, proliferação, diferenciação, quimiotaxia, migração e adesão das células progenitoras endoteliais (CPE ou EPC). CE: célula endotelial. MO: medula óssea. Adaptado de IWAMI et al. J Cell Mol Med, 2004.

Evidências têm demonstrado que as células que expressam o fenótipo $CD34^+/CD133^+/KDR^+$ não são capazes de formar vasos *in vitro*, não se diferenciam em células endoteliais maduras, representando uma forma primitiva de HPCs e expressam o antígeno CD45, que são glicoproteínas expressas exclusivamente na superfície de leucócitos e seus progenitores hematopoiéticos. Em contraste com as células hematopoiéticas, as EPCs maduras não expressam o antígeno CD45. Dessa forma, vários autores consideram que as EPCs maduras podem ser diferenciadas das HPCs pelos marcadores $CD45^-/CD34^+/KDR^+$ (CASE et al.2007; SHANTSILA et al.,2008).

Entretanto, outros marcadores vêm sendo propostos para melhor identificação desta população celular. As EPCs circulantes expressam diferentes marcadores típicos para a linhagem endotelial, as células precoces são definidas pelo fenótipo $CD133^{+/-}/CD14^-/CD31^+$ ou molécula de adesão celular endotelial plaquetária; e as células maduras são caracterizadas por $CD133^-/CD31^+/CD144^+/CD146^+/vWF^+$ (Fator Von Willebrand), $eNOS^+$ (Óxido Nítrico Sintase endotelial) e, por estimulação, a E-selectina⁺ (VAN BEEM et al.,2009). Embora as características que definem a maturação destas células não foram completamente definidas, considera-se que a perda do marcador CD133 nas EPCs maduras faz a distinção das células em estágio precoce (MASOULEH et al.,2010).

1.2 Células progenitoras endoteliais, óxido nítrico e fator de crescimento endotelial vascular.

Muitas moléculas angiogênicas possuem propriedades vasodilatadoras existindo uma interrelação molecular/bioquímica entre vasodilatação, produção de óxido nítrico (NO) e angiogênese. O NO é formado a partir do nitrogênio da guanidina presente na L-arginina sob a ação catalítica da enzima óxido nítrico sintase (NOS) gerando L-citrulina. Esta reação é mediada pela Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato (NADPH) e de co-fatores como flavina adenina dinucleotídeo, flavina mononucleotídeo e tetrahidrobiopterina (MOTA, 2011).

Existem duas isoformas de NOS constitutivas: (1) nNOS (NOS-1), conhecida como NOS neuronal, predominante no tecido neuronal e renal; (2) eNOS (NOS-3), conhecida como NOS endotelial, que liga-se à membrana das células endoteliais regulando o tônus da célula muscular lisa vascular, sendo responsável pela produção do NO endotelial e desempenha importante função no sistema vascular, produzindo vasodilatação, inibição da agregação plaquetária e do crescimento da musculatura lisa, assim como na inibição da adesão de monócitos e leucócitos no endotélio. Ambas as isoformas encontram-se presentes nas células e são estimuladas por uma cascata bioquímica que pode ser dependente ou independente de cálcio (Ca^{2+}) (TSUTSUI et al.,2009; DAHER et al.,2010).

A síntese de NO pelas células endoteliais ocorre a partir de estímulos químicos e físicos. Os estímulos químicos são originados da interação de agonistas endógenos e exógenos com receptores específicos presentes nas células endoteliais, como, por exemplo, a acetilcolina, a serotonina e a histamina. Na célula endotelial, a interação agonista-receptor promove a formação de Inositol Trifosfato (IP3) que, por sua vez, induz a liberação de íons Ca^{2+} do retículo endoplasmático, elevando os níveis de cálcio intracelular, formando o complexo cálcio-calmodulina, ativando a eNOS e conseqüentemente a produção de NO (BALLIGAND et al.,2009).

O NO é um potente vasodilatador e o mediador final da angiogênese estimulado pelo VEGF. Uma vez liberado, difunde-se das células endoteliais para a musculatura lisa do vaso sanguíneo ativando a enzima catalítica Guanilato Ciclase solúvel (GCs). Essa ativação é feita pelo acoplamento do NO com o grupamento heme desta enzima, que irá degradar o

Trifosfato de Guanosina (GTP) formando o Monofosfato de Guanosina cíclico (GMPc). A formação do GMPc promove a ativação da bomba de cálcio dentro da célula muscular lisa, diminuindo as concentrações do cálcio intracelular promovendo a redução do tônus vascular e conseqüentemente a vasodilatação (BALLIGAND et al.,2009).

Por outro lado, o VEGF estimula a eNOS indicando que outras vias independente da concentração intracelular de cálcio estão envolvidas na produção do NO. O aumento da expressão da eNOS envolve a via de sinalização Fosfatidil Inositol três Cinase (PI3K) e a subsequente ativação da AKT (Via de sinalização serina/treonina-específica da proteína Cinase B) (TSUTSUI et al.,2009). Além disso, há estudos que comprovam que o NO estimula a expressão de fatores de crescimento, tal como o VEGF (DAHER et al.,2010), demonstrando uma ação sinérgica entre os dois fatores.

O estímulo físico que produz ativação da eNOS é feito pela força que o sangue exerce sobre a parede das artérias, denominada força de cisalhamento ou *shear stress*. **(Figura 4)**. Evidências têm mostrado que a atividade física produz o aumento da força de cisalhamento na musculatura esquelética ativando proteínas de membrana (proteína Gs, os canais iônicos, a caveolina e as integrinas), que captam as alterações de tensão sobre a parede celular e convertem os estímulos mecânicos em químicos para a ativação da eNOS. As vias envolvidas nesse processo, como a PI3K/AKT, fosforilam a eNOS que passa a produzir NO. O exercício físico aumenta a atividade da enzima antioxidante Superóxido Dismutase (SOD), ou reduz a atividade da NADPH oxidase, aumentando a biodisponibilidade do NO que migra da célula endotelial para a musculatura lisa produzindo GMPc, reduzindo o cálcio intracelular promovendo o relaxamento do músculo liso vascular, reduz a resistência vascular periférica, melhorando o quadro hipertensivo (LAUFS et al., 2005; STEINER et al.,2005; ZANESCO; ZAROS, 2009).

A hipóxia é um dos mais importantes estímulos que iniciam a angiogênese muscular esquelética, produzindo aumento da transcrição do Fator Induzido por Hipóxia (HIF *hypoxia inducible factor*) que estimula a síntese da eNOS e conseqüentemente produção do NO e VEGF alterando o endotélio microvascular promovendo o aumento do número, mobilização e adesão de EPCs circulantes, que se organizam em clusters celulares na área hipoxemiada, e se alinham formando cordões como vasos. O desequilíbrio inicial da pressão parcial de oxigênio pelo aumento do seu consumo estimula a expressão do VEGF,

e conseqüentemente, a proliferação de células endoteliais e a formação de novos vasos sanguíneos (BALLIGAND et al.,2009; DAHER et al.,2010).

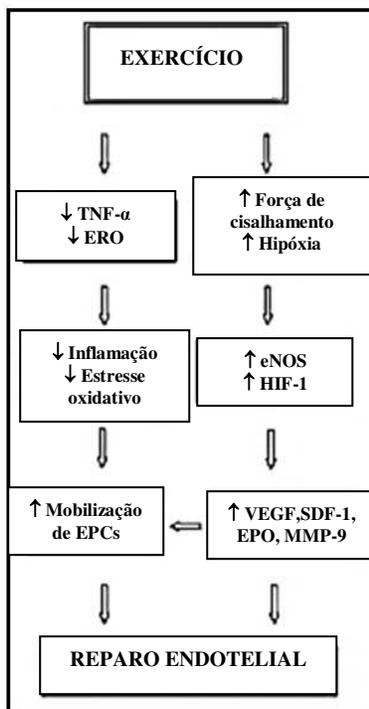


Figura 4: Efeito do exercício físico no reparo endotelial. eNOS: Óxido Nítrico Sintase endotelial. EPCs: Células Progenitoras Endoteliais. EPO: Eritropoetina. ERO: Espécie Reativa de Oxigênio. HIF-1: Fator Induzido por Hipóxia-1. MMP-9: Metaloproteinase da Matriz-9. SDF-1: Fator de Células Derivadas do Estroma-1. TNF- α : Fator de Necrose Tumoral- α . VEGF: Fator de Crescimento Endotelial Vascular. Adaptado de KOKKINOS et al. Circulation, 2010.

Exercícios de longa duração (maratona, corrida de longa distância) são modelos de isquemia fisiológica, porque utilizam o metabolismo glicolítico anaeróbio (VAN CRAENENBROECK et al.,2008), ativando o HIF que estimula a expressão gênica de importantes citocinas que mobilizam as EPCs, tais como VEGF (DAHER et al.,2010). Além disso, os níveis plasmáticos elevados de VEGF foram observados depois deste tipo de exercício e tem sido associado com a presença de hipóxia tecidual, favorecendo o estímulo da mobilização de EPCs e a reparação endotelial. Assim, o aumento dos níveis de VEGF parece demonstrar um mecanismo de adaptação fisiológica ao exercício de longa

duração, sugerindo a existência de uma correlação positiva entre a intensidade do exercício e a liberação de fatores de crescimento (BONSIGNORE et al.,2010).

Exercícios de longa duração são também modelos induzido de inflamação que estimula o aumento dos níveis circulantes de citocinas pró e anti-inflamatórias, promove o aumento significativo da concentração de células progenitoras, em especial as endoteliais, dos leucócitos (GOUSSETIS et al.,2009; BONSIGNORE et al.,2010) e da Interleucina-6 (IL-6) (MARGELI et al.,2005; PEDERSEN; FEBBRAIO, 2008).

A IL-6, conhecida como "citocina gp130", participa do processo inflamatório, sendo considerada uma interleucina responsiva à inflamação. Esta citocina tem sido denominada miocina, visto que a contração de músculos esqueléticos durante exercícios prolongados libera grandes concentrações na circulação (MARGELI et al., 2005; PEDERSEN;FEBBRAIO,2008).

Evidências comprovam que o treinamento físico aeróbio regular produz importantes adaptações autonômicas, hemodinâmicas e estruturais que influenciam o sistema cardiovascular e muscular esquelético provocando a bradicardia em repouso, o aumento do volume sistólico, da capilarização muscular, da condutância vascular sistêmica e do fluxo sanguíneo periférico (THORELL et al., 2009); sendo considerado uma importante terapia para os indivíduos hipertensos por aumentar o aporte sanguíneo, restabelecer a rede microvascular contribuindo para a redução da pressão arterial, na produção de NO e o consequente aumento do número de EPCs circulantes (CESARI et al.,2013).

Entretanto, a capacidade funcional e o número das EPCs podem ser regulados por fatores de crescimento angiogênicos e citocinas em resposta ao dano vascular; e aos fatores de risco para as doenças cardiovasculares (UMEMURA et al., 2007, FADINI et al., 2009a), tais como a hipertensão (OLIVERAS et al.,2008; UMEMURA; HIGASHI,2008), hipercolesterolemia (CHEN et al.,2004; PIRRO et al.,2008), diabetes (FADINI et al.,2007), obesidade (MÜLLER-EHMSSEN et al.,2008; MACENEANEY et al., 2009), sedentarismo (VAN CRAENENBROECK et al., 2010; WITKOWSKI et al.,2010) e síndrome metabólica (FADINI et al.,2009b; JIALAL et al.,2010) apresentando relação inversa entre o número de células e a quantidade de fatores de risco do indivíduo (VASA et al.,2001). Dentre eles, a hipertensão é considerada o principal fator envolvido na diminuição da capacidade migratória das EPCs para a circulação (UMEMURA; HIGASHI, 2008).

1.3 Hipertensão arterial sistêmica

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados da pressão arterial (PA) que envolve a presença de alterações estruturais das artérias e do miocárdio, associadas à disfunção endotelial, vasoconstrição e remodelamento da musculatura lisa vascular. Associa-se frequentemente às alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo (coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos), com conseqüente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não fatais; representando um fator de risco independente e contínuo para as DCV (SBC,2010; BRASIL-Ministério da Saúde, 2011).

A HAS pode ser classificada em primária ou essencial e secundária. A hipertensão essencial corresponde a 95% dos casos e consiste de uma alteração multifatorial condicionada por fatores genéticos e ambientais; a secundária é definida quando os níveis elevados de PA estão associados a outras situações patológicas como a insuficiência renal, hipertensão gestacional, doenças endócrinas, entre outras (WHO, 2009).

Segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC) - *VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão* (2010) - os valores de PA em indivíduos acima de 18 anos que permitem classificar como hipertensão são Pressão Arterial Sistólica (PAS) ≥ 140 mmHg e/ou Pressão Arterial Diastólica (PAD) ≥ 90 mmHg. O diagnóstico deverá ser sempre validado por medidas repetidas, em condições de repouso, em pelo menos três ocasiões. A mortalidade por DCV aumenta progressivamente com a elevação da PA a partir de 115/75 mmHg de forma linear, contínua e independente (SBC,2010).

A classificação diagnóstica da HAS e os estágios de gravidade clínica estão descritos na **Figura 5**. O grupo limítrofe e hipertensão em estágio 1 são os mais prevalentes na população e portanto, são àqueles que mais podem se beneficiar com medidas preventivas e diagnóstico precoce (BRASIL-Ministério da Saúde,2011).

Evidências conferem magnitude da doença hipertensiva em virtude de sua associação com a letalidade precoce das DCV, estando relacionada com 50% das mortes mundiais por Doenças do Aparelho Circulatório (DAC) (cerca de oito milhões de óbitos anuais), 40% das mortes por Acidente Vascular Cerebral e 25% por doença arterial coronariana (WHO, 2009).

CLASSIFICAÇÃO	PRESSÃO SISTÓLICA (mmHg)	PRESSÃO DIASTÓLICA (mmHg)
ÓTIMA	<120	<80
NORMAL	<130	<85
LIMÍTROFE	130-139	85-89
HIPERTENSÃO		
ESTÁGIO I (LEVE)	140-159	90-99
ESTÁGIO II (MODERADA)	160-179	100-109
ESTÁGIO III (SEVERA)	≥180	≥110

Figura 5: Classificação da pressão arterial de acordo com a medida casual no consultório. Indivíduos adultos maiores de 18 anos. Adaptado da SBC, 2010.

As DCV constituem o mais importante grupo de causas de mortalidade na população adulta brasileira. No ano de 2011 ocorreram no país 335.213 óbitos por Doenças do Aparelho Circulatório (DAC), o que representou 28,6% do total de óbitos, seguidos por Neoplasias (15,8%) e Causas Externas (12,4%). Dentre as DAC, verificaram-se Doenças Isquêmicas do Coração (30,9%) das quais 80% foram decorrentes de Infarto; Doenças Cerebrovasculares (30,0%), outras Doenças Cardíacas (19,8%) e Doenças Hipertensivas (13,9%) (DATASUS, 2013).

No Nordeste brasileiro, no ano de 2011, ocorreram 86.348 óbitos por DAC, o que representou 28,7% do total de óbitos, seguidos por Causas Externas (14,7%) e Neoplasias (12,8%); no Sudeste ocorreram 158.491 óbitos por DAC, o que representou 29,2% do total de óbitos, seguidos por Neoplasias (16,6%) e Doenças do Aparelho Respiratório (11,9%) (DATASUS, 2013).

No triênio (2011-2013) foram registrados 3.410.696 internamentos de adultos por DAC, dos quais 382.128 por Acidente Vascular Cerebral não especificado, 255.045 por Hipertensão essencial, 250.790 por Infarto Agudo do Miocárdio, 96.958 por Hemorragias intracranianas e 87.585 por outras Doenças Hipertensivas representando um grande ônus para o sistema de saúde brasileiro (DATASUS, 2013).

Segundo dados do Ministério da Saúde do Brasil, no ano de 2012, existiam no país 18,9% de mulheres hipertensas na faixa etária de 35-44 anos, de 35% (45-54 anos) e de 54,4% (55-64 anos), confirmando que a prevalência da hipertensão aumenta com a idade. Nas regiões brasileiras verificou-se, na faixa de 35-44 anos, a menor prevalência no Norte (14,9%) e a maior no Nordeste (21,8%); nas faixas 45-54 e 55-63 anos verificou-se maior prevalência no Centro-Oeste (37,1% e 57,4%, respectivamente). Na cidade do Recife verificou-se 17,6% de mulheres hipertensas nas faixas 35-44 anos, de 36,7% (45-54 anos) e de 55,5% (55-64 anos) (DATASUS, 2013).

Análises populacionais realizada em 22 cidades brasileiras nos últimos 20 anos identificaram uma prevalência total de HAS entre 22,3 a 43,9% (média 32,5%), na faixa etária 60 e 69 anos (>50%) e acima dos 70 anos (75%). Entre os gêneros, a prevalência foi de 35,8% nos homens e 30% em mulheres, semelhante aos estudos de outros países. Revisão sistemática quantitativa realizada em 44 estudos de 35 países, no período de 2003 a 2008, constatou uma prevalência global de hipertensos 37,8% nos homens e 32,1% em mulheres (SBC,2010).

Acredita-se que a presença de subpopulações de EPCs pode, parcialmente, explicar essa menor prevalência de hipertensão e de eventos cardiovasculares em mulheres na pré-menopausa. Estes achados sugerem que os hormônios ovarianos podem ser responsáveis pela PA mais baixa em mulheres na pré-menopausa (SIMONCINI et al.,2008;VASSALLE et al.,2012).

Os receptores de estrógeno (ERs) são expressos em células endoteliais e tem um efeito ateroprotetor. Através do recrutamento dos ERs, o estradiol provoca ativação da via de sinalização PI3K/AKT (**Figura 6**) que está associada com a fosforilação da eNOS em serina-1177, e ao mesmo tempo, produz ativação do monofosfato de adenosina dependente de proteína cinase (AMPK) aumentando a síntese do eNOS e da prostaciclina, retardando a formação dos ateromas; diminui, ainda, a síntese de citocinas pró-inflamatória circulantes ou residentes do sistema imunológico facilitando a angiogênese (FAVRE et al.,2010).

A prostaciclina é sintetizada a partir do ácido araquidônico através da ciclooxigenase, sendo rapidamente produzida e liberada de células endoteliais em resposta a fatores humorais e hemodinâmicos. Ela age sinergicamente com NO, causando vasodilatação e inibição da agregação e adesão plaquetária. Suas ações são mediadas

através da estimulação da adenilato ciclase e aumento das concentrações intracelulares de adenosina monofosfato cíclico nas células musculares lisas e nas plaquetas. A prostaciclina não parece ser continuamente produzida pelas células endoteliais, mas sintetizada em resposta a estímulos específicos como a bradicinina, a adenosina difosfato, a hipóxia e aumento na força de cisalhamento (SCHULZ et al.,2005).

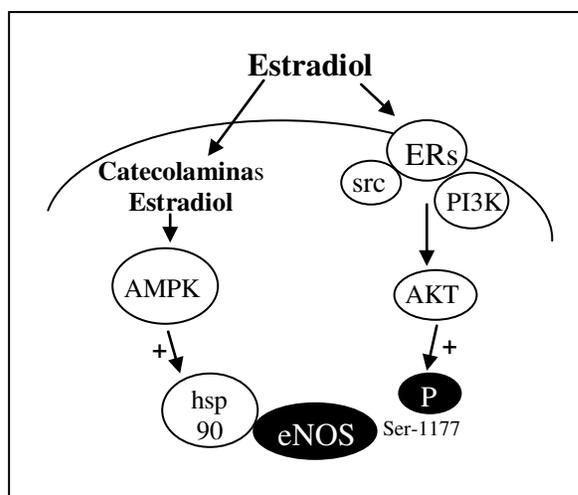


Figura 6: Esquema de ativação da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) pelo estradiol. AMPK: Monofosfato de Adenosina dependente de Proteína Cinase. AKT: Via de sinalização serina/treonina-específica da proteína cinase B. ERs: Receptor de Estrógenos. hsp 90: proteína de choque térmico 90. P: Fosfato. PI3K: Fosfatidil Inositol três Cinase. Ser: Serina. src: coativador de receptor de esteróide. Adaptado de SCHULZ et al. Circulation , 2005.

Semelhantemente, o estrógeno ativa os canais de cálcio dependentes de potássio e induz um rápido aumento na liberação de NO; tem ação antioxidante e antiinflamatórias regulando a síntese da prostaciclina e do VEGF. Por outro lado, inibe a endotelina-1, o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e apoptose de células endoteliais (SIMONCINI et al.,2008). Assim, os efeitos antioxidantes produzidos pelo estrógeno são considerados um dos principais mecanismos pelo qual os hormônios protegem as mulheres durante sua vida fértil, período de menor risco de desenvolvimento das DCV e hipertensão em comparação aos homens (MILLER et al.,2007).

1.4 O Controle do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

A descoberta dos sistemas e mecanismos que influenciam o débito cardíaco e a resistência vascular periférica e, por conseguinte a PA, contribuiu para a construção de uma complexa rede de interrelações na fisiopatologia da HAS. Alterações nos mecanismos de retenção renal de sódio, no sistema nervoso simpático (SNS), no sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), na membrana celular, a hiperinsulinemia, entre outros, são parte dessa rede fisiopatológica complexa (FOURNIER et al.,2012).

O SRAA é descrito como um eixo endócrino no qual cada componente de uma cascata é produzido por diferentes órgãos, um arranjo que é exemplo de interação de vários sistemas orgânicos, engajados todos na luta para manter a estabilidade hemodinâmica. É constituído por quatro proteínas principais: renina, angiotensinogênio, enzima conversora da angiotensina (ECA) e os receptores para a angiotensina II. Todos os componentes do sistema já foram encontrados em tecidos como coração, cérebro, rins, glândulas adrenais, vasos sanguíneos e órgãos reprodutores, permitindo distinguir um SRAA local e um circulante. Tem-se sugerido a existência de um SRAA intracelular, onde seus componentes não seriam secretados e exerceriam suas ações no interior da célula (SANTOS et al.,2012)

No SRAA circulante, a renina de origem renal atua no angiotensinogênio, formado no fígado, requerendo glicorticóides do córtex adrenal e estrógeno das gônadas; originando a angiotensina I, que pela ação da ECA (encontrada no endotélio vascular de vários órgãos) transforma-se na angiotensina II, potente vasoconstritor direto, e que de forma indireta interage com a secreção de aldosterona, com o sistema nervoso central e com o sistema nervoso simpático. Uma vez ativada a cascata, a angiotensina II circula pelo sangue ativando suas estruturas-alvo: vasos sanguíneos (sobretudo arteríolas e veias sistêmicas), rins, coração, adrenais e o sistema nervoso simpático (TOUYZ, 2005).

As ações reguladoras da angiotensina II são mediadas por receptores de superfície celular que estão acoplados por meio da proteína G, fosfolipase C e adenilato ciclase. Existem quatro classes farmacologicamente distintas de receptores para as angiotensinas: AT₁, AT₂, AT₄ e AT₁₋₇. O tipo AT₁ parece ser o mediador das principais ações fisiopatológicas da angiotensina II e é por meio dele que o SRAA influencia a PA (SANTOS et al.,2012).

Os receptores AT₁ estão localizados na membrana plasmática das células-alvo para angiotensina II: células da musculatura lisa vascular, adrenais, miocárdicas e cerebrais. Seu mecanismo de ação inclui a ativação da fosfolipase C, aumento da concentração do cálcio intracelular que por sua vez desencadeia respostas celulares, tais como a estimulação da proteína quinase C e inibição da adenilato ciclase. Efeitos mediados pelo receptor AT₁ incluem a vasoconstrição, síntese e secreção da aldosterona, o aumento da secreção da vasopressina, hipertrofia cardíaca, aumento da atividade noradrenérgica, proliferação de células do músculo liso, diminuição do fluxo sanguíneo renal e inibição da renina, reabsorção tubular renal de sódio, modulação da atividade do sistema nervoso simpático central, contratilidade cardíaca e formação da matriz extracelular (TOUYZ, 2005).

Conclui-se que, a lógica fundamental que preside o funcionamento do SRAA é responder a uma instabilidade hemodinâmica e evitar redução na perfusão tecidual sistêmica. Atua de modo a reverter a tendência à hipotensão arterial através da indução da vasoconstrição arteriolar periférica e aumento na volemia por meio de retenção renal de sódio (através da aldosterona) e água (através da liberação do hormônio antidiurético vasopressina). Portanto, o sistema renina-angiotensina-aldosterona se soma ao sistema simpático e aos hormônios antidiuréticos, compondo o trio de sistemas neuro-hormonais de compensação cardiovascular (FOURNIER et al.,2012).

1.5 Hipertensão e mecanismos inflamatórios

A hipertensão associa-se ao remodelamento vascular, que, entre outras alterações, é caracterizada pela deposição excessiva de proteínas na matriz extracelular (MEC) nos meios vasculares, particularmente fibronectina e colágeno tipo 1, envolvendo a proliferação de células musculares lisa, a acumulação de MEC e inibição da degradação da matriz. O espessamento arterial é reconhecido como uma importante consequência da fibrose vascular estando relacionado com o desenvolvimento da aterosclerose (SHIRWANY; ZOU, 2010), reconhecida como uma das principais causas de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (PADFIELD et al.,2013).

Experimentos *in vivo* demonstraram que a sobrecarga crônica da PA estimula a expressão de genes pró-colágeno e sua síntese proteica. O aumento da síntese de colágeno

em combinação com a diminuição de sua degradação promoveria a fibrose vascular em pacientes hipertensos, que se caracteriza pela redução permanente do diâmetro do lúmen do vaso (SHIRWANY; ZOU, 2010; LAN et al.2013).

Segundo Touyz (2005), a parede vascular sofre alterações funcionais, mecânicas e estruturais em resposta ao estresse hemodinâmico ou biomecânico em hipertensos. Ao nível molecular vários fatores têm sido implicados nesta remodelação, incluindo a ativação do SRAA, o desequilíbrio entre as MMP e dos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) que desempenham um papel fundamental na regulação do colágeno; o fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) e o fator de crescimento de fibroblastos (FGF).

O fator de crescimento transformante-beta (TGF- β) é também expresso durante a remodelação vascular induzido pela hipertensão, regulando a deposição de colágeno na parede arterial, desempenhando um papel crítico na acumulação da MEC e remodelação vascular através da regulação da produção de diversas citocinas, incluindo o CTGF e FGF (LAN et al.2013); sendo altamente expresso por células musculares lisas, macrófagos e células T em lesões ateroscleróticas humanas durante o desenvolvimento de placas de gordura; estimula a quimiotaxia leucocitária e a produção de proteoglicanos pelas células musculares lisas, sendo possível que contribua para a migração inicial de macrófagos e acúmulo de lipídios. Após a injúria endotelial, as plaquetas se aderem ao local liberando grandes quantidades de TGF- β , aumentando a agregação plaquetária, estimulando a sobrevivência das células musculares lisas. O CTGF é induzido pelo estiramento mecânico do vaso e está relacionado com o SRAA porque promove o aumento da AngII, sendo especialmente importante porque pode aumentar a inflamação e promover o remodelamento estrutural vascular (TOUYZ, 2005).

As propriedades pró-inflamatórias da Ang II e da Aldosterona (**Figura 7**) tem sido demonstrada em grandes vasos e pequenas artérias, nos rins, bem como no coração. Ativação do estresse oxidativo é um componente-chave deste processo. AngII e a aldosterona estimulam a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH) no endotélio, nas células musculares lisas e na adventícia dos vasos sanguíneos gerando espécies reativas de oxigênio (ERO), conduzindo à disfunção endotelial, crescimento celular, inflamação, na regulação positiva da endotelina-1, moléculas de adesão, fator nuclear kappa B (NF-kB) e de outros mediadores inflamatórios, assim como no aumento da

degradação do NO e o desacoplamento da NOS, contribuindo para a progressão da doença vascular e aterogênese (KASAL;NEVES,2011).

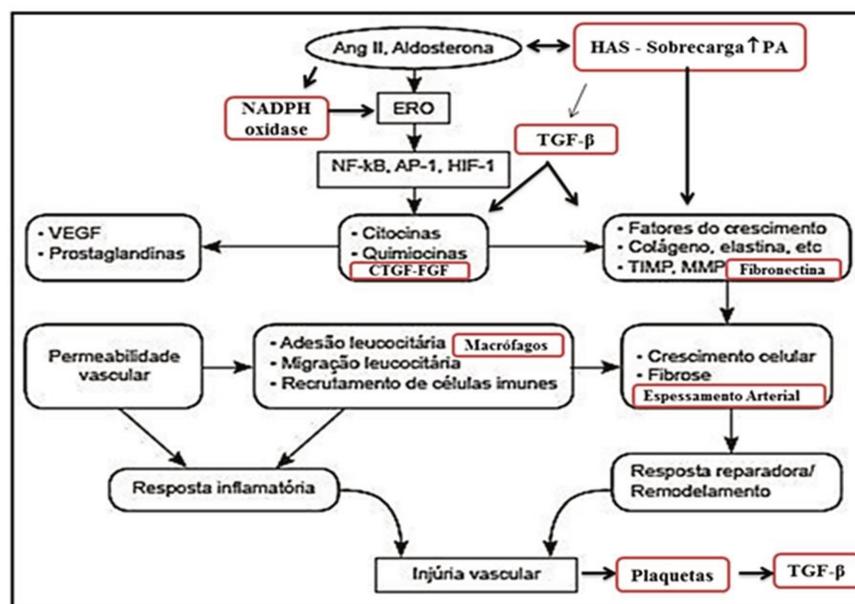


Figura 7: Fisiopatologia das lesões vasculares induzidas pela angiotensina II (Ang II) e pela aldosterona. AP-1: Ativador Proteína-1. CTGF: Fator de Crescimento do Tecido Conjuntivo. ERO: Espécies Reativas de Oxigênio. FGF: Fator de Crescimento de Fibroblastos. HIF-1: Fator Induzido por Hypoxia-1. MMP: Metaloproteinases da Matriz. NF-Kb: Fator Nuclear Kappa B. TIMP: Inibidor Tecidual de Metaloproteinase. TGF-β: Fator de Crescimento Transformante-beta. VEGF: Fator de Crescimento Endotelial Vascular. Adaptado de KASAL; NEVES. Rev. Hospital Universitário Pedro Ernesto, 2011.

Evidências indicam que a hipertensão arterial, por meio de peptídeos vasoativos, tais como a endotelina-1, promove e acelera o processo de aterosclerose por meio de mecanismos inflamatórios. Além disso, avanços recentes sobre o papel da endotelina-1 como um importante mediador de inflamação crônica na parede vascular e sua relação com Ang II têm sido demonstrado. Mecanismos inflamatórios, portanto, são importantes na fisiopatologia das DCV relacionadas com a hipertensão, incluindo a aterosclerose. Nos modelos experimentais, bem como nos estudos humanos, os inibidores da ECA ou bloqueadores do receptor AT₁ da Ang II, demonstraram a capacidade de prevenir ou reverter a progressão da aterosclerose, a qual foi associada com a diminuição da expressão de mediadores inflamatórios e restabelecimento da função endotelial (LAN et al.2013).

Portanto, conclui-se que doença vascular associada à hipertensão é também um processo inflamatório e relaciona-se com o SRAA, estresse oxidativo, fatores de crescimento e secreção de citocinas derivadas do endotélio.

1.6 Síndrome metabólica

A síndrome metabólica (SM) - também conhecida como síndrome X, síndrome da resistência à insulina - é caracterizada pelo agrupamento de fatores de risco cardiovascular como hipertensão; obesidade, especialmente abdominal, com depósitos intra-abdominais de gordura; dislipidemia aterogênica: alto níveis de lipoproteínas plasmáticas de baixa densidade-colesterol (LDL-c), triglicerídeos alto e baixo níveis de lipoproteínas plasmáticas de alta densidade-colesterol (HDL-c) e especificamente por resistência à insulina, hiperinsulinemia, intolerância à glicose ou diabetes do tipo 2 (JIALAL et al.,2010).

A primeira proposta para definição da SM (**Figura 8**) foi elaborada pelo NCEP-ATPIII (*National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III*), em 2001, e preconiza o diagnóstico da síndrome para mulheres na presença de três dos seguintes critérios: HDL-c < 50mg/dL, triglicerídeos ≥ 150 mg/dL, PA $\geq 130 \times 85$ mmHg, glicemia de jejum 110-125 mg/dL e cintura abdominal > 88cm. A segunda, proposta pela IDF (*International Diabetes Federation*), em 2005, reduziu os parâmetros da cintura abdominal para ≥ 80 cm e dos valores limítrofes da glicemia ≥ 100 mg/dL ou DM2 (NCEP,2002).

Entretanto, os mais amplamente reconhecidos fatores de risco da SM são a elevação da pressão arterial, da glicose plasmática e dislipidemia aterogênica. Indivíduos com essas características comumente manifestam um estado pró-trombótico e um estado pró-inflamatório (FADINI et al.,2007; JIALAL et al.,2010).

A dislipidemia aterogênica consiste em uma agregação de anormalidades de lipoproteínas incluindo triglicerídeo sérico elevado e apolipoproteína B, aumento de partículas LDL pequenas, e uma redução do nível de HDL-c (MORISHITA, et al.,2012). As lipoproteínas são macromoléculas esféricas que possui núcleo hidrofóbico contendo triacilgliceróis e ésteres de colesterol, e camada superficial externa hidrofílica que consiste de uma camada de moléculas anfipáticas: colesterol, fosfolípídeos e proteínas (apolipoproteínas); contêm também várias moléculas antioxidantes solúveis em lipídeos (α -tocoferol e vários carotenoides) (MOTTA, 2011).

IDF	NCEP	WHO
Diagnóstico se alteração de glicemia e mais 2 critérios.	Diagnóstico se três dos cinco critérios presentes	Diagnóstico se alteração de glicemia e mais 2 critérios.
Glicemia de jejum 100-125mg/dL ou DM2.	Glicemia de jejum 110-125 mg/dL	Intolerância à glicose, DM2 ou insulino-resistência
CA \geq 80cm	CA \geq 88cm	IMC > 30 e RCQ > 0,85
Tg \geq 150 mg/dL ou HDL < 50	Tg \geq 150 mg/dL ou HDL < 50	Tg \geq 150 mg/dL ou HDL < 39
HAS em tratamento ou PA \geq 130 x 85mmHg	PA \geq 130 x 85mmHg	HAS em tratamento ou PA \geq 160 x 80mmHg Microalbuminúria \geq 20 mcg/min

Figura 8: Definições de SM em mulheres. CA: circunferência abdominal. DM2: diabetes mellitus tipo 2. HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica. IDF: International Diabetes Federation. IMC: Índice de Massa Corpórea. NCEP: US National Cholesterol Education Program. PA: Pressão Arterial. RCQ: relação cintura/quadril. Tg: triglicerídeos. WHO: Word Health Organization. Adaptado de NAKAZONE et al. *Rev. Assoc. Med. Bras*, 2007.

Na SM, a resistência insulínica causa no adipócito um aumento na liberação de ácidos graxos livres, enquanto no fígado determina uma menor supressão na síntese de lipoproteínas plasmáticas de densidade muito baixa (VLDL-Very low-density lipoprotein). O resultado do processo é a liberação de um excesso de partículas de VLDL grandes, ricas em triglicerídeos que por sua vez geram uma cascata de eventos que culminam com a redução nos níveis de colesterol na HDL (FADINI et al.,2009b). Outras alterações tais como a redução da ação da lipoproteína-lipase e o aumento da ação da lipase hepática são também necessárias para a completa expressão fenotípica da tríade lipídica, contribuindo para a transformação da LDL-c em partículas de menor diâmetro e maior densidade, e ainda para a manutenção de um estado de lipemia pós-prandial, com a circulação de lipoproteínas remanescentes ricas em colesterol (MOTTA,2011).

Além disso, os níveis de triglicerídeos têm relação direta com o aparecimento de LDL-c pequenas e densas. A partir de níveis de triglicerídeos de 100mg/dL, este tipo de lipoproteínas já é observado, tornando-se preponderante frente a valores de triglicerídeos de

150-200mg/dl (MORISHITA, et al.,2012). Segundo NCEPATPIII (2002), o ponto de corte para a normalidade dos níveis de triglicerídeos foi reduzido para 150mg/dl. Considerou-se que abaixo deste ponto os níveis de colesterol na VLDL estariam normais (abaixo de 30mg/dl), não haveria excesso de partículas remanescentes de VLDL e quilomícrons e nem haveria excesso de partículas de LDL pequenas e densas.

A remoção das LDL-c da circulação é mediada por receptores de LDL encontrados tanto no fígado como em tecidos extra-hepáticos. Um complexo formado entre a LDL-receptor entra na célula por endocitose, posteriormente as lipases dos lisossomos e proteases degradam as LDL-c. O colesterol liberado é incorporado nas membranas celulares ou é armazenado como ésteres de colesterol. A deficiência de receptores celulares para as LDL desenvolve a hipercolesterolemia familiar, na qual o colesterol fica acumulado no sangue, sendo depositado nas artérias (MOTTA, 2011).

Estudos epidemiológicos mostraram também de forma consistente a correlação independente e negativa entre os níveis de HDL-c e o risco de eventos coronarianos, sendo a redução nos níveis de 1mg/dl associado ao aumento de 2% a 3% no risco cardiovascular. (MORISHITA, et al.,2012). Em termos fisiopatológicos, a explicação para seu efeito protetor é decorrente da habilidade desta lipoproteína em promover a saída do colesterol das células e de realizar seu transporte reverso, permitindo sua redistribuição no organismo e a sua excreção biliar. Também já foi descrita a propriedade antioxidante e antiinflamatória associada à HDL-c, que parece ser decorrente de enzimas e apolipoproteínas associadas às suas partículas, capazes de inativar a oxidação de fosfolípidos provenientes da LDL-c (MOTTA, 2011).

Por outro lado, Fadini et al. (2009b) descrevem que a resistência à insulina é a causa essencial da síndrome metabólica. Não há dúvida de que a resistência à insulina predispõe à hiperglicemia do diabetes mellitus tipo 2 (DM2).

A DM2 é conceituada como uma doença metabólica caracterizada por hiperglicemia e associada a complicações, disfunções e insuficiência de vários órgãos, especialmente o coração e vasos sanguíneos. Pode resultar de defeitos de secreção e/ou ação da insulina envolvendo processos patogênicos específicos. Em portadores da doença, a expectativa de vida é reduzida em torno de 5-7 anos; apresentam risco 2 a 4 vezes maior de desenvolver

DCV e acidente vascular cerebral; sendo que a doença arterial coronariana representa 75% das causas de morte nos portadores da diabetes (BRASIL-Ministério da Saúde, 2006).

A resistência à insulina tem sido identificada como um defeito inicial no desenvolvimento da DM2, particularmente na presença de obesidade e sedentarismo. Além disso, tem sido proposto que a hiperinsulinemia seja um fator de risco independente de aterosclerose (FADINI et al.,2007; JIALAL et al.,2010). Com efeito, a insulina é um peptídeo com atividade intensamente aterogênica, estimulando a produção de lipídios, proliferação da célula muscular lisa, síntese de colágeno e a produção de vários fatores de crescimento; estimula também a produção de NO induzindo a vasodilatação e aumenta a captação celular de glicose (CARVALHO et al.,2006).

A sinalização intracelular da insulina começa com sua ligação a um receptor específico de membrana, uma proteína heterotetramérica com atividade cinase intrínseca, composta por duas subunidades alfa e duas subunidades beta, denominado receptor de insulina (IR). A ativação do IR resulta em fosforilação em tirosina de diversos substratos, incluindo substratos do receptor de insulina 1 e 2 (IRS-1 e IRS-2) (PAULI et al.,2009).

A fosforilação das proteínas IRS ativa a via PI3K que é importante na regulação da mitogênese, na diferenciação celular e no transporte de glicose estimulada pela insulina. A ativação da PI3K aumenta a fosforilação da via AKT permitindo o transporte de glicose no músculo e no tecido adiposo, através da ativação do transportador de glicose-4 (GLUT-4). A ativação da AKT resulta na translocação do GLUT-4 para a membrana celular, permitindo a entrada de glicose por difusão facilitada. A atividade física praticada regularmente estimula a translocação dos GLUT-4 promovendo a captação de glicose e redução da sua concentração sanguínea. Além disso, o sinal transmitido pela PI3K ativa a síntese de glicogênio no fígado e no músculo, e da lipogênese no tecido adiposo. Portanto, a via PI3K/AKT tem um importante papel nos efeitos da insulina (PAULI et al.,2009).

Entretanto, o aumento intracelular de ácidos graxos resultante de dislipidemias e hipertrigliceridemia, ativa a cascata cinase da serina/treonina, possivelmente via proteína cinase C, levando à fosforilação da serina/treonina do substrato do receptor IRS-1 que não se liga, nem ativa a PI3K, resultando no transporte diminuído de glicose. Os ácidos graxos livres podem também interferir na expressão, transcrição ou no recrutamento para a superfície celular do GLUT-4; reduzem o clearance hepático de insulina e aumenta a

produção hepática de glicose, ambos potencializam os efeitos da resistência insulínica. Dessa forma, disfunção sistêmica na via PI3K, provoca defeito tanto na captação de glicose quanto na vasodilatação dependente do endotélio mediada pela insulina (CARVALHO et al.,2006).

Com efeito, existem evidências de que o estresse oxidativo medido pelo índice da peroxidação dos lipídios poderia preceder a disfunção endotelial e o subsequente desenvolvimento da resistência à insulina. Finalmente, outros componentes da síndrome de resistência à insulina, prevalentes na DM2, reduzem a atividade da enzima e-NOS: a hipertensão, LDL oxidado e hipertrigliceridemia (FADINI et al.,2007; JIALAL et al.,2010).

Portanto, o agrupamento dos componentes da SM se torna de suma importância, implicando uma interação sinérgica significativa dos seus componentes aumentando o risco das DCV (**Figura 9**). Essas noções sugerem que os componentes estão ligados entre si por uma fisiopatologia comum em uma relação de causa-efeito circular e vicioso, finalmente levando às DCV (FADINI et al., 2009b); indivíduos com um ou dois componentes da SM tendem a desenvolver os outros componentes com o passar do tempo (CHEUNG et al.,2008). Além disso, a SM confere de 2 a 4 vezes maior risco de desenvolvimento de DCV e de 5 vezes maior risco de desenvolvimento da DM2 (JIALAL et al.,2010).

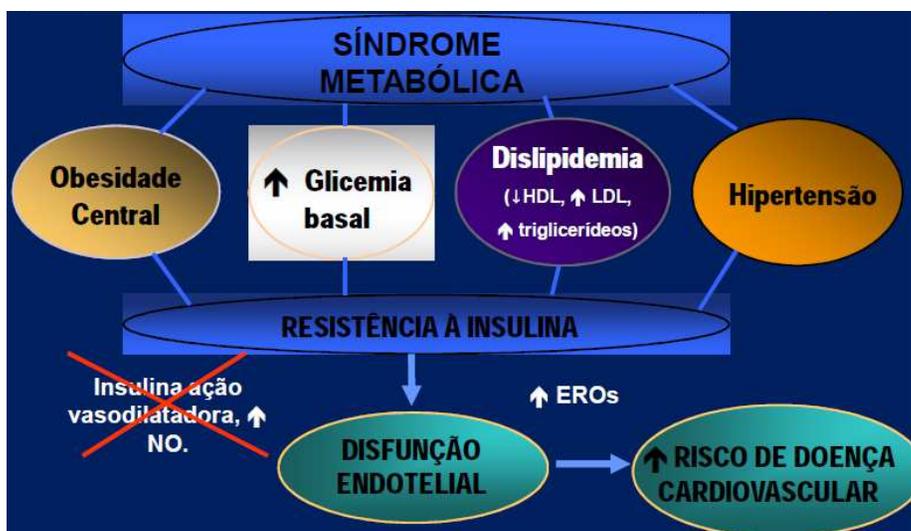


Figura 9: Agrupamento dos componentes da síndrome metabólica e risco cardiovascular. EROs: Espécies Reativas de Oxigênio. HDL: Lipoproteínas de Alta Densidade. LDL: Lipoproteínas de Baixa Densidade. NO: Óxido Nítrico. Adaptado de JIALAL et al. Atherosclerosis,2010.

Neste trabalho, nós testamos a hipótese de que o número de EPCs sofre redução em mulheres hipertensas, sob influência de mecanismos inflamatórios, em comparação com mulheres normotensas saudáveis. Considera-se atualmente que as EPCs são os melhores fatores preditivos para a saúde vascular do que os convencionais fatores de risco, tais como perfil lipídico, hipertensão e diabetes (BAKOGIANNIS et al.,2012; VASSALLE et al., 2012). Desta forma, a avaliação do número das EPCs pode refletir de forma mais precisa o grau de proteção cardiovascular da população feminina hipertensa. Neste sentido, a ampliação de estudos prospectivos que analisa o número destas células em mulheres com hipertensão primária, em pré-menopausa, pode contribuir para ampliar o conhecimento sobre a mobilização destas células da medula óssea para a circulação, gerando parâmetros importantes para o acompanhamento do quadro hipertensivo direcionando a assistência ao paciente.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Analisar o perfil de expressão das EPCs (CD45⁻/CD34⁺/KDR⁺) circulantes e diferentes fatores de risco cardiovascular em mulheres com hipertensão primária leve e severa, na pré-menopausa, em comparação com mulheres normotensas saudáveis.

2.2 Específicos

Caracterizar o grupo de mulheres do estudo quanto aos fatores de risco cardiovascular:

- Analisar os níveis de pressão arterial em repouso;
- Analisar os níveis séricos do colesterol total, HDL-c, LDL-c, triglicerídeos e glicemia de jejum;
- Analisar hábitos de fumo, sedentarismo e o Índice de Massa Corporal;
- Analisar presença de síndrome metabólica.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo

Realizou-se um estudo do tipo caso-controle prospectivo com dois grupos de mulheres com hipertensão primária: 1) Hipertensão Leve (HL) e 2) Hipertensão Severa (HS), idades entre 30-50 anos, acompanhadas no Ambulatório de Cardiologia do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE), pareadas com um grupo controle (CT) de mulheres normotensas saudáveis, que tiveram amostras sanguíneas venosas periféricas analisadas por citometria de fluxo para EPCs. Foram analisados, também, os exames de glicemia em jejum, colesterol total, HDL-c, LDL-c, triglicerídeos e IMC para identificação da síndrome metabólica.

3.2 Local do estudo

O PROCAPE foi inaugurado em julho de 2006 sendo construído para absorver a grande demanda de cardiologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC). Localiza-se no campus universitário da Universidade de Pernambuco em Recife, estando vinculado à Secretaria de Ciência e Tecnologia. É considerado o maior Centro Cardiológico do Nordeste e o segundo do País, apresenta 449 leitos distribuídos em sete andares, Emergência; quatro Unidades de Terapia Intensiva com um total de 40 leitos; Centro Cirúrgico com quatro salas de cirurgias; Ambulatório especializado; medicina nuclear; tomografia computadorizada e laboratório de células-tronco (<http://www.comunidades.pe.gov.br/websectma/exibir>).

3.3 População e amostra

A população do estudo foi constituída por mulheres com hipertensão primária acompanhadas no Ambulatório de Cardiologia do PROCAPE pareadas com um grupo controle de mulheres normotensas saudáveis. Para cálculo da amostra, considerou-se a população de 349 mulheres cadastradas no ano de 2012 na instituição. O estudo propôs uma amostra de conveniência de 10%, sendo realizada análise do sangue de 45 mulheres: 15 HL, 15 HS, 15 CT. Os dados foram coletados no segundo semestre de 2012 e 2013.

3.4 Seleção dos participantes

3.4.1 *Critérios de inclusão geral:* Mulheres saudáveis. Faixa etária de 30-50 anos.

- **Grupo Controle:** normotensas (PAS < 130 mmHg / PAD < 85 mmHg).
- **Grupo HL:** diagnóstico de hipertensão leve (PAS=140-159mmHg/PAD=90-99 mmHg)
- **Grupo HS:** diagnóstico de hipertensão severa (PAS ≥ 180 mmHg/PAD ≥ 110 mmHg).

3.4.2 *Critérios de exclusão*

- Hipertensão secundária: hipertensão associada às situações patológicas como insuficiência renal, hipertensão gestacional, doenças endócrinas.
- Doenças e sintomas cardiovasculares: queixa de angina e dor precordial; história pregressa de infarto; doenças coronarianas e cerebrovasculares.
- Fase de vida: gestante, puérpera, nutriz; período menstrual, em menopausa e/ou menopausa precoce confirmada por exame sanguíneo.

3.5 Definição de Variáveis

3.5.1 *Variáveis Desfechos:* (DECS,2013)

- **CD34:** Glicoproteínas encontradas em células hematopoiéticas imaturas e em células endoteliais.
- **CD309** (VEGFR-2/Flk-1/KDR): Receptor transmembrana tirosina-cinase de 200 a 230kDa, sendo também conhecido como VEGFR-2 ou por KDR. KDR é um receptor de alta afinidade para o VEGF estando envolvido na angiogênese, tanto durante a embriogênese e no contexto de eventos homeostáticos ou patológicos; é importante para o desenvolvimento vascular e hematopoiético e medeia quase todas as respostas da célula endotelial ao VEGF.
- **CD45:** Glicoproteínas de alto peso molecular expressas exclusivamente na superfície de leucócitos e seus progenitores hematopoiéticos. Contêm uma atividade de proteína tirosina fosfatase citoplasmática que desempenha um papel na sinalização intracelular dos receptores da superfície celular. Em contraste com as células hematopoiéticas, as EPCs não expressam o marcador CD45.

3.5.2 Variável Dependente:

- **Hipertensão:** Pressão arterial sistêmica persistentemente alta. Com base em várias medições, a hipertensão é atualmente definida como sendo a PAS \geq 140mmHg e/ou PAD \geq 90mmHg. O diagnóstico deverá ser sempre validado por medidas repetidas, em condições de repouso, em pelo menos três ocasiões (SBC,2010).

3.5.3 Variáveis Independentes:

- **Colesterol:** esteróide, componente essencial das membranas biológicas, precursor da biossíntese de todos os hormônios esteróides, vitamina D e sais biliares. É geralmente armazenado nas células como éster de ácido graxo (MOTTA,2011).
- **Lipoproteínas plasmáticas de densidade muito baixa (VLDL):** lipoproteínas sintetizadas no fígado transportam triacilgliceróis e colesterol endógenos para os tecidos extra-hepáticos. No transporte das VLDL os triacilgliceróis são hidrolisados pela lipoproteína-lipase até ácidos graxos livres e glicerol (MOTTA,2011).
- **Lipoproteínas plasmáticas de densidade baixa (LDL):** lipoproteínas formadas a partir das VLDL. As LDL enriquecidas de colesterol e ésteres de colesterol transportam esses lipídeos para os tecidos periféricos (MOTTA, 2011).
- **LDL-colesterol:** colesterol que está contido ou ligado a LDL (MOTTA,2011).
- **Lipoproteínas plasmáticas de densidade alta (HDL):** lipoproteínas que removem o colesterol do plasma e dos tecidos extra-hepáticos, transportando-os para o interior do hepatócito através do receptor Scavenger B1 (Scavenger receptor class B member 1) (MOTTA,2011).
- **HDL-colesterol:** colesterol que está contido ou ligado a HDL (MOTTA,2011).
- **Triglicerídeos (triacilgliceróis):** São ésteres formados por três moléculas de ácidos graxos e uma de glicerol. São os lipídeos mais abundantes no transporte e armazenamento de ácidos graxos, sendo transportadas no plasma nas lipoproteínas quilomícrons, LDL e VLDL (MOTTA,2011).
- **Glicose:** Monossacarídeo constituído pelo grupo funcional aldeído (hexoses), usados pelo organismo como principal fonte de energia (MOTTA,2011).

- **Estilo de vida fisicamente ativo:** Nível de atividade física leve ou moderada por 30 minutos/dia, em \geq cinco dias na semana ou atividade física vigorosa por 20 minutos/dia, em \geq três dias da semana (WHO,2009).
- **IMC:** Indicador da densidade do corpo que é determinado pela relação entre o peso corporal e a estatura. $IMC = \text{peso (kg)} / \text{altura ao quadrado (m}^2\text{)}$. O IMC se correlaciona com o tecido adiposo. Sua relação varia com a idade e o gênero. Para adultos, o IMC se encontra nestas categorias: <18.5 (abaixo do peso), $18.5-24.9$ (normal), $25.0-29.9$ (sobrepeso) e ≥ 30.0 (obesidade) (DECS,2013).
- **Síndrome metabólica:** Síndrome caracterizada pelo agrupamento de fatores de risco cardiovascular como hipertensão; resistência à insulina, hiperinsulinemia, intolerância à glicose/DM2; obesidade, especialmente abdominal, com depósitos intra-abdominais de gordura; e dislipidemia aterogênica (LDL-c e triglicerídeos altos, HDL-c baixo) (NCEP-ATPIII,2002).

3.5.4 Variáveis Controles (DECS,2013):

- Distribuição por **Idade:** Agrupamento de indivíduos segundo idade ou faixa etária previamente determinada. A faixa etária utilizada foi de 30 a 50 anos.
- Distribuição por **Sexo:** Número de homens e mulheres numa dada população ou grupo. No estudo foi utilizado gênero mulher.
- **Menopausa:** Último período menstrual. A cessação permanente da menstruação, geralmente é definida após 6 a 12 meses da amenorreia numa mulher acima de 45 anos de idade.
- **Menopausa precoce:** Interrupção prematura da menstruação quando o último período menstrual de uma mulher ocorre antes dos 40 anos de idade. É devida à depleção dos folículos ovarianos. A menopausa precoce pode ser causada por doenças, ovariectomia, radiação, agentes químicos e anormalidades cromossômicas.
- **Pré-menopausa:** período antes da menopausa. Nas mulheres em pré-menopausa, a transição climatérica da maturidade sexual plena até o término do ciclo ovariano ocorre entre os 40 e 50 anos de idade.

3.6 Aspectos operacionais

O projeto foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas-UNICAMP- Parecer nº 187.777 (Anexo A) e do Hospital Universitário Oswaldo Cruz/PROCAPE - Parecer nº 213.470 (Anexo B) - CAAE nº 01582212.4.0000.5192- segundo a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (BRASIL, Ministério da Saúde, 1996). Após aprovação, foi realizada triagem médica pelos profissionais do Ambulatório de Hipertensão do PROCAPE, por ocasião da consulta de rotina das pacientes, para formação de três grupos de mulheres: 1) Normotensas com PAS < 130 mmHg/PAD < 85mmHg (n=15), 2) Hipertensão Leve com PAS=140-159 mmHg/PAD= 90-99 mmHg e 3) Hipertensão Severa com PAS \geq 180 mmHg/PAD \geq 110 mmHg. Os objetivos do estudo foram explicados de forma acessível para as participantes, e todas assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE-Apêndice A). Todas as mulheres foram entrevistadas pela pesquisadora quanto aos hábitos de fumo e prática de exercícios físicos, sendo verificado o peso/altura para cálculo do IMC como descrito acima e aferido o nível da pressão arterial em repouso com esfigmomanômetro aneróide-AD-2 sobre rodízio (pedestal) (adulto-AG052-Unitec Indústria e Comercio), e preenchido o instrumento de coleta de dados (Apêndice B). Após, a pesquisadora realizou a retirada da amostra sanguínea venosa periférica conforme descrição no TCLE (Apêndice A). As amostras sanguíneas foram imunomarcadas no laboratório do Instituto do Fígado do HUOC e analisadas por citometria de fluxo no Laboratório de Imunogenética do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães de Pernambuco. Foram analisados, também, os exames de glicemia em jejum, colesterol total, HDL-c, LDL-c e triglicerídeos realizados pelo laboratório do PROCAPE, e os valores obtidos no prontuário das pacientes no mês da coleta das amostras sanguíneas.

3.7 Técnica de citometria de fluxo

A citometria de fluxo é um recurso emergente que permite uma análise rápida, objetiva e quantitativa de células em suspensão permitindo a identificação e quantificação celular pelo tamanho, granulosidade e intensidade de fluorescência. O citômetro de fluxo é um aparelho utilizado para avaliação da emissão de fluorescência das células (FACS – Fluorescence Activated CellSorter). Alguns aparelhos são capazes de separar as células fisicamente, de acordo com as características citométricas.

As células da amostra em suspensão são marcadas com anticorpos monoclonais específicos ligados a fluorocromos reagentes ou marcadores celulares, sendo introduzidas numa câmara de fluxo vibratória. O fluxo de células que atravessa a câmara é envolvido por uma solução tampão, e passam em fila simples sendo interceptadas por feixes de luz, gerando sinais que são captados por detectores. A informação produzida pode ser gerada pela dispersão do feixe de luz e fluorescência emitida pelas células, que são detectados por foto-sensores que captam a luz emitida com um comprimento de onda selecionado pelo citômetro. O Foto-Sensor de Dispersão Frontal (FSC-Forward Scatter) capta a intensidade da luz dispersa frontalmente e fornece informações sobre o tamanho relativo das células; o Foto-Sensor de Dispersão Lateral (SSC- Side Scatter) capta a intensidade de luz dispersa a 90° informando a complexidade e granularidade celular. A especificidade da detecção de cada sensor é controlada pela seleção do comprimento de onda (fluorescência) emitido pelas células imunomarcadas, através de uma conjugação de filtros e de espelhos dicróicos usados para identificar os espectros de cores emitidos pela fluorescência celular (FL-1, FL-2, FL-3 e FL-4) (**Figura 10**), permitindo medições simultâneas de vários parâmetros numa só amostra. Os resultados podem ser expressos em gráficos de dispersão, histogramas e densidade celular (JANEWAY et al.,2007).

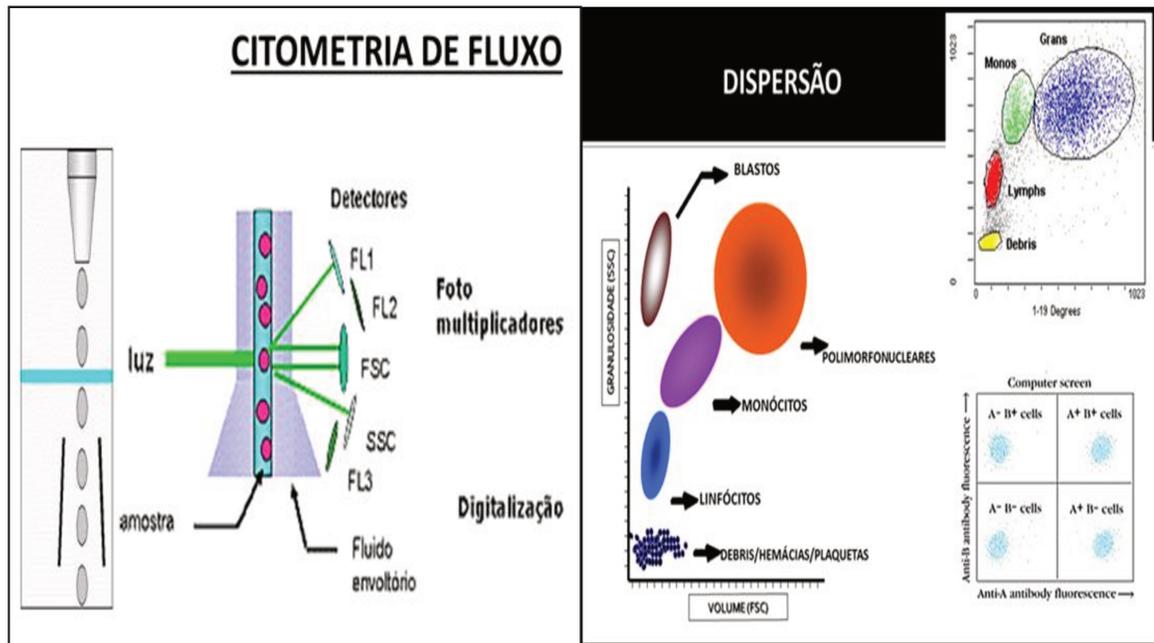


Figura 10: Esquema teórico da técnica de citometria de fluxo e do gráfico de dispersão e densidade celular. FSC: Foto-sensor de Dispersão Frontal. SSC: Foto-sensor de Dispersão Lateral. FL1: Filtro 1, FL2: Filtro 2, FL3: Filtro 3.

3.8 Protocolo de imunomarcção celular

Amostras de sangue venoso periférico (2ml) foram coletadas em tubo com anticoagulante EDTA (Ácido Etilendiamino Tetra-Acético). Em tubos de citometria foram colocado 100µl do sangue total e realizado imunomarcção de células 5×10^4 com anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos em 1 hora, em temperatura ambiente, no escuro, conforme painel de três cores estabelecido: Tubo1: controle negativo; Tubo2: CD45/CD34/KDR. Os eritrócitos foram lisados com 2 ml de solução FACS lysing (BD, San Jose, CA, EUA) diluída 1:10ml e incubados por 10 minutos, em temperatura ambiente, no escuro. Após, as células foram centrifugadas (2x) a 400g por 7 minutos e temperatura 20°C, lavadas (2x) com solução salina tamponada fosfatada (PBS) 0,25%. Retirou-se o sobrenadante por técnica de inversão do tubo. O pellet formado foi ressuspendido em 500µl de PBS 0,25% e analisados através de citômetro de fluxo até 3 horas após marcação (**Figura 11**).

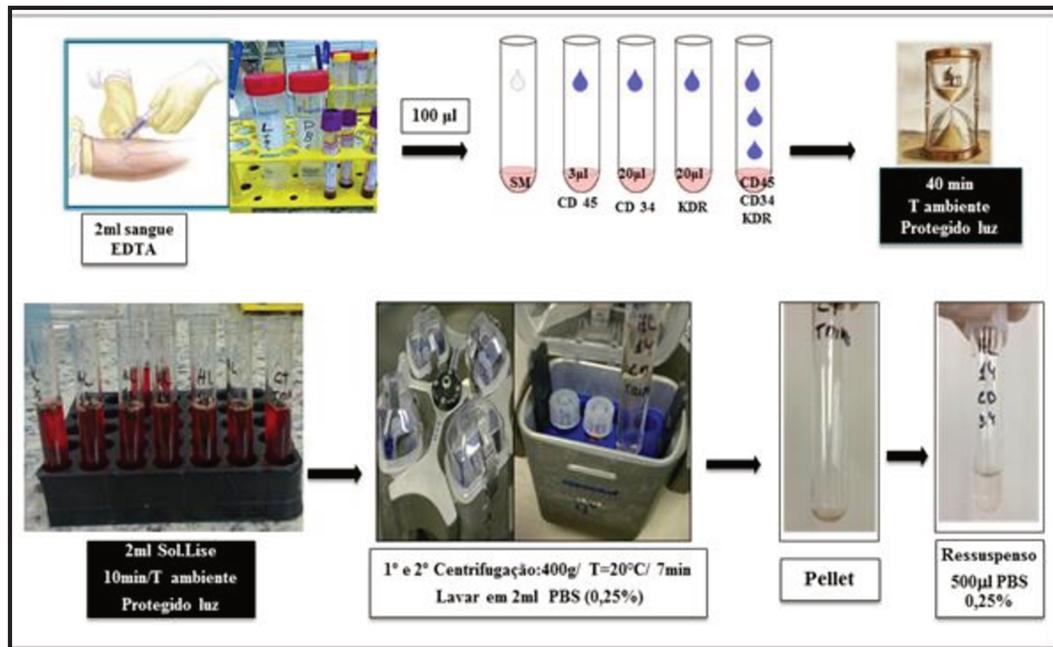


Figura 11: Protocolo de imunomarcagem celular. EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético. CD: Grupamento de diferenciação. PBS: Solução Salina Tamponada Fosfatada. ml: mililitro, µl: microlitro, %: percentual, °C: graus Centrígrados, T: Temperatura.

3.9 Quantificação das EPCs circulantes por citometria de fluxo

As células foram analisadas em gráficos de dispersão de pontos em relação ao seu tamanho (FSC) e complexidade citoplasmática (SSC) e por histogramas. Inicialmente excluimos as células mortas e plaquetas, delimitando na região FSC/SSC um portão R1 contendo os leucócitos marcados por CD45⁺. O CD45 é uma glicoproteína expressa na superfície de todos os leucócitos humanos. Entretanto, as EPCs não expressam o marcador CD45 (CASE et al.2007; MASOULEH et al.,2010, SHANTSILA et al.,2008). Desta forma, desenhamos o portão R2 que apresentava células CD45 negativas para a seleção das EPCs, sendo analisado neste espaço as células marcadas CD45⁻/CD34⁺/KDR⁺ (**Figura 12**). Em cada amostra, 50.000 eventos totais foram analisados.

A quantificação das EPCs circulantes foi realizada por citômetro de fluxo FACSCalibur do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães de Recife-PE, através do programa CellQuest (BD, San Jose, CA, EUA) (**Figura 13**), utilizando anticorpos monoclonais conjugados com os seguintes fluorocromos: Anti-CD45-PerCP (proteína clorofila peridina) clone 2D1, n°347464-BD Pharmingen (BD, San Jose, CA, EUA); Anti-CD34-FITC

(isotiocianato de fluoresceína) clone QBEnd-10, n°SAB4700158-Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, EUA); Anti-KDR-Alexa Fluor 647-clone 89106, n°560495-BD Pharmingen (BD, San Jose, CA, EUA).

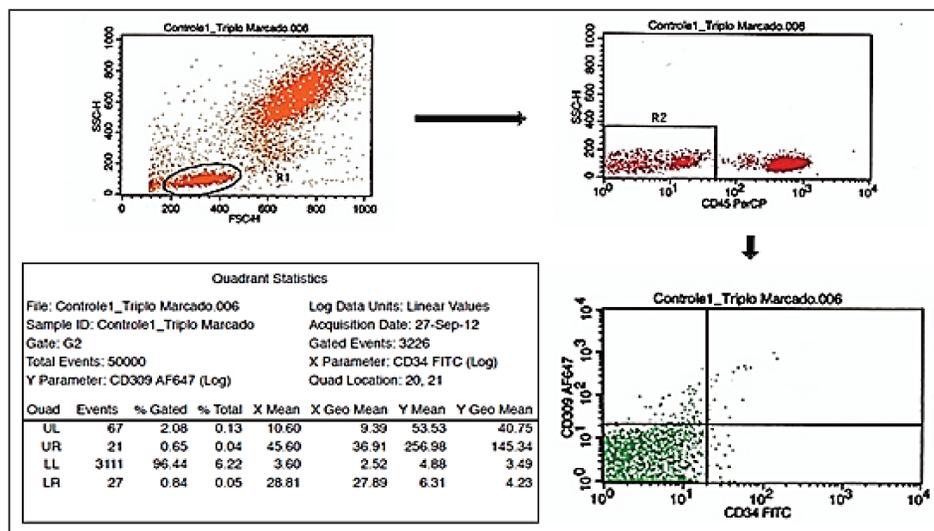


Figura 12: Painel representativo da técnica de citometria de fluxo na análise de nossos dados: a) Seleção de células mononucleares periféricas (R1), b) Células CD45 negativas (R2) onde estão as EPCs, c) Portão CD34 x KDR mostrando células positivas para CD34, KDR e CD34/KDR.

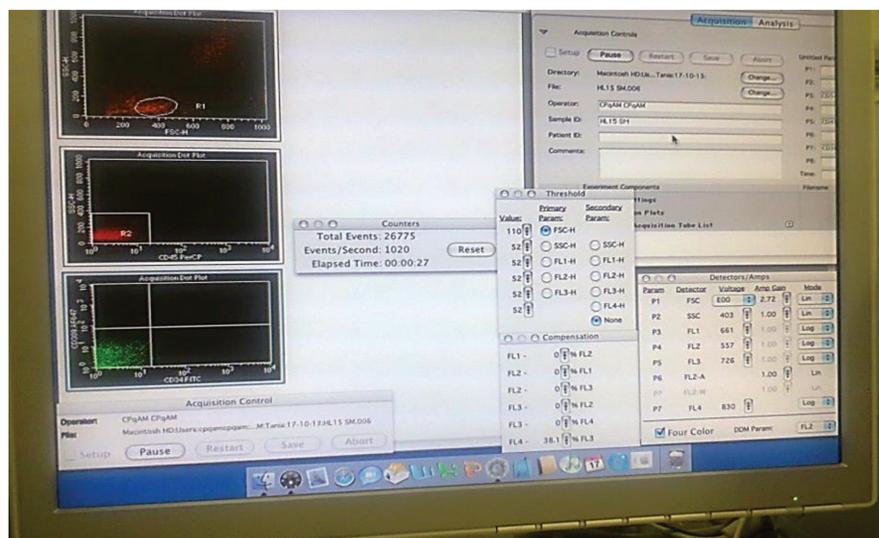


Figura 13: Programa CellQuest e análise das células progenitoras endoteliais circulantes. Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães de Recife-PE-2013.

3.10 Análise estatística

Realizou-se uma análise descritiva dos resultados obtidos. A apresentação das variáveis mensuradas foi feita através de tabelas e gráficos incluindo também o uso de algumas medidas descritivas como valor mínimo e máximo, média, desvio padrão (DP) e erro padrão (EP). Para testar a suposição de homogeneidade das variáveis foi aplicado o teste de Bartlett. Para análise comparativa das médias dos três grupos foi utilizado Anova/Tukey e entre dois grupos o teste t de Student, quando observado o pressuposto de homogeneidade, quando não, foi utilizado o teste de múltiplas comparações de Kruskal-Wallis após Kruskal Wallis. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%. O programa utilizado foi o Rv2.15.0. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%. Os programas utilizados foram o Rv2.15.0 e Excel 2010.

3.11 Riscos e benefícios

O estudo teve risco mínimo referente ao procedimento de coleta da amostra sanguínea e apresenta relevância no estudo das DCV sendo importante para ampliação do conhecimento sobre a mobilização das EPCs para a circulação, sob influência dos mecanismos inflamatórios da hipertensão, gerando parâmetros importantes para estratificação de risco na população feminina hipertensa.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização da população do estudo e fatores de risco cardiovascular.

Os fatores de risco cardiovascular e análise da pressão arterial da população do estudo estão descritos na **Tabela 1**. Constatamos elevação significativa nos níveis tensionais da PA ($p < 0,0001$) demonstrando o grau e a severidade da hipertensão, confirmando a adequação da metodologia proposta no estudo.

Verificamos que a média da idade das mulheres foi de 41 ± 6 anos. No grupo HL observou-se obesidade ($p < 0,001$) e no HS verificou-se diabetes tipo II e sobrepeso ($p < 0,05$). Identificamos também elevado percentual de sedentarismo nos grupos de mulheres hipertensas.

Em relação aos valores séricos bioquímicos (**Tabela 2**), constatou-se no grupo HL aumento significativo das médias dos níveis dos triglicérides ($p < 0,0001$) e da glicemia de jejum ($p < 0,01$). No grupo HS verificou-se hiperglicemia ($p < 0,01$), dislipidemia aterogênica: aumento dos triglicérides ($p < 0,0001$), aumento das LDL-c ($p < 0,01$) e diminuição de HDL-c ($p < 0,01$). Não houve diferenças estatísticas significativas em relação ao colesterol total. Em relação à ocorrência de síndrome metabólica (**Tabela 3**), verificamos que 67% das mulheres do grupo HS apresentavam a síndrome.

4.2 Quantificação das células mononucleares circulantes imunomarcadas CD45⁻/CD45⁺.

Quanto ao número de células mononucleares circulantes CD45 negativas (**Tabela 4**), verificou-se redução de 47% ($p < 0,05$) no grupo HS *versus* (vs.) CT e de 62% ($p < 0,05$) no HS vs. HL. De forma inversa, houve aumento de 42% ($p < 0,05$) no HL vs. CT. A análise do número de células mononucleares circulantes imunomarcadas CD45 positivas não apresentou diferenças estatísticas.

Em relação ao percentual de células mononucleares circulantes CD45 negativas (**Tabela 5 e Figura 14**) constatou-se redução de 36% ($p < 0,05$) no grupo HS vs. CT e de 56% ($p < 0,05$) no HS vs. HL. De forma inversa, houve aumento de 46% ($p < 0,05$) no HL vs. CT. Estes resultados demonstram que o número e percentual de células CD45 negativas sofreu influência do estágio da hipertensão.

Em relação ao percentual de células mononucleares circulantes imunomarcadas CD45 positivas (**Tabela 5 e Figura 14**) verificou-se redução de 22% ($p < 0,05$) no HL vs. CT. De forma inversa, houve aumento de 17% ($p < 0,05$) no grupo HS vs. CT e de 49% ($p < 0,05$) no HS vs. HL evidenciando um padrão inflamatório apenas no grupo de mulheres com hipertensão severa.

4.3 Quantificação das células progenitoras endoteliais circulantes.

O número de células mononucleares circulantes imunomarcadas CD45⁻/CD34⁺ e EPCs (CD45⁻/CD34⁺/KDR⁺) estão descritos na **Tabela 6 e Figura 15**. Em relação ao número de células CD45⁻/CD34⁺ constatou-se redução significativa de 61% ($p < 0,05$) no grupo HS vs. CT e de 52% ($p < 0,05$) no HS vs. HL. Em relação ao número de EPCs verificou-se importante redução de 88% ($p < 0,05$) no HS vs. CT e de 67% ($p < 0,05$) no HS vs. HL.

O percentual de células mononucleares circulantes imunomarcadas CD45⁻/CD34⁺ e EPCs (CD45⁻/CD34⁺/KDR⁺) estão descrito na **Tabela 7 e Figura 16**. Em relação às células CD45⁻/CD34⁺ verificou-se redução significativa de 46% ($p < 0,05$) no grupo HS vs. CT. Quanto às EPCs constatou-se redução de 74% ($p < 0,05$) no HL vs. CT e de 88% ($p < 0,01$) no HS vs. CT. Estes resultados demonstram que o número e percentual de EPCs reduziram progressivamente com o aumento do estágio da hipertensão.

Tabela 1: Fatores de risco cardiovascular da população de mulheres normotensas e hipertensas do estudo. Recife, Pernambuco, Brasil, 2013.

Fatores de Risco Cardiovascular	CT	HL	HS	Comparação	p-valor
PAS (mmHg)	113 ± 15	133 ± 12	159 ± 27	HL vs. CT	<0,0001 ^K
				HS vs. CT	
				HS vs. HL	
PAD (mmHg)	73 ± 8	86 ± 8	98 ± 19	HL vs. CT	<0,0001 ^K
				HS vs. CT	
				HS vs. HL	
IMC (Kg/m ²)	26 ± 3	31 ± 4	29 ± 3	HL vs. CT	0,0006 ^T
				HS vs. CT	0,0138 ^T
				HS vs. HL	0,0684 ^T
Idade (anos)	41 ± 7	41 ± 6	41 ± 6		
Tabagismo n (%)	2 (13%)	1 (7%)	1 (7%)		
Diabetes n (%)	0	0	4 (27%)		
Sedentarismo n(%)	6 (40%)	12 (80%)	11 (73%)		

CT: grupo controle (n=15). HL: grupo com hipertensão leve (n=15). HS: grupo com hipertensão severa (n=15). PAS: Pressão Arterial Sistólica. PAD: Pressão Arterial Diastólica. IMC: Índice de Massa Corporal. Resultados expressos em média ± DP e percentual dos fatores de risco. ^K Kruskal Wallis/Kruskalmc. ^T Teste t de Student.

Tabela 2: Parâmetros séricos bioquímicos da população de mulheres normotensas e hipertensas do estudo. Recife, Pernambuco, Brasil, 2013.

Parâmetros Séricos	CT	HL	HS	Comparação	p-valor
Glicemia de jejum (mg/dL)	87 ± 7	95 ± 7	121 ± 39	HL vs. CT	0,0014 ^K
				HS vs. CT	0,0014 ^K
				HS vs. HL	0,0080 ^T
Colesterol total (mg/dL)	196 ± 31	208 ± 14	214 ± 20	HL vs. CT	0,1880 ^A
				HS vs. CT	
				HS vs. HL	
HDL-c (mg/dL)	56 ± 8	52 ± 7	48 ± 5	HL vs. CT	0,0995 ^T
				HS vs. CT	0,0028 ^T
				HS vs. HL	0,0688 ^T
LDL-c (mg/dL)	121 ± 18	130 ± 8	143 ± 15	HL vs. CT	0,0654 ^T
				HS vs. CT	0,0049 ^A
				HS vs. HL	0,0071 ^T
Triglicerídeos (mg/dL)	105 ± 10	138 ± 19	153 ± 40	HL vs. CT	0,0001 ^K
				HS vs. CT	0,0001 ^K
				HS vs. HL	0,1208 ^T

CT: grupo controle (n=15). HL: grupo com hipertensão leve (n=15). HS: grupo com hipertensão severa (n=15). HDL-c: lipoproteínas de alta densidade-colesterol. LDL-c: lipoproteínas de baixa densidade-colesterol. Resultados expressos em média ± DP. ^AAnova/Tukey, ^KKruskal Wallis/ Kruskalmc, ^T Teste t de Student.

Tabela 3: Parâmetros séricos bioquímicos e síndrome metabólica da população de mulheres normotensas e hipertensas do estudo. Recife, Pernambuco, Brasil, 2013.

Parâmetros séricos	CT	HL	HS
	(n=11-15)	(n=10-15)	(n=13-15)
	N(%)	N(%)	N(%)
HDL (mg/dL)			
< 50	2 (18%)	4 (40%)	9 (69%)
50-60	9 (82%)	6 (60%)	4 (31%)
LDL (mg/dL)			
<130	5 (46%)	4 (40%)	1 (8%)
130-160	6 (54%)	6 (60%)	11 (84%)
>160	0	0	1(8%)
Triglicerídeos (mg/dL)			
< 150	11(100%)	9 (90%)	5 (39%)
150-199	0	1 (10%)	8 (61%)
Glicose (mg/dL)			
< 100	15(100%)	13 (87%)	5 (33%)
≥ 100	0	2 (13%)	10 (67%)
IMC (kg/m²)			
18,5 - 24,9	8 (53%)	0	1 (8%)
25,0 - 29,9	4 (27%)	6 (43%)	7 (54%)
≥ 30	3 (20%)	8 (57%)	5 (38%)
Síndrome metabólica			
Sim	1 (7%)	5 (33%)	10 (67%)
Não	14 (93%)	10 (67%)	5 (33%)

CT: grupo controle. HL: grupo de mulheres com hipertensão leve. HS: grupo de mulheres com hipertensão severa. LDL: lipoproteínas de baixa densidade. HDL: lipoproteínas de alta densidade. IMC: Índice de Massa Corporal. Resultados expressos em percentual.

Tabela 4: Expressão do número de células mononucleares circulantes imunomarcadas CD45⁻/CD45⁺ da população de mulheres normotensas e hipertensas do estudo. Recife, Pernambuco, Brasil, 2013.

Nº Células 5 x 10⁴eventos	Media	Min	Max	DP	EP	Comparação	p-valor
CD45 positivas							
CT	23.567	7.173	46.486	11.916	3.077	HL vs. CT	0,5700 ^A
HL	19.486	5.765	41.598	12.789	3.302	HS vs. CT	
HS	24.400	4.972	47.022	15.529	4.010	HS vs. HL	
CD45 negativas							
CT	14.098	1.073	30.730	11.086	2.863	HL vs. CT	0,0927 ^T
HL	19.962	681	39.514	14.054	3.629	HS vs. CT	0,0351 ^T
HS	7.506	605	25.397	8.356	2.158	HS vs. HL	0,0173 ^A

CT: grupo controle (n=15). HL: grupo com hipertensão leve (n=15). HS: grupo com hipertensão severa (n=15). Resultados expressos em média (valor mínimo, máximo), Desvio Padrão (DP) e Erro Padrão (EP). ^A Anova/Tukey. ^T Teste t de Student.

Tabela 5: Expressão do percentual de células mononucleares circulantes imunomarcadas CD45⁻/CD45⁺ da população de mulheres normotensas e hipertensas do estudo. Recife, Pernambuco, Brasil, 2013.

%Células 5 x 10⁴ eventos	Media	Min	Max	DP	EP	Comparação	p-valor
CD45 positivas							
CT	68	39	96	20	5	HL vs. CT	0,0493 ^T
HL	53	21	94	30	8	HS vs. CT	0,0460 ^T
HS	80	49	96	16	4	HS vs. HL	0,0101 ^A
CD45 negativas							
CT	32	6	61	20	5	HL vs. CT	0,0532 ^T
HL	46	6	100	30	8	HS vs. CT	0,0447 ^T
HS	20	4	51	16	4	HS vs. HL	0,0109 ^A

CT: grupo controle (n=15). HL: grupo com hipertensão leve (n=15). HS: grupo com hipertensão severa (n=15). Resultados expressos em média (valor mínimo, máximo), Desvio Padrão (DP) e Erro Padrão (EP). ^A Anova/Tukey, ^T Teste t de Student.

Análise por citometria de fluxo das células mononucleares circulantes CD45⁻/CD45⁺.

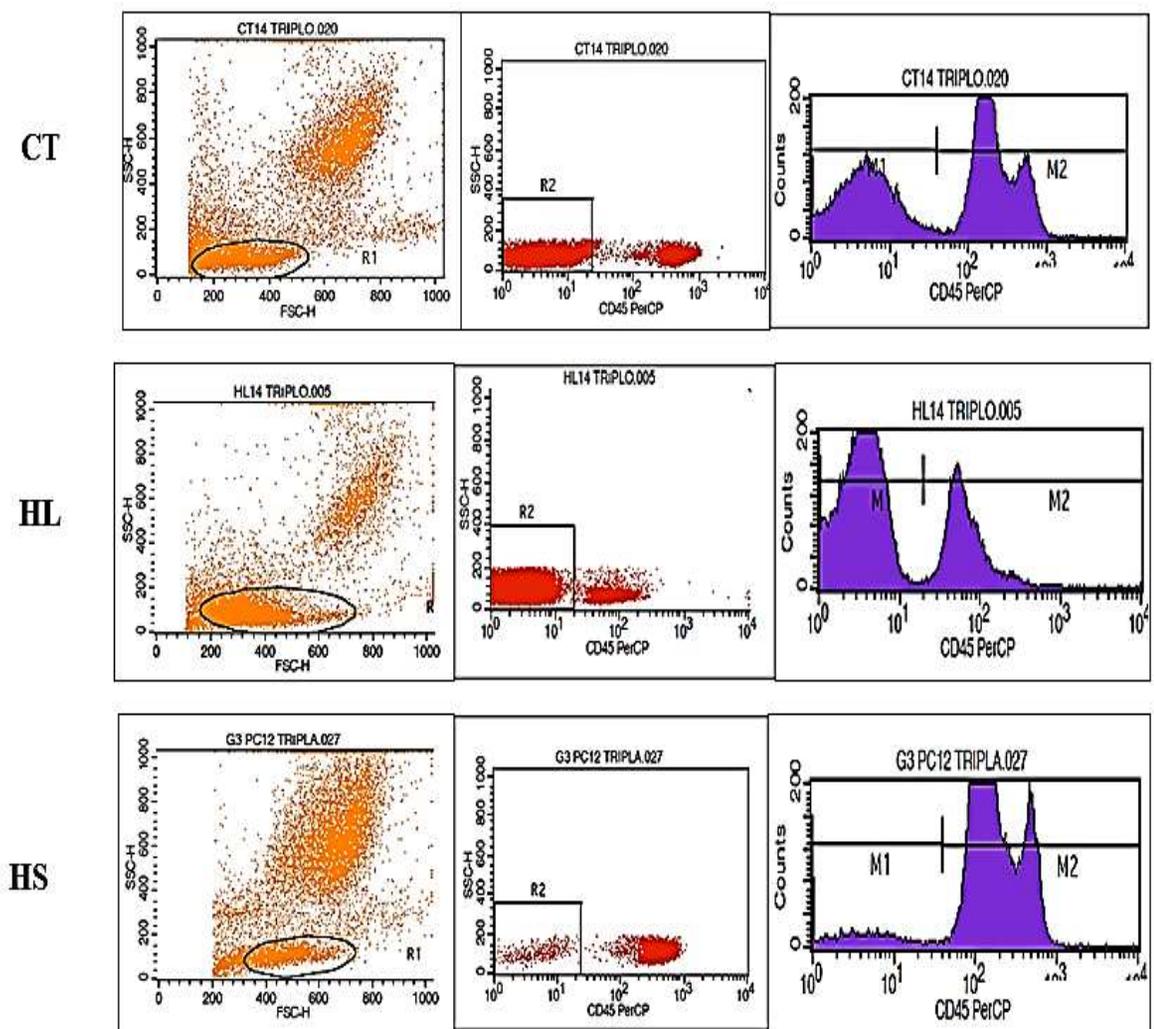


Figura 14: Análise por citometria de fluxo das células mononucleares circulantes CD45⁻/CD45⁺ da população de mulheres normotensas e hipertensas do estudo. Recife, Pernambuco, Brasil, 2013. a) SSC x FCS, círculo R1 indica as células mononucleares. b) CD45 x SSC, portão R2 indica CD45 negativas, onde era esperada a maior população de EPCs. c) Histograma mostrando células CD45 negativas (M1) e positivas (M2).

Tabela 6: Expressão do número de células mononucleares circulantes imunomarcadas CD45⁻/CD34⁺, CD45⁻/KDR⁺ e EPCs (CD45⁻/CD34⁺/KDR⁺) da população de mulheres normotensas e hipertensas do estudo. Recife, Pernambuco, Brasil, 2013.

N° Células 5 x10⁴eventos	Média	Min	Max	DP	EP	Comparação	p-valor
CD45⁻/CD34⁺							
CT	22	0	83	24	6	HL vs. CT	0,1105 ^A
HL	17	3	63	17	4	HS vs. CT	0,0241 ^T
HS	8	1	29	8	2	HS vs. HL	0,0325 ^T
CD45⁻/KDR⁺							
CT	130	28	324	92	24	HL vs. CT	0,9140 ^A
HL	129	16	484	132	34	HS vs. CT	
HS	145	10	366	107	28	HS vs. HL	
CD45⁻/CD34⁺/KDR⁺							
CT	16	0	80	26	7	HL vs. CT	0,0824 ^T
HL	6	0	29	8	2	HS vs. CT	0,0241 ^T
HS	2	0	7	2	1	HS vs. HL	0,0172 ^T

CT: grupo controle (n=15). HL: grupo de mulheres com hipertensão leve (n=15). HS: grupo de mulheres com hipertensão severa (n=15). Resultados expressos em média (valor mínimo, máximo), Desvio Padrão (DP) e Erro Padrão (EP). ^A Anova/Tukey, ^T t de Student.

Tabela 7: Expressão do percentual de células mononucleares circulantes imunomarcadas CD45⁻/CD34⁺, CD45⁻/KDR⁺ e CD45⁻/CD34⁺/KDR⁺ da população de mulheres normotensas e hipertensas do estudo. Recife, Pernambuco, Brasil, 2013.

% Células 5 x10⁴ eventos	Média	Min	Max	DP	EP	Comparação	p-valor
CD45⁻/CD34⁺							
CT	0,24	0,00	0,84	0,27	0,07	HL vs. CT	0,0919 ^T
HL	0,13	0,01	0,50	0,15	0,04	HS vs. CT	0,0203 ^T
HS	0,09	0,01	0,25	0,07	0,02	HS vs. HL	0,1415 ^T
CD45⁻/KDR⁺							
CT	1,49	0,16	5,9	1,48	0,4	HL vs. CT	0,3980 ^A
HL	1,25	0,09	6,4	2,08	0,5	HS vs. CT	
HS	2,20	0,04	8,7	2,29	0,6	HS vs. HL	
CD45⁻/CD34⁺/KDR⁺							
CT	0,19	0,0	0,7	0,26	0,07	HL vs. CT	0,0284 ^T
HL	0,05	0,0	0,4	0,09	0,02	HS vs. CT	0,0087 ^T
HS	0,02	0,0	0,1	0,02	0,01	HS vs. HL	0,0964 ^T

CT: grupo controle (n=15). HL: grupo de mulheres com hipertensão leve (n=15). HS: grupo de mulheres com hipertensão severa (n=15). Resultados expressos em média (valor mínimo, máximo), Desvio Padrão (DP) e Erro Padrão (EP). ^A Anova/Tukey, ^T t de Student.

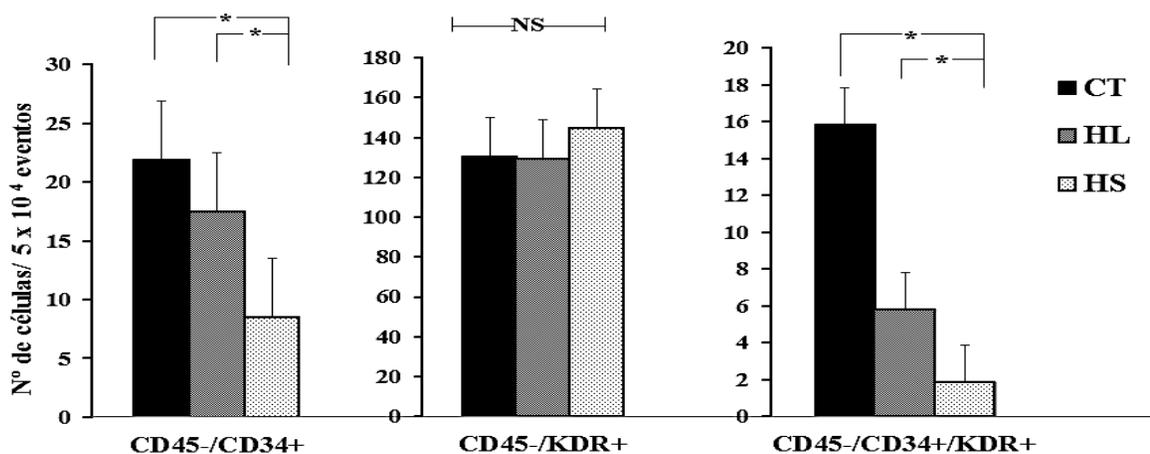


Figura 15: Gráfico do número de células CD45⁻/CD34⁺, CD45⁻/KDR⁺ e EPCs (CD45⁻/CD34⁺/KDR⁺) da população de mulheres normotensas e hipertensas do estudo. Recife, Pernambuco, Brasil, 2013. CT: grupo controle (n=15). HL: grupo de mulheres com hipertensão leve (n=15). HS: grupo de mulheres com hipertensão severa (n=15). (*) p<0,05. Teste t de Student.

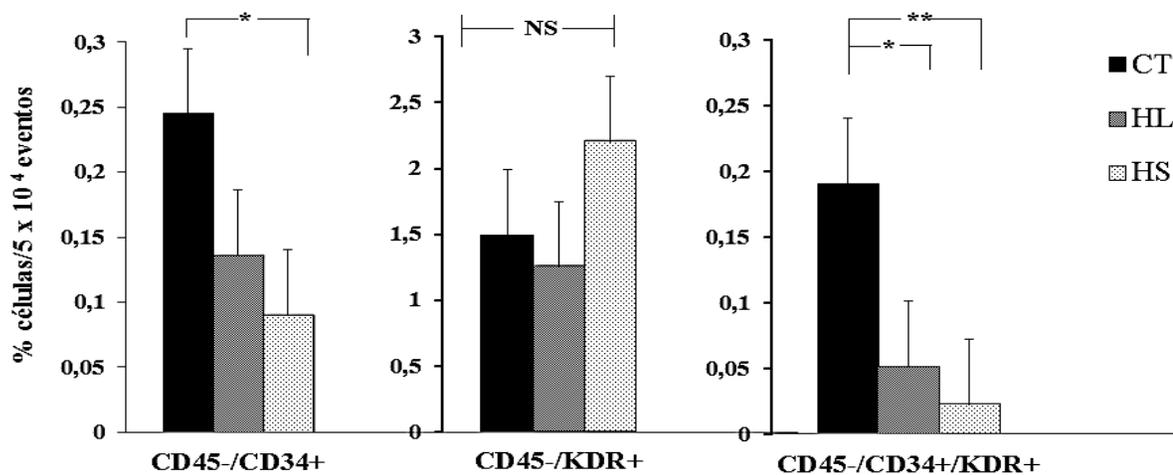


Figura 16: Gráfico do percentual de Células CD45⁻/CD34⁺, CD45⁻/KDR⁺ e EPCs (CD45⁻/CD34⁺/KDR⁺) da população de mulheres normotensas e hipertensas do estudo. Recife, Pernambuco, Brasil, 2013. CT: grupo controle (n=15). HL: grupo de mulheres com hipertensão leve (n=15). HS: grupo de mulheres com hipertensão severa (n=15). (*) p<0,05; (**) p<0,01. Teste t de Student.

Análise por citometria de fluxo das células CD45⁻/CD34⁺, CD45⁻/KDR⁺, EPCs (CD45⁻/CD34⁺/KDR⁺).

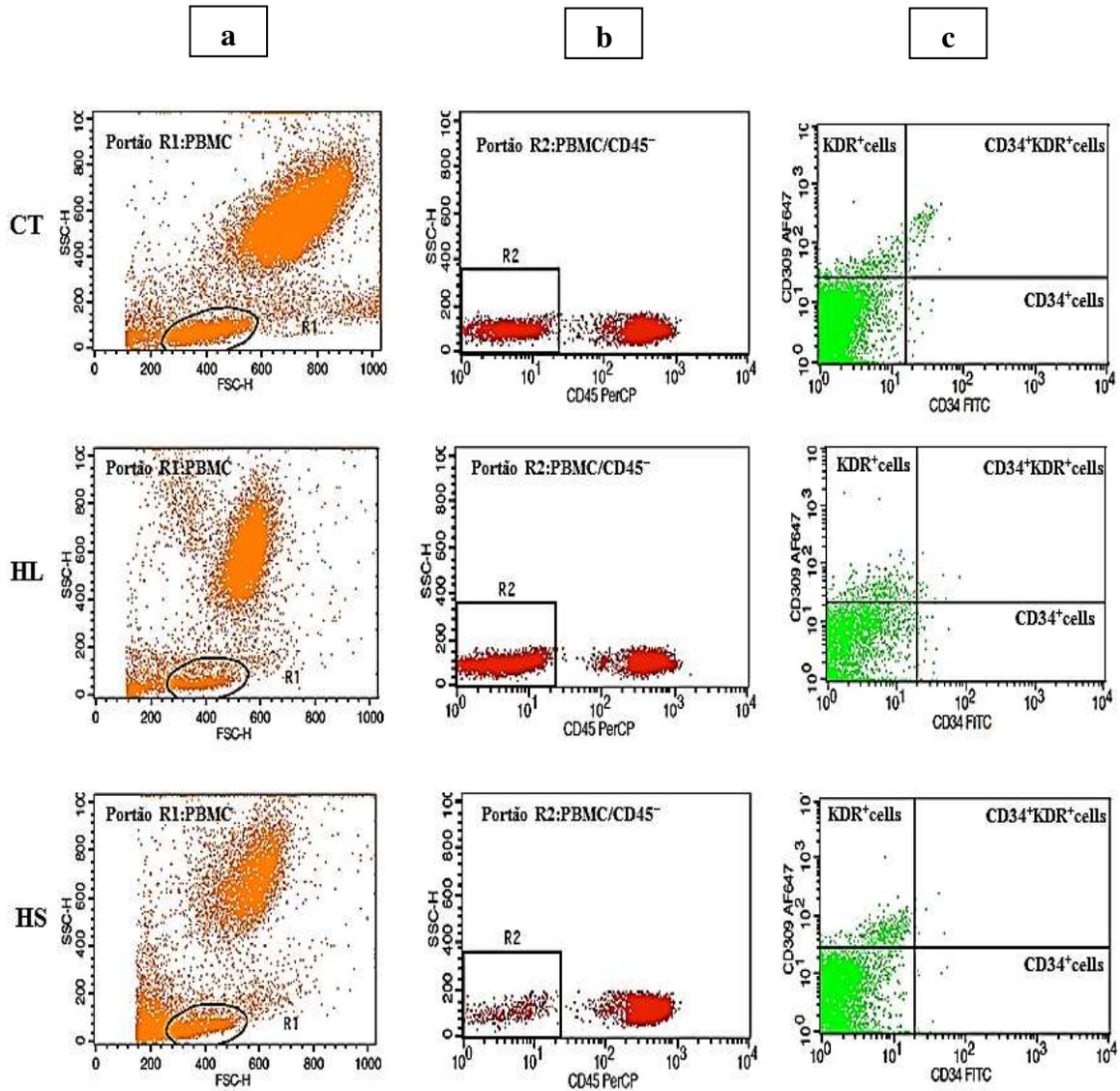


Figura 17: Análise por citometria de fluxo das células CD45⁻/CD34⁺, CD45⁻/KDR⁺ e EPC (CD45⁻/CD34⁺/KDR⁺) circulantes da população de mulheres normotensas e hipertensas do estudo. Recife, Pernambuco, Brasil, 2013. a) SSC x FCS, círculo R1 indica as células mononucleares. b) CD45 x SSC, portão R2 indica CD45 negativas, onde era esperada a maior população de EPCs. c) Portão CD34 x KDR mostrando células positivas para CD34, KDR e CD34/KDR.

Análise Estatística das Células CD45⁻/CD34⁺, CD45⁻/KDR⁺ e EPCs (CD45⁻/CD34⁺/KDR⁺) pelo Programa CellQuest.

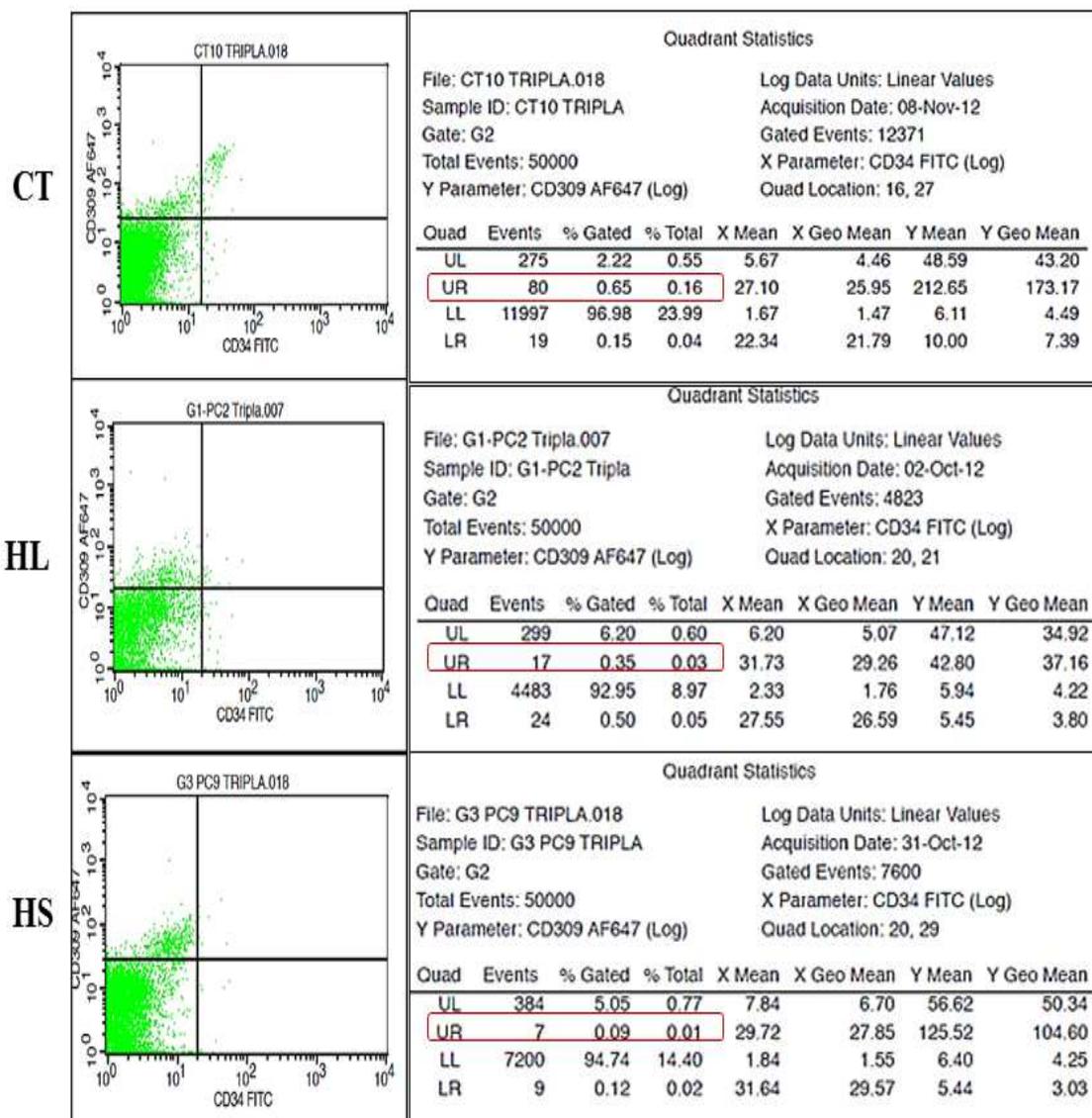


Figura 18: Análise estatística das células CD45⁻/CD34⁺, CD45⁻/KDR⁺ e EPCs(CD45⁻/CD34⁺/KDR⁺) pelo programa CellQuest da população de mulheres normotensas e hipertensas do estudo. Recife, Pernambuco, Brasil, 2013. a) Portão CD34 x KDR mostrando células positivas para CD34, KDR e CD34/KDR.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) - *Relatório Global de Fatores de Riscos para Saúde, 2009* (WHO,2009), a hipertensão continua a ser a principal causa de morbimortalidade em todo o mundo. O aumento da PA é o principal fator de risco cardiovascular (responsável por 16,5% das mortes mundiais); seguido pelo uso do tabaco (9%), hiperglicemia (6%), sedentarismo (6%), sobrepeso e obesidade (5%). Estes fatores elevam o risco das doenças crônicas não transmissíveis; como câncer e diabetes e das DCV, afetando pessoas de todos os grupos de renda.

Estudo sobre mortalidade atribuível aos dez principais fatores de risco nos grupos de países das Américas, segundo definição da OMS, identificou que os países do Grupo B, com baixa taxa de mortalidade na América Latina e Caribe, onde está o Brasil, têm 37,6% de suas mortes determinadas por fatores de risco ligados aos comportamentos e aos estilos de vida. O aumento da PA continua a ser o principal fator de risco cardiovascular (responsável por 12,5% das mortes); seguido pelo sobrepeso (10%), uso do tabaco (8,5%), colesterol (6,5%) e sedentarismo (4%) (BANCO MUNDIAL, 2005).

É bem documentada a associação entre os fatores de risco cardiovasculares e a redução do número e a função de EPCs (MOBIUS-WINKLER et al.,2009; MACENEANEY et al., 2009; FADINI et al.,2010; JIALAL et al.,2010; MOON et al.,2012; CESARI et al.,2013).

Vasa et al. (2001) foram os primeiros a demonstrar que as EPCs tinham reduzida mobilização em pacientes com DCV, apresentando relação inversa entre o número de células e a quantidade de fatores de risco presentes no indivíduo. Além disso, as células mononucleares periféricas derivadas de medula óssea de pacientes com DCV tinham reduzida capacidade de neovascularização. Hill et al.(2003) encontraram, também, uma correlação inversa entre o número de EPCs e número total de fatores de risco. Desta forma, concluiu-se que os fatores de risco cardiovascular tem uma correlação negativa com o número e a função de EPCs.

Por outro lado, o estudo de Werner et al.(2005) realizado em 519 pacientes com doença da artéria coronária previu eventos e morte cardiovascular durante 12 meses de seguimento, e concluíram que o aumento do número e função de EPCs (CD34⁺/KDR⁺) analisadas por unidades formadoras de colônias, correlaciona-se com a diminuição do risco

de morte de causa cardiovascular, de hospitalização e de ocorrência de um primeiro evento cardiovascular de maior proporção, verificaram que a redução do número de EPCs estava associado com um risco quatro vezes maior de um futuro evento cardiovascular, e concluíram que EPCs é um preditor independente de morbimortalidade por DCV. No entanto, o mecanismo subjacente a diminuição do número ou função celular em pacientes com DCV não foi ainda totalmente elucidado.

Em relação aos fatores de risco cardiovasculares, verificamos inicialmente em nossa pesquisa a redução do uso de tabaco nos grupos de mulheres hipertensas (7%) em comparação com dados nacionais do Ministério da Saúde. No ano de 2012, verificou-se no país a prevalência de mulheres fumantes de 11% (35-44 anos) e de 14% (45-54 anos) (DATASUS, 2013), semelhante aos dados verificados no grupo controle. Esta redução pode ser atribuída às orientações realizadas pelos profissionais do Ambulatório de Hipertensão do PROCAPE, no desempenho de suas atividades educativas, revelando a importância da educação em saúde para a redução dos fatores de risco modificáveis para DCV.

Entretanto, o tabagismo é responsável no país por 45% das mortes por doença coronariana, 85% das mortes por doença pulmonar obstrutiva crônica, 25% das mortes por doença cerebrovascular, 30% das mortes por câncer e 90% das mortes por câncer do pulmão (INCA,2006). Além disso, o tabaco atua em sinergia com outros fatores de risco como a hipercolesterolemia, hipertensão e diabetes tipo II, multiplicando, dessa forma, os riscos para as DCV. Nos fumantes o risco de desenvolvimento de acidente vascular cerebral é duas vezes maior; de doença coronariana é quatro vezes maior e de doenças vasculares periféricas é dez vezes maior. O tabagismo está, também, relacionado com o aumento de osteoporose em mulheres na fase pós-menopausa (WHO, 2010a).

Em relação ao Sedentarismo, constitui importante fator de risco, já estando bem estabelecida a ocorrência de maior taxa de eventos cardiovasculares e de mortalidade em indivíduos com baixo nível de condicionamento físico (WITKOWSKI et al., 2010; CESARI et al., 2013). Estima-se que 3,2 milhões de pessoas morrem por ano devido à inatividade física (WHO, 2009); e que o sedentarismo aumenta o risco de mortalidade por todas as causas de 20% a 30% (WHO, 2010b).

Entretanto, no Brasil apenas 12% das mulheres de 35-55 anos se definiam fisicamente ativas em 2012 (DATASUS, 2013), isto é, realizavam exercícios físicos três

vezes por semana por no mínimo 30 minutos. No nosso estudo, constatamos elevado percentual de sedentarismo (>70%) no grupo de mulheres hipertensas, aumentando ainda mais o risco de complicações cardiovasculares.

Atualmente, a atividade física regular se tornou uma parte importante de um estilo de vida saudável e dos programas de reabilitação cardiovascular (KOKKINOS et al.,2010; CESARI et al.,2013). A OMS recomenda exercício aeróbico regular de 150 minutos de intensidade moderada, distribuídos ao longo da semana (30 minutos/cinco vezes por semana) para a promoção da saúde (WHO,2010b).

Dados epidemiológicos, clínicos e experimentais confirmam que a prática regular de exercício reduz a PA, melhora a função endotelial e a rarefação capilar na hipertensão (FAGARD, 2005), contribuindo para a redução de 30% na mortalidade por DCV (KOKKINOS et al.,2010); reduz o risco de doença circulatória, inclusive hipertensão, diabetes, câncer de mama e de cólon; reduz a depressão, fraturas por osteoporose e ajuda no controle do peso (WHO,2010b).

A associação da prática regular de exercícios físicos com as EPCs foi constatada no estudo Adam et al. (2004), realizado com pacientes com isquemia do miocárdio, verificaram o aumento de EPCs, entre 24-48h após exercício físico, correlacionado com uma maior concentração de VEGF no plasma. De forma semelhante, Steiner et al. (2005) observaram em pacientes com doença arterial coronária e com fatores de risco cardiovascular, um aumento do número de EPCs relacionadas com aumento de NO, depois de 12 semanas de treinamento físico aeróbio.

Conclui-se que, a prática regular de atividade física é reconhecida como um fator essencial para a promoção de benefícios vasculares, atuando de forma positiva sobre as EPCs, aumentando o número de células circulantes (THORELL et al.,2009;VAN CRAENENBROECK et al.,2010), ao contrário do sedentarismo que promove sua redução (LIPPINCOTT et al.,2008; WITKOWSKI et al.,2010).

É bem documentado que os fatores de risco cardiovascular individuais da SM foram também correlacionados com a redução do número e funcionalidade de EPCs e que indivíduos com a síndrome apresentam disfunção endotelial. A hipótese atual é que as EPCs desempenham um papel na interação e sinergia entre os componentes da SM. A

literatura fornece várias evidências de redução de EPCs em pacientes com SM (WESTERWEEL et al., 2008; FADINI et al., 2009b; JIALAL et al., 2010).

O estudo de Nakazone et al. (2007) realizado com 340 brasileiros, distribuídos em dois grupos (200 pacientes cardíacos/140 controles), pareados por sexo e idade, identificou que 55% dos pacientes e 8,6% dos controles ($p < 0,0001$) apresentaram três parâmetros para diagnóstico de SM conforme NCEP-ATPIII. No sexo feminino (30-50 anos) verificaram colesterol total ($201 \pm 37,2$); HDL-c (52 ± 11); LDL-c ($129 \pm 32,1$; $p = 0,0425$); triglicérido ($103 \pm 55,6$) e glicemia ($105 \pm 46,8$).

Em nossa casuística, identificamos elevado percentual (67%) de mulheres com hipertensão severa com SM verificada pela diminuição do HDL-c (48 ± 5 ; $p < 0,01$); aumento do LDL-c (143 ± 14 ; $p < 0,01$), aumento dos triglicéridos (153 ± 38 ; $p < 0,001$), aumento da glicemia (121 ± 39 ; $p < 0,01$) e aumento do IMC (29 ± 3 ; $p < 0,05$) sendo 54% de sobrepeso e 39% de obesidade.

O estudo de Fadini et al. (2009a) em uma amostra de 219 indivíduos de meia-idade, demonstrou a correlação entre HDLc e EPCs evidenciando que sua concentração é um determinante independente negativo de redução de células progenitoras ($CD34^+$). A capacidade de HDL-c de aumentar a biodisponibilidade do NO pode justificar esta relação porque NO é um importante regulador da mobilização e função das EPCs (ADAMS et al., 2004).

Alguns estudos também verificaram a existência de correlações negativas significativas entre células progenitora ($CD34^+$), EPCs ($CD34^+/KDR^+$) e concentrações de triglicéridos (FADINI et al., 2009a; MORISHITA, et al., 2012). Apesar de o fato de que a hipertrigliceridemia ser frequentemente associada com DCV, geralmente não é um dos seus determinantes independentes, porque é principalmente o resultado de um fisiopatológico subjacente processo, tais como a resistência à insulina. Contudo, uma explicação possível para a ligação entre a hipertrigliceridemia e alteração nas EPCs foi fornecida por Liu et al. (2008) que demonstraram que o plasma de pacientes hipertrigliceridêmicos induz a senescência de EPCs em cultura.

Em relação à obesidade/sobrepeso, representam importante problema de saúde pública atingindo todas as faixas etárias e grupos socioeconômicos, despontando como um problema mais grave que a desnutrição, à medida que se consegue erradicar a miséria entre

as camadas mais pobres da população. O aumento da prevalência de obesidade observado na região das Américas nas últimas décadas tem sido atribuído principalmente, às mudanças nos hábitos alimentares da população, com maior consumo de alimentos de alta densidade energética, alto consumo de carboidratos refinados, gorduras saturadas, colesterol, ácidos graxos trans, bebidas alcoólicas e alimentos industrializados; redução da atividade física, devido aos avanços tecnológicos no trabalho, ao uso de veículos automotores, elevadores, escadas rolantes e aumento do tempo gasto em atividades sedentárias (jogos eletrônicos, televisão, computador) (WHO, 2009).

Por outro lado, as relações entre sobrepeso/obesidade e condições crônicas são muito conhecidas. O risco de morte cresce com o aumento do peso, especialmente na faixa de 30 a 64 anos. Indivíduos obesos têm 50% de risco de morte prematura; maior incidência de acidentes vasculares cerebrais e cardiopatias; duas vezes maior incidência de hipertensão arterial e alguns tipos de câncer. 80% dos portadores de DM2 têm sobrepeso ou obesidade, e o ganho de peso de 5-8 quilos duplica a chance de se ter a doença. A obesidade também está associada com a dislipidemias, com elevação dos níveis plasmáticos dos triglicerídeos e diminuição do HDLc (WHO, 2009).

No Brasil, em termos nutricionais, vem ocorrendo a redução da prevalência de desnutrição e o aumento do sobrepeso e obesidade. No ano de 2012, segundo dados do Ministério da Saúde, 33% dos brasileiros adultos apresentavam sobrepeso e 17% tinham obesidade. Em relação ao gênero, 38% dos homens e 30% das mulheres apresentavam sobrepeso; e 16% dos homens e 18% das mulheres tinham obesidade (DATASUS, 2013). No período de 2006 a 2010, os percentuais de adultos com sobrepeso ou obesidade aumentaram de 43% para 48% (VIGITEL, 2011).

A associação do sobrepeso/obesidade com EPCs foi constatada no estudo de MacEaney et al.(2009) realizado com 67 indivíduos normotensos sedentários (45-65 anos), não fumantes e sem doença cardiovascular e metabólica evidente, sendo 25 eutróficos (12 homens/13 mulheres); 18 com sobrepeso (12 homens/6 mulheres) e 24 obesos (18 homens/6 mulheres), verificaram por citometria de fluxo a redução de 50% no percentual ($p < 0,05$) de EPCs circulantes ($CD45^-/CD34^+/KDR^+/CD133^+$) e $CD45^-/CD34^+$ em indivíduos obesos (0,0007 e 0,050) em comparação com sobrepeso (0,0016 e 0,089) e eutróficos (0,0015 e 0,082), respectivamente. Neste estudo, foi constatada uma relação

inversa significativa ($p < 0,05$) entre o IMC e EPCs ($r = - 0,25$) e de células CD45⁻/CD34⁺ ($r = - 0,26$). O percentual de gordura corporal, também, foi negativamente associado com o número de células CD45⁻/CD34⁺.

Evidências também comprovam a associação da diabetes com disfunção endotelial e com a diminuição do número e funcionalidade das EPCs (FADINI et al.,2007; WERNER ; NIEKENIG, 2006). Estudo de Moon et al.(2012) realizado com 73 pacientes portadores de DM2, sem doenças isquêmicas e com placa de aterosclerose na artéria carótida, verificaram diminuição significativa de EPCs circulantes (CD34⁺/133⁺/KDR⁺) por citometria de fluxo, em comparação com indivíduos saudáveis.

No Brasil (DATASUS, 2013), no ano de 2012, verificou-se a prevalência 5% de DM2 em mulheres na faixa 35-44 anos e 9% de 45-54 anos. Assim, concluímos que o percentual de 27% DM2 e da média da glicemia em jejum de 121mg/dL \pm 39 ($p < 0,01$), verificados no grupo HS é bastante elevado, podendo ter comprometido o número de EPCs circulantes, aumentando ainda mais o risco de doenças cardiovascular.

Portanto, o agrupamento dos componentes da SM verificado no grupo HS, torna-se de suma importância, implicando uma interação sinérgica significativa dos seus componentes aumentando o risco de DCV. Conclui-se que o desenvolvimento de hiperglicemia e dislipidemia irá reduzir ainda mais os níveis de EPCs e promover eventos cardiovasculares. Em apoio a esta hipótese, foi demonstrado que o declínio de células progenitoras (CD34⁺) e EPCs (CD34⁺/KDR⁺) são sinergicamente afetados pelo agrupamento dos componentes da SM (FADINI et al.,2009b; JIALAL et al.,2010).

Em relação à hipertensão, nas últimas décadas tem sido demonstrado que a disfunção endotelial e a rarefação microvascular característica da hipertensão estão associadas com o desenvolvimento das DCV; e que o desequilíbrio entre o processo de dano e reparo vascular promove sua progressão. Um possível mecanismo explicativo pelo qual estes fatores promoveriam o início, a manutenção e a progressão das DCV está na bioatividade reduzida das EPCs (UMEMURA; HIGASHI, 2008).

Estudo de Vasa et al.(2001) constatou que em pacientes hipertensos a função das EPCs estava reduzida na circulação, e que a hipertensão essencial é a principal causa da diminuição da capacidade migratória das EPCs para a circulação, provavelmente repercutindo no desenvolvimento da rarefação vascular. Evidências tem comprovado que a

hipertensão reduz os níveis de EPCs da medula óssea provocando acelerado processo de envelhecimento celular (IMANISHI et al.,2005).

Além disso, estudos com pacientes hipertensos, em que o número e a capacidade funcional de EPCs estavam diminuídos, em que foram usadas drogas anti-hipertensivas, demonstrou que a mobilização de EPCs acelerou a restauração do endotélio lesionado, resultando no menor espessamento da camada neointima recuperando a integridade vascular, provocando reversão da disfunção endotelial e da rarefação decorrentes da hipertensão em sinergia com a correção da disfunção celular (WALTER et al.,2004).

Em nosso estudo, inicialmente realizamos análise das células mononucleares imunomarcadas CD45⁺ devido ser um marcador expresso na superfície de todos os leucócitos humanos. Verificamos aumento de 17% (p<0,05) no percentual de células no grupo HS vs. CT, e aumento de 49% (p<0,05) no HS vs. HL, evidenciando um padrão inflamatório apenas no grupo de mulheres com hipertensão severa.

De fato, a hipertensão é também um processo inflamatório e relaciona-se com o SRAA, o estresse oxidativo, fatores inflamatórios, fatores de crescimento e secreção de citocinas derivadas do endotélio. Alguns pesquisadores demonstraram que há uma diminuição no número de EPCs em estados inflamatórios crônicos (HILL et al.,2003; FADINI et al.,2009). Com efeito, tem sido demonstrado que a Ang II diminui o número de EPCs e aumenta sua senescência (IMANISHI et al.,2005); enquanto que estes efeitos são bloqueados por medicações antagonistas do receptor AT₁ que produz aumento dos níveis de EPCs concomitante com aumentos dos níveis de NO. Por outro lado, a aldosterona exerce efeitos negativos sobre as EPCs diminuindo a sinalização PI3K/AKT, síntese do NO e do VEGF (MARUMO et al.,2006).

Posteriormente investigamos as células CD45⁻ em virtude das EPCs serem definidas fenotipicamente por esse marcador, e constatamos importante diferença também no grupo HS vs. CT, que apresentou redução de 47% (p<0,05) no número e de 36% (p<0,05) no percentual celular. Verificamos entre os grupos HS vs. HL redução de 62% (p<0,05) no número e de 56% no percentual celular nas mulheres com hipertensão severa, evidenciando que a hipertensão em estágio avançado contribuiu para a redução destas células. De forma inversa, identificamos aumento no de 42% (p<0,05) no número e de 46% (p<0,05) no percentual celular no grupo HL vs. CT. Berezin, 2014 observou um aumento de células

CD45⁺/CD34⁺ circulante e relacionou este aumento com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Em relação às células CD34⁺, estão mais estreitamente relacionadas com o risco cardiovascular e fornecem uma análise mais abrangente da linhagem das células progenitoras hematopoiética (FADINI et al.,2009b). Desta forma, avaliamos as células CD45⁻/CD34⁺ e constatamos, também, redução de 61% (p<0,05) no número e de 46% (p<0,05) no percentual celular apenas no grupo HS vs. CT, e redução de 52 % (p<0,05) no HS vs. HL, retificando que a hipertensão em estágio avançado correlaciona-se com maior risco cardiovascular.

Entretanto, há controvérsias na literatura a respeito da caracterização fenotípica das EPCs. Em nosso estudo analisamos as células marcadas CD34⁺/KDR⁺ porque representa 80% das EPCs circulantes (FADINI et al.,2012), sendo também o mais significativo em termos de medida da validade biológica (HRISTOV et al.,2003); vários pesquisadores demonstraram que este é o único fenótipo repetidamente e convincente de ser um preditor independente de eventos cardiovasculares (SCHMIDT-LUCKE et al.,2005; FADINI et al.,2012). Vasa et al.(2001) identificaram que o número de células CD34⁺/KDR⁺ circulantes, avaliadas por citometria de fluxo, estavam 48% reduzidas em pacientes com doença da artéria coronária em comparação aos controles saudáveis.

Em relação às células EPCs (CD45⁻/CD34⁺/KDR⁺), principal objetivo deste estudo, verificamos no grupo HL vs. CT redução de 74% (p<0,05) no percentual de células; e no HS vs. CT redução de 88% no número (p<0,05) e percentual (p<0,01) celular. Na análise entre os grupos identificamos no HS vs. HL redução significativa de 67% (p=0,017) do percentual de células, evidenciando que o número e percentual de EPCs foram negativamente correlacionados com o estágio da hipertensão. Especula-se atualmente, devido aos raros estudos que relacionam exclusivamente HAS e EPCs, que a disfunção das células progenitoras endoteliais participa, também, do estabelecimento da hipertensão (van ZONNEVELD; RABELINK, 2006), o que nos motivou a realização desta pesquisa.

CONCLUSÕES

8 CONCLUSÕES

Nossos resultados retificam que hipertensão é uma importante causa da diminuição da capacidade migratória das EPCs da medula óssea para a circulação; e evidencia que o número de EPCs reduzem progressivamente com o aumento do estágio da hipertensão. Portanto, a contagem das EPCs pode ser considerada marcador biológico adequado para acompanhar a evolução do estado hipertensivo e direcionar a assistência ao paciente.

Os principais resultados desta pesquisa foram:

- **Células marcadas CD45 positivas:** Aumento de 17% ($p < 0,05$) no percentual de células no grupo HS vs. CT; e de 49% ($p < 0,05$) no HS vs. HL evidenciando um padrão inflamatório apenas no grupo com hipertensão severa.
- **Células marcadas CD45 negativas:** Redução de 47% ($p < 0,05$) do número de células no grupo HS vs. CT, e de 62% ($p < 0,05$) no HS vs. HL, demonstrando redução apenas no grupo com hipertensão severa.
- **Células marcadas CD45⁻/CD34⁺:** Redução de 61% ($p < 0,05$) do número de células apenas no grupo HS vs. CT, e de 52% ($p < 0,05$) no HS vs. HL; segundo a literatura estas células estão mais relacionadas com o risco cardiovascular.
- **Células marcadas CD45⁻/CD34⁺/KDR⁺:** Redução de 74% ($p < 0,05$) do percentual de células no HL vs. CT, e de 88% do número ($p < 0,05$) e percentual ($p < 0,01$) celular no HS vs. CT. Na análise entre os grupos de hipertensas, verificamos redução do número celular de 67% ($p = 0,017$) no HS vs. HL, evidenciando as EPCs reduziram progressivamente com o aumento do estágio da hipertensão.
- **Síndrome metabólica:** Quanto aos níveis séricos bioquímicos verificou-se: HDL-c [HL (52±7), HS (48±5)]; LDL-c [HL (130±8), HS (143±15)]; triglicerídeos [HL (138±19), HS (153±40)]; glicemia de jejum [HL (95±7), HS (121±39)] e IMC [HL (31±4), HS (29±3)]; revelando 67% das mulheres do grupo HS tinham SM. É bem documentado que os fatores de risco cardiovascular da SM foram correlacionados com a redução do número de EPCs, e que indivíduos com a síndrome apresentam disfunção endotelial. A hipótese atual é que as EPCs desempenham importante papel na interação e sinergia entre os componentes da SM.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ADAMS, V.K.L.; LINKE, A.; D LENZ; ERBS, S.; M SANDRI; TARNOK, A.; GIELEN, S.; F EMMRICH; SCHULER, G.; R HAMBRECHT. Increase of circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease after exercise-induced ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v.24(4):684-90. Apr.2004.
- ALBA, A.C.; LALONDE, S.D.; RAO, V.; WALTER, S.; GUYATT, G.H.; ROSS, H.J. Circulating Proangiogenic Progenitor Cells Independently Predict Functional Capacity in Heart Failure Patients. *Can J Cardiol*. 29(6):664-71.2013.
- ASAHARA, T.; MUROHARA, T.; SULLIVAN, A.; SILVER, M.; VAN DER ZEE, R.; LI, T.; WITZENBICHLER, B.; SCHATTEMAN, G.; ISNER, J.M. Isolation of putative progenitor endothelial cell for angiogenesis. *Science*, v.275: 964-967.1997.
- BALLIGAND, J.L.; FERON, O.; DESSY, C. eNOS Activation by Physical Forces: From Short-Term Regulation of Contraction to Chronic Remodeling of Cardiovascular Tissues. *Physiol Rev*. 89: 481-534, 2009.
- BAKOIANNIS, C.; TOUSOULIS, D.; ANDROULAKIS, E.; BRIASOULIS, A.; PAPAGEORGIOU, N.; VOGIATZI, G.; et al. Circulating endothelial progenitor cells as biomarkers for prediction of cardiovascular outcomes. *Curr Med Chem*. 19 (16): 2597-604.2012.
- BANCO MUNDIAL. Enfrentando o desafio das doenças não transmissíveis no Brasil. Brasília: Unidade de Gerenciamento do Brasil, Relatório nº 32576-BR; 2005.
- BEREZIN, A.E., KREMZER, A.A., Circulating Endothelial Progenitor Cells as Markers for Severity of Ischemic Chronic Heart Failure *Journal of Cardiac Failure* 20 (6): 438–447
- BONSIGNORE, M.R.; MORICI, G.; RICCIONI, R.; HUERTAS, A.; PETRUCCI, E.; VECA, M.; et al. Hemopoietic and angiogenetic progenitors in healthy athletes: different responses to endurance and maximal exercise. *J Appl Physiol*, v.109(1):60-7.2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde, Conselho Nacional de Saúde. Comissão de Ética e Pesquisa-CONEP. Resolução nº196/96 sobre pesquisa com seres humanos. Brasília, 1996.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Diabetes Mellitus/Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.p.56.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de Situação de Saúde. Plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) no Brasil 2011-2022 Brasília: Ministério da Saúde, 2011.148 p. (Série B. Textos Básicos de Saúde).

CASE, J.; MEAD, L.E.; BESSLER, W.K.; PRATER, D.; WHITE, H.A.; SAADATZADEH, M.R. et al. Human CD34⁺AC133⁺VEGFR2⁺ cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors. *Exp Hematol*, v. 35: 1109-1118.2007.

CARVALHO, M.H.C. de; COLACO, A.L.; FORTES, Z.B. Citocinas, disfunção endotelial e resistência à insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab* [online], v.50(2): 304-312.2006.

CESARI, F.; MARCUCCI, R.; GORI, A.M.; BURGISSER, C.; FRANCINI, S.; SOFI, F.; GENSINI, G.F.; ABBATE, R.; FATTIROLI, F. Impact of a cardiac rehabilitation program and inflammatory state on endothelial progenitor cells in acute coronary syndrome patients. *Int J Cardiol*.v.167(5):1854-1859.September.2013.

CHEN, J.Z.; ZHANG, F.R.; TAO, Q.M.; WANG, X.X.; ZHU, J.H.; ZHU, J.H. Number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood in patients with hypercholesterolaemia. *Clin Sci (Lond)*. 107: 273-280.2004.

CHEUNG, B.M.; WAT, N.M.; TAM, S.; THOMAS, G.N.; LEUNG, G.M.; CHENG, C.H.; WOO, J.; JANUS, E.D.; LAU, C.P.; LAM, T.H.; LAM, K.S. Components of the metabolic syndrome predictive of its development:a 6-year longitudinal study in Hong Kong Chinese. *Clin Endocrinol (Oxf)*, v.68:730-737.2008.

DAHER, Z.; BOULAY, P.L.; DESJARDINS, F.; GRATTON, J.P.; CLAING, A. Vascular endothelial growth factor receptor-2 activates ADP-ribosylation factor 1 to promote endothelial nitric-oxide synthase activation and nitric oxide release from endothelial cells. *J Biol Chem*, v.6;285(32):24591-9.Aug.2010.

DATASUS. Ministério da Saúde. Departamento de Informática do SUS. Sistema de informação sobre Mortalidade e Morbidade, 2013. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def>. Acesso em 27 de março de 2013.

DECS. Descritores em Ciências da Saúde. Biblioteca Virtual em Saúde. Disponível em: <http://decs.bvs.br/>. Acesso em 25 de março de 2013.

EGUCHI, M.; MASUDA, H.; ASAHARA, T. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Clin Exp Nephrol*, v. 11: 18-25.2007.

ECKEL, R.H.; GRUNDY, S.M.; ZIMMET, P.Z. The metabolic syndrome. *Lancet*, v.365:1415-28.2005.

FADINI, G.P.; PUCCI, L.; VANACORE, R.; BAESSO, I.; PENNO, G.; BALBARINI, A.; DI STEFANO, R.; MICCOLI, R.; DE KREUTZENBERG, S.; CORACINA, A.; TIENGO, A.; AGOSTINI, C.; DEL PRATO, S.; AVOGARO, A. Glucose tolerance is negatively associated with circulating progenitor cell levels. *Diabetologia*, v.50:2156–2163.2007.

FADINI, G.P.; de KREUTZENBERG, S.; AGOSTINI, C.; BOSCARO, E.; TIENGO, A.; DIMMELER, S.; AVOGARO, A. Low cd34⁺ cell count and metabolic syndrome synergistically increase the risk of adverse outcomes. *Atherosclerosis*.207:213-219.2009a.

FADINI, G.P.; AGOSTINI, C.; BOSCARO, E.; AVOGARO, A. Mechanisms and significance of progenitor cell reduction in the metabolic syndrome. *Metab Syndr Relat Disord.* v.7(1):5-10.Feb.2009b.

FADINI, G.P.; MARUYAMA, S.; OZAKI, T.; TAGUCHI, A.; MEIGS, J.; DIMMELER, S.; et al. Circulating progenitor cell count for cardiovascular risk stratification: a pooled analysis. *PLoS ONE.*5 e11488.2010.

FADINI, G.P.; LOSORDO, D.; DIMMELER, S. Critical reevaluation of endothelial progenitor cell phenotypes for therapeutic and diagnostic use. *Circ Res.* 110(4): 624-37.2012.

FAGARD, R.H. Physical activity, physical fitness and incidence of hypertension. *Journal of Hypertension,* v.23:265-67.2005.

FAVRE, J.; GAO, J.; HENRY, J.P. et al. Endothelial estrogen receptor {alpha} plays an essential role in the coronary and myocardial protective effects of estradiol in ischemia/reperfusion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* v.30:2562-2567.2010.

FOURNIER, D.; LUFT, F.C.; BADER, M.; GANTEN, D.; ANDRADE NAVARRO, M.A. Emergence and evolution of the renin-angiotensin-aldosterone system. *J Mol Med (Berl),* v.90(5):495-508.May.2012.

GNECCHI, M.; ZHANG, Z.; NI, A.; DZAU, V.J. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circulation Research.*103:1204-1219, 2008.

GOUSSETIS, E.; SPIROPOULOS, A.; TSIRONI, M.; SKENDERI, K.; MARGELI, A.; GRAPHAKOS, S. et al. Spartathlon, a 246 kilometer foot race: effects of acute inflammation induced by prolonged exercise on circulating progenitor reparative cells. *Blood Cells Mol Dis.* v.42(3):294-9.2009.

HILL, J.M.; ZALOS, G.; HALCOX, J.P.; SCHENKE, W.H.; WACLAWIWI, M.A.; QUYUUMI, A.A.; FINKEL, T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *The New England Journal of Medicine,* v.348:593-600.2003.

HRISTOV, M.; WOLFGANG, E.; WEBER, P.C. Endothelial Progenitor Cells. Mobilization, Differentiation, and Homing. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology,* v. 23:1185-1189.2003.

HRISTOV, M.; WEBER, P.C. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *Journal of Cellular and Molecular Medicine,* v.8: 498-508.2004.

IMANISHI, T.; HANO, T.; NISHIO, I. Angiotensin II accelerates endothelial progenitor cell senescence through induction of oxidative stress. *J Hypertens,* v.23:97-104.2005.

INCA-Instituto Nacional do Câncer. A situação do câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA/Ministério da Saúde; 2006.

- IWAMI, Y.; MASUDA, H.; ASAHARA, T. Endothelial progenitor cells: past, state of the art, and future. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v.8: 488-497.2004.
- KASAL,D.A.B.;NEVES, M.F. Inflamação como mecanismo patogênico na hipertensão arterial. *Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto*,v.10(3):12-19.2011.
- KOKKINOS, P.; MYERS, J.; FASELIS, C.; PANAGIOTAKOS, D.B.; DOUMAS, M.; PITTARAS, A.; et al. Exercise capacity and mortality in older men: a 20-year follow-up study. *Circulation*, v.122 (8):790-7.2010.
- JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M.J. Citometria de Fluxo e análise por FACS. *Imunobiologia*. Porto Alegre: Artmed Editora S.A. 6.ed.p.706-708.2007.
- JIALAL, I.; DEVARAJ, S.; SINGH, U.; HUET, B.A. Decreased number and impaired functionality of endothelial progenitor cells in subjects with metabolic syndrome: implications for increased cardiovascular risk. *Atherosclerosis*, v.211(1):297-302.Jul. 2010.
- LAN, T.H.; HUANG, X.Q.; TAN, H.M. Vascular fibrosis in atherosclerosis, *Cardiovascular Pathology* (2013), Disponível: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carpath.2013.01.003>. Acesso em 2 de maio de 2013.
- LAUFS, U.; URHAUSEN, A.; WERNER, N.; SCHARHAG, J.; HEITZ, A.; KISSNER, G.; BÖHM, M.; KINDERMANN, W.; NICKENIG, G. Running exercise of different duration and intensity: effect on endothelial progenitor cells in healthy subjects. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*, v.12(4):407-14.Aug.2005.
- LIPPINCOTT, M.F.; DESAI, A.; ZALOS, G.; et al. Predictors of endothelial function in employees with sedentary occupations in a worksite exercise program. *Am J Cardiol*. v.1;102 (7):820-4.Oct.2008.
- LIU, L.; WEN, T.; ZHENG, X.Y.; YANG, D.G.; ZHAO, S.P.; XU, D.Y.; LU, G.H. Remnant-like particles accelerate endothelial progenitor cells senescence and induce cellular dysfunction via an oxidative mechanism. *Atherosclerosis*. 2008.
- MACENEANEY, O.J.; KUSHNER, E.J.; VAN GUILDER, G.P.; GREINER, J.J.; STAUFFER, B.L.; DE SOUZA, C.A. Endothelial progenitor cell number and colony-forming capacity in overweight and obese adults. *International Journal of Obesity*. v. 33:219-225.2009.
- MARGELI, A.; SKENDERI, K.; TSIRONI, M.; HANTZI, E.; MATALAS, A.L.; VRETTOU, C.; et al. Dramatic elevations of IL-6 and acute-phase reactants in athletes participating in the ultradistance foot race spartathlon: severe systemic inflammation and lipid and lipoprotein changes in protracted exercise. *J Clin Endocrinol Metab*. v. 90 (7):3914-8.2005.
- MARUMO, T.; UCHIMURA, H.; HAYASHI, M.; HISHIKAWA, K.; FUJITA, T. Aldosterone impairs bone marrow-derived progenitor cell formation. *Hypertension*, v. 48:490–496.2006.

- MASOULEH, B.K.; BARANISKIN, A.; SCHMIEGEL, W.; SCHROERS, R. Quantification of circulating endothelial progenitor cells in human peripheral blood: Establishing a reliable flow cytometry protocol. *Journal of Immunological Methods*, v.357: 38-42.2010.
- MILLER, A.A.; DE SILVA, T.M.; JACKMAN, K.A, SOBEY, C.G. Effect of gender and sex hormones on vascular oxidative stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol* ,v.34:1037-1043.2007.
- MÖBIUS-WINKLER, S.; HÖLLRIEGEL, R.; SCHULER, G.; ADAMS, V. Endothelial progenitor cells: Implications for cardiovascular disease. *Cytometry*, v.75A: 25-37.2009.
- MOON, J.H.; CHAE, M.K.; KIM, K.J.; KIM, H.M.; CHA, B.S.; LEE, H.C.; KIM, Y.J.; LEE, B.W. Decreased endothelial progenitor cells and increased serum glycated albumin are independently correlated with plaque-forming carotid artery atherosclerosis in Type 2 Diabetes Patients Without Documented Ischemic Disease. *Circ J*, v.76:2273-2279.2012.
- MORISHITA, T.; UZUI, H.; NAKANO, A.; MITSUKE, Y.; GESHI, T.; UEDA, T.; LEE, J.D. Number of endothelial progenitor cells in peripheral artery disease as a marker of severity and association with pentraxin-3, malondialdehyde-modified low-density lipoprotein and membrane type-1 matrix metalloproteinase. *J Atheroscler Thromb*. 19(2): 149-158.2012.
- MOTA, V.T. Bioquímica, Rio de Janeiro: Medbook, 2011. Cap.9, 235-267.
- MÜLLER-EHMSSEN, J.; BRAUN, D.; SCHNEIDER, T.; et al. Decreased number of circulating progenitor cells in obesity: beneficial effects of weight reduction. *Eur Heart J*. 29:1560-8.2008.
- NAKAZONE, M.A.; PINHEIRO, A.; BRAILE, M.C.V.B.; PINHEL, M.A. DE S.; SOUSA, G.F.; JÚNIOR, S.P.; BRANDÃO, A.C.; TOLEDO, J.C.Y.; BRAILE, D.M.; SOUZA, D.R.S. Prevalência de síndrome metabólica em indivíduos brasileiros pelos critérios de NCEP-ATPIII e IDF. *Rev. Assoc. Med. Bras*, v.53(5):407-413.2007.
- NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*,v.106:3143-3421.2002.
- OLIVERAS, A.; SOLER, M.J.; MARTÍNEZ-ESTRADA, O.M.; et al. Endothelial progenitor cells are reduced in refractory hypertension. *J Hum Hypertens*. 22:183-90. 2008.
- PADFIELD, G.J.; TURA-CEIDE, O.; FREYER, E.; BARCLAY, G.R.; TURNER, M.; NEWBY, D.E.; MILLS, N.L. Endothelial progenitor cells, atheroma burden and clinical outcome in patients with coronary artery disease. *Heart*. 99(11):791-8.2013
- PAULI, J.R.; CINTRA, D.E.; SOUZA, C.T.; ROPELLE, E.R. Novos mecanismos pelos quais o exercício físico melhora a resistência à insulina no músculo esquelético. *Arq Bras Endocrinol Metab* [online],vol.53, n.4, p.399-408.2009.

PEDERSEN, B.K.; FEBBRAIO, M.A. Muscle as an Endocrine Organ: Focus on Muscle-Derived Interleukin-6. *Physiol Rev*,v.88:1379-406.2008.

PIRRO M, BAGAGLIA F, PAOLETTI L, et al. Hypercholesterolemia-associated endothelial progenitor cell dysfunction. Therapeutic advances in cardiovascular disease. *Ther Adv Cardiovasc Dis*.2:329-39.2008.

RAVI, S.; CAVES, J.M.; MARTINEZ, A.W.; XIAO, J.; WEN, J.; HALLER, C.A.; et al. Effect of bone marrow derived extracellular matrix on cardiac function after ischemic injury. *Biomaterials*.33(31):7736-45.2012.

SANTOS, P.C.J.L.; KRIEGER, J.E.; PEREIRA, A.C. Renin-Angiotensin System, Hypertension, and Chronic Kidney Disease: Pharmacogenetic Implications. *J Pharmacol Sci*, v.120(2) 77-88.2012.

SCHMIDT-LUCKE, C.; RÖSSIG, L.; FICHTLSCHERER, S.; et al. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation* 2005, v.111:2981-2987.2005.

SHANTSILA, E.; WATSON,T.; TSE, H-F.; LIP, G.Y.H. New Insights on Endothelial Progenitor Cell Subpopulations and Their Angiogenic Properties. *J Am Coll Cardiol*,v.51:669-671.2008.

SBC-Sociedade Brasileira de Cardiologia. VI Diretrizes Brasileira de Hipertensão Arterial. *Revista Brasileira de Hipertensão*. 2010:17(1):69p

SCHULZ, E.; ANTER, E.; ZOU, M.H.; KEANEY, J.F.JR. Estradiol-mediated endothelial nitric oxide synthase association with heat shock protein 90 requires adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Circulation*, v. 111:3473–3480.2005.

SHIRWANY, N.A.; ZOU, M.H. Arterial stiffness: a brief review. *Acta Pharmacol Sin*, v.31:1267-76.2010.

SINGH, N.; VAN CRAEYVELD, E.; TJWA, M.; CIARKA, A.; EMMERECHTS, J.; DROOGNE, W. et al. Circulating apoptotic endothelial cells and apoptotic endothelial microparticles independently predict the presence of cardiac allograft vasculopathy. *J Am Coll Cardiol*. 60(4): 324-331.2012.

SIMONCINI, T.; GARIBALDI, S.; FU, X.D.; et al. Effects of phytoestrogens derived from red clover on atherogenic adhesion molecules in human endothelial cells. *Menopause*, v.15:542-550.2008.

STEINER, S.; NIESSNER, A.; ZIEGLER, S.; RICHTER, B.; SEIDINGER, D.; PLEINER, J.; PENKA, M.; WOLZT, M.; HUBER, K.; WOJTA,J.; MINAR, E.; KOPP, C.W. Endurance training increases the number of endothelial progenitor cells in patients with cardiovascular risk and coronary artery disease. *Atherosclerosis* ,v.181(2):305-10.Aug.2005.

THORELL, D.; BORJESSON, M.; LARSSON, P.; ULFHAMMER, E.; KARLSSON, L.; DUTTAROY, S. Strenuous exercise increases late outgrowth endothelial cells in healthy subjects. *Eur J Appl Physiol.*,v.107(4):481-8.2009.

TOUYZ, R.M. Intracellular mechanisms involved in vascular remodelling of resistance arteries in hypertension: role of angiotensin II. *Exp Physiol*, v.90:449-55. 2005.

TSUTSUI, M.; SHIMOKAWA, H.; OTSUJI, Y.; UETA, Y.; SASAGURI, Y.; YANAGIHARA, N. Nitric Oxide Synthases and Cardiovascular Diseases- Insights From Genetically Modified Mice. *Circ J.*73: 986 - 993-2009.

UMEMURA T, HIGASHI Y, NISHIOKA K, JITSUIKI D, GOTO C, NAKAMURA S, et al. Relationship Between CD34⁺AC133⁺CD45^{low} Endothelial Progenitor Cells and Cardiovascular Risk Factors. *Hypertension*. 50:e130.2007.

UMEMURA, T.; HIGASHI, Y. Endothelial progenitor cells: therapeutic target for cardiovascular diseases. *Journal of Pharmacological Sciences.*,v.108:1-6.2008.

URBICH, C.; DIMMELER, S. Endothelial progenitor cells: Characterization and role in vascular biology. *Circulation Research.*95:343-353,2004.

VAN BEEM, R.T.; VERLOOP, R.E.; KLEIJER, M.; NOORT, W.A.; LOOF, N.; KOOLWIJK, P.; ELLEN VAN DER SCHOOT C.; VAN HINSBERGH, V.W.M.; ZWAGINGA, J.J. Blood outgrowth endothelial cells from cord blood and peripheral blood: angiogenesis-related characteristics in vitro. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 7:217-226,2009.

VAN CRAENENBROECK, E.M.; VRINTS, C.J.; HAINE, S.E.; VERMEULEN, K.; GOOVAERTS, I.; VAN TENDELOO, V.F.; et al. A maximal exercise bout increases the number of circulating CD34⁺/KDR⁺ endothelial progenitor cells in healthy subjects. Relation with lipid profile. *J Appl Physiol*,v.104(4):1006-13.2008.

VAN CRAENENBROECK, E.M.; HOYMANS, V.Y.; BECKERS, P.J.; et al. Exercise training improves function of circulating angiogenic cells in patients with chronic heart failure. *Basic Res Cardiol.*,v.105(5):665-76.Sep.2010.

van ZONNEVELD, A.J.; RABELINK, T.J. Endothelial progenitor cells: biology therapeutic potential in hypertension. *Current Opinion in nephrology and hypertension.*,v.2:167-172.2006.

VASA, M.; FICHTLSCHERER, S.; AICHER, A.; ADLER, K.; URBICH, C.; MARTIN, H.; ZEIHNER, A.M.; DIMMELER, S. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res.*,v.89 (1):E1-7.2001.

VASSALLE, C.; SIMONCINI, T.; CHEDRAUI, P.; PÉREZ-LÓPEZ, F.R. Why sex matters: the biological mechanisms of cardiovascular disease. *Gynecological Endocrinology.*, v.14, 1-5.Feb. 2012.

VIGITEL-BRASIL 2010: Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: SGEP/SVS/Ministério da Saúde; 2011.

ZANESCO, A., ZAROS, P.R. Exercício físico e menopausa. *Rev Bras Ginecol Obstet.*,v. 31(5):254-61.2009.

WALTER, D.H.; ZEIHNER, A.M.; DIMMELER, S. Effects of statins on endothelium and their contribution to neovascularization by mobilization of endothelial progenitor cells. *Coronary Artery Disease.*,v.15:235-242.2004.

WERNER, N.; KOSIOL, S.; SCHIEGL, T.; AHLERS, P.; WALENTA, K.; LINK, A.; BOHM, M.; NICKENIG, G. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *The New England Journal of Medicine.*,v.353:999-1007.2005.

WERNER, N.; NICKENIG, G. Influence of cardiovascular risk factors on endothelial progenitor cells: limitations for therapy? *Arterioscler Thromb Vasc. Biol.*,v.26:257-266. 2006.

WESTERWEEL, P.E.; VISSEREN, F.L.; HAJER, G.R.; OLIJHOEK, J.K.; HOEFER, I.E.; DE BREE, P.; RAFII, S.; DOEVENDANS, P.A.; VERHAAR, M.C. Endothelial progenitor cell levels in obese men with the metabolic syndrome and the effect of simvastatin monotherapy vs. simvastatin/ezetimibe combination therapy. *Eur Heart J.*, v.29:2808-2817.2008.

WHO. Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks. Geneva: World Health Organization, 2009.

WHO. Global estimate of the burden of disease from second-hand smoke. Geneva: World Health Organization, 2010a.

WHO. Global recommendations on physical activity for health. Geneva: World Health Organization, 2010b.

WITKOWSKI, S.; LOCKARD, M.M.; JENKINS, N.T.; OBISESAN, T.O.; SPANGENBURG, E.E.; HAGBERG, J.M. Relationship between circulating progenitor cells, vascular function and oxidative stress with long-term training and short-term detraining in older men. *Clin Sci (Lond).*,v.118(4):303-11.2010.

APÊNDICES



APÊNDICE A: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome da pesquisa: Perfil de expressão das células progenitoras endoteliais circulantes CD45⁺/CD34⁺/KDR⁺ em mulheres hipertensas na pré-menopausa, em comparação com mulheres saudáveis normotensas.

Pesquisadora: Tânia M^a Rocha Guimarães

Orientador: Prof^a Dra. Cristina P. Vicente (UNICAMP-IB)

Co-orientador: Prof^a. Dra. Patrícia M. M. F. de Moura (UPE-ICB)

Objetivo da pesquisa: Identificar a presença de células progenitoras endoteliais no sangue de mulheres hipertensas na pré-menopausa em comparação com mulheres saudáveis ou limítrofes para hipertensão.

Metodologia: Análise da amostra de sangue para investigar células envolvidas com hipertensão. Serão analisados dois grupos de mulheres hipertensas em pré-menopausa acompanhadas no PROCAPE e um grupo controle de mulheres saudáveis.

Técnica da coleta sanguínea: A retirada da amostra será realizada pela pesquisadora em veia de antebraço com uso de luvas de procedimentos, bolas de algodão com álcool a 70% para antisepsia da pele, e punção venosa realizada com seringa de 3ml e agulha 25 x 0,7. Será coletado 2 ml de sangue que será colocado em tubo tipo "vacuntainer" com anticoagulante EDTA. O material utilizado na punção será todo estéril e será desprezado em caixa de perfuro cortante.

Benefício: Contribuir para ampliar o conhecimento da atividade das células progenitoras endoteliais e hipertensão, gerando parâmetros para o diagnóstico precoce das doenças cardiovasculares em mulheres.

Risco: As mulheres do estudo terão risco mínimo da coleta sanguínea.

Direitos do Sujeito Pesquisado:

- Garantia de esclarecimento e resposta a qualquer pergunta;
- Liberdade de abandonar a pesquisa a qualquer momento sem prejuízo para si ou para seu tratamento;
- Garantia de privacidade à sua identidade e do sigilo de suas informações;
- Garantia de que os gastos adicionais serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Dúvidas e Esclarecimentos: Ter acesso a informações posteriores ou resposta a outras dúvidas através do autor da pesquisa - **Tânia Maria Rocha Guimarães** - telefone (81) 88318889 e no endereço: Rua Teles Júnior, nº 155-A, apto.501, Rosarinho, Recife- PE; para situações não resolvidas pelo pesquisador, contatar com o Comitê de Ética do PROCAPE

pelo telefone (81)31174616 e endereço: Rua dos Palmares, S/N, Santo Amaro. CEP: 50100-060.

Consentimento Livre e Esclarecido: Eu, _____ após ter recebido todos os esclarecimentos e ciente dos meus direitos, concordo em participar desta pesquisa e autorizo **a retirada de 2 ml do meu sangue**, que não vai prejudicar a minha saúde. Permito a divulgação e publicação de toda a documentação necessária em periódicos, revistas bem como apresentação em congressos e quaisquer eventos de caráter científico, assinando este documento em duas vias, ficando uma via sob meu poder e outra para ser entregue ao pesquisador. Tenho ciência do exposto acima e que não receberei nenhuma espécie de pagamento para participar da pesquisa.

Assinatura do participante: _____

Assinatura da pesquisadora: _____

Recife, ____ / ____ / _____

APÊNDICE B: INSTRUMENTO PARA COLETA DE DADOS

Perfil de expressão de células progenitoras endoteliais circulantes CD45⁻/CD34⁺/KDR⁺ em mulheres hipertensas na pré-menopausa, em comparação com mulheres saudáveis normotensas.

Número da amostra |__|_|

Data de admissão no estudo __/__/__

1. Grupo |__|

1. **Estágio 1** (PS=140-159mmHg/PD=90-99mmHg);

2. **Estágio 3** (PS ≥ 180mmHg/PD ≥ 110mmHg);

3. **Normais** ou **Limítrofes** (PS=130-139 mmHg /PD=85-89mmHg).

2. PA=_____

3. Idade |__| 1.(30 a 34) 2.(35 a 39) 3.(40 a 44) 4.(45 a 50)

4. Colesterol |__| 1.(<160) 2.(160-199) 3.(200-239) 4.(240-279) 5.(≥ 280)

5. HDL-c |__| 1.(<35) 2.(35-44) 3.(45-49) 4.(50-59) 5.(≥ 60)

6. LDL-c |__| 1.(< 130) 2.(130-160) 3.(>160)

7. Triglicérido: |__| 1. (<150) 2.(150-199) 3.(≥200)

8. Diabetes Mellitus tipo 2 |__| 1.(sim) 2.(não)

9. Hábito de Fumo |__| 1.(sim) 2.(não)

10. Prática regulares de exercícios (3 vezes/semana/30min) |__| 1.(sim) 2.(não)

Anotações: _____

APÊNDICE C: ARTIGO

DECREASED NUMBER OF CIRCULATING ENDOTHELIAL PROGENITOR CELLS (EPC) IS ASSOCIATED TO THE HYPERTENSION SEVERITY LEVELS IN PREMENOPAUSAL WOMEN

Running title: Hypertension and EPC

Tânia Maria R. GUIMARÃES ^{ab}, Maria Carolina A. BRELAZ-DE-CASTRO^c, Valéria R. A. PEREIRA^c, George Tadeu N. DINIZ^d, Patrícia MOURA^e, Claudio C. WERNECK ^f, Cristina P. VICENTE^g

^aDepartment of Structural and Functional Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil. ^bNursing School Nossa Senhora das Graças, Pernambuco University (UPE), Recife, PE, Brazil. ^cImmunology Department, Aggeu Magalhaes Research Center, Fiocruz, Recife, PE, Brazil. ^dColective Health Department Aggeu Magalhães Research Center, Fiocruz, Recife, PE, Brazil. ^eBiological Sciences Institute, Pernambuco University (UPE), Recife, PE, Brazil. ^fBiochemistry Department, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil. ^gDepartment of Structural and Functional Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

Number of Tables: 3

Number of Figures: 2

World Count:

Corresponding author: Cristina P. Vicente, Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), São Paulo 13083863, Brazil. E-mail address: cvicente@unicamp.br

ABSTRACT

Objectives: Endothelial progenitor cells (EPCs) are involved in neovasculogenesis and maintenance of vascular homeostasis and their impairment may have a role in the pathogenesis of hypertension. This study aimed to establish whether the number of EPCs correlates with hypertensive state of premenopausal women and if this could be associated with the onset of metabolic syndrome.

Methods: A case-control study was conducted enrolling 30 women with essential hypertension, aged from 30 to 50 years (41 ± 6) and 15 healthy normotensive women. EPCs numbers were determined by flow cytometry in peripheral blood as the CD45⁺/CD34⁺/KDR⁺ positive cells. The women were classified as healthy normotensive controls and with essential hypertension; a) mild, SBP (systolic blood pressure) 140-159 mmHg and DBP (diastolic blood pressure) 90-99 mmHg and b) severe, SBP >180 mmHg and DBP > 110 mmHg (n=15).

Results: Women with severe hypertension displayed a significant reduction (88%) in circulating EPCs relative numbers when compared to the healthy controls. Also they were physically inactive, presented dyslipidemia, hyperglycemia and were overweighted; 67% of these women also presented metabolic syndrome.

Conclusions: The reduction of the EPCs may contribute to increased cardiovascular risk in this population. Development of severe hypertension and the parameters related to metabolic syndrome are directly correlated with a decrease of circulating EPC. Therefore, the EPCs counting may be considered a suitable biological marker to follow up the evolution of the hypertensive state in women and their cardiovascular risk.

Keywords: Endothelial progenitor cells, premenopausal women, Hypertension, metabolic syndrome

INTRODUCTION

The growth and remodeling of blood vessels in adult tissues has been initially explained as a result of the proliferative and migratory abilities of mature endothelial cells. However, Asahara et al. in 1997 [1], isolated and characterized a population of human circulating endothelial progenitor cells (EPCs), which expressed hematopoietic and endothelial cells surface antigens. This population could differentiate into mature endothelial cells, migrate from the bone marrow to the blood vessels and contribute with angiogenesis and vasculogenesis, as well as with the maintenance of the vascular bed integrity in adults [2-4].

The number and function of EPCs is regulated by angiogenic growth factors in response to vascular injury and also influenced by risk factors for cardiovascular diseases such as diabetes [5, 6], physical inactivity [7,8], obesity [9,10], hypertension [11] and metabolic syndrome [12-14]. Among those, hypertension appears as one of the main causes of the decreased migratory capacity of EPCs into the circulation [15]. Furthermore, hypertension reduces EPCs levels in the bone marrow causing accelerated cellular aging process [15,16]. EPCs can be defined by membrane surface markers as CD34⁺, an hematopoietic cell marker, Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 (VEGFR-2), also known as Kinase insert Domain Receptor (KDR) [1,17]. Mature EPCs can be defined by the expression of CD45⁻/CD34⁺/KDR⁺ [18-20].

Hypertension and EPCs relationship may be related to the hyperactivity of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System (RAAS). Angiotensin II decreases the number of EPCs and increases its senescence *in vitro* [16]. It stimulates NADPH oxidase production by endothelial, smooth muscle cells and by the vessel adventitia, generating reactive oxygen species [21]. Ultimately, it will promote the oxidative stress, which will lead to inflammation, endothelial dysfunction and the progression of atherogenesis and vascular disease [22]. Aldosterone also presents negative effects on EPCs, since it decreases the PI3K/AKT signaling, causing the decrease of nitric oxide (NO) and the vascular endothelial growth factor (VEGF) production [21].

It is believed that the presence of the subpopulations of EPCs in premenopausal women may partially explain the lower prevalence of hypertension and the risk for

cardiovascular complications [23]. Estrogen receptors (ERs) are expressed in endothelial cells and have an atheroprotective effect. Through the recruitment of ERs, estradiol increases the synthesis of endothelial NO and prostacyclin, thus slowing the formation of atheroma and decreasing the synthesis of pro-inflammatory cytokines, facilitating angiogenesis [24]. Similarly, estrogen activates potassium dependent calcium channels, inducing rapid increase of the NO releasing. Additionally, the estradiol has antioxidant and anti-inflammatory action by regulating the synthesis of prostacyclin and VEGF [25]. On the other hand, it inhibits endothelin-1, TNF α and apoptosis of endothelial cells [26].

Consequently, the antioxidant effects are considered one of the major mechanisms by which hormones protect women during their fertile life, a period of lower risk of CVD (cardiovascular risk) compared to men [27]. In fact, the oxidative stress is generally higher in men compared to the premenopausal women [28].

In this study, it was asked whether the number of EPCs in hypertensive women decreases compared with normotensive premenopausal healthy women and if this decrease may also be related to the onset of metabolic syndrome. It is considered that the EPCs counting is currently the best predictive factor for vascular alteration, more suitable than conventional risk factors such as lipid profile, hypertension and diabetes [23]. Thus, the assessment of the number of EPCs may reflect more accurately the degree of cardiovascular protection in the premenopausal hypertensive female population and correlate this with the degree of hypertensive illness.

METHODS

Participants and study design

The Local Ethics Committee approved this study and all the individuals signed a written informed consent. All the procedures utilized in this study are in agreement with the Declaration of Helsinki.

We realized a case control study with 30 hypertensive premenopausal volunteers women ages from 30-50 years (41 ± 6) in the Cardiological Ambulatory of the Cardiologic Emergency Hospital of Pernambuco (PROCAPE), Recife, Brazil, during 2012-2013, and pared the results with 15 normotense health women volunteers. Women were classified as hypertensive according to the Brazilian Society of Cardiology [29] and were divided into 2

groups: Mild hypertension (MH) with Systolic Blood Pressure (SBP) = 140-159 mmHg and Diastolic Blood Pressure (DBP) = 90-99 mmHg and Severe hypertension (SH): SBP \geq 180 mmHg and DBP \geq 110 mmHg. All enrolled women were questioned about to their smoking and exercising habits. Arterial Blood Pressure (ABP) was determined while resting. It was also determined cholesterol, triglycerides, HDL, LDL and glucose levels in blood plasma. Metabolic syndrome (MS) was determined according to the National Cholesterol Education Program Adult Panel (NCEP –ATPIII), International Diabetes Federation (IDF) and World Health Organization (WHO) [30], according to at least the presence of 3 criteria: hypertension in treatment or ABP \geq 130 x 85 mmHg, fasting glycemia \geq 100 mg/dL or diabetes mellitus type 2 (DM2) diagnosis, HDL $<$ 50 mg/dL, triglycerides levels \geq 150 mg/dL, abdominal waist $>$ 80 cm and BMI $>$ 30, indicating obesity. The exclusion criteria were (1) hypertension associated to pathological conditions like renal failure, gestational diabetes, endocrine diseases; (2) previous history of cardiac infarct, heart or brain-vascular disease. (3) Pregnancy, puerperium, breastfeeding, menstrual period, menopause or early menopause confirmed by blood tests [23].

Quantification of peripheral blood endothelial progenitor cells by flow cytometry

EPCs were defined as CD45⁻/CD34⁺/KDR⁺ cells [20,31-33]. Whole blood was collected into EDTA containing tubes and processed within 2 hours after collection. 100 μ l of total blood was separated and immuno-labeled using Anti-CD45-PerCP clone 2D1, Pharmingen (BD, San Jose, CA, EUA), Anti-CD45-PE-Cy5 clone 35-Z6, Santa Cruz Biotechnology (SC, CA, USA), Anti-CD34-FITC clone QBEnd-10, Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, EUA), Anti-KDR-Alexa Fluor 647-clone 89106, BD Pharmingen (BD, San Jose, CA, EUA). Blood was incubated for 40 minutes at in the dark, after the incubation, erythrocytes were lysed with 2mL of 1:10 diluted FACS lysing buffer (BD, San Jose, CA, EUA) and incubated again for 10 minutes. The remaining leukocytes were washed with 2mL 2% PBS/BSA (pH=7.4) and the tubes were centrifuged 500 g for 5 minutes and resuspended in 500 μ L of washing buffer. The acquisition was performed by a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) and analyzed using the Cell-Quest and Paint-a-Gate softwares (BD, Bioscences) as described previously [19].

Flow cytometry analysis

Initially, the background was removed by the analyses of isotype control antibodies. The debris was excluded on the FSC/SSC plot, the mononuclear population was selected and on the CD45/SSC plot, the low CD45 positive cells were selected. For EPCs analysis a gate was drawn in the CD45^{dim} and the EPCs were gated as CD34/KDR positive cells. EPCs were defined as positive events to CD34/KDR and negative to CD45. Fifty thousands events were analyzed in each sample, and each sample was analyzed in duplicate.

Statistical analysis

Data are presented as means \pm SEM, or as medians and ranges. Barlett tests were applied to compare categorical variables, and Anova/Tukey test was used to compare the groups. Student t test was used when observed homogeneity and when not we used Kruskal-Mc after Kruskal-Wallis tests were performed to multiple analyses. Analyses were performed using the Rv 2.25.0 software and $p < 0.05$ values were considered statistically significant.

RESULTS

Characteristics of the study population and of metabolic syndrome

Clinical characteristics and cardiovascular risk factors (triglycerides, glucose, HDL and LDL levels and BMI) of the study population were described in table 1. We observed significant increase ($p < 0,0001$) in the BP levels, confirming the severity of hypertension according to the study methodological proposal. The control group presented triglycerides 105 ± 10 mg/dL, HDL cholesterol 56 ± 8 mg/dL, LDL cholesterol 121 ± 18 mg/dL, glucose 87 ± 7 mg/dL and BMI of 26 ± 3 mg/dL. The MH group presented significant increase in the levels of triglycerides 138 ± 19 mg/dL ($p < 0,0001$), glucose 95 ± 7 mg/dL ($p < 0,01$) and BMI of 31 ± 4 ($p < 0,001$) indicating obesity. The SH group, also presented high levels of LDL cholesterol 143 ± 15 mg/dL ($p < 0,01$), triglycerides 153 ± 40 mg/dL ($p < 0,0001$), HDL cholesterol 48 ± 6 mg/dL ($p < 0,01$), and glucose 121 ± 39 mg/dL; ($p < 0,01$), when compared to controls. In the HS group we also diagnosed diabetes type II in 26,7% of the patients and they were overweighted with $BMI = 29 \pm 3$, with a significant difference when compared to

controls ($p < 0,05$). We also observed high levels of sedentary hypertensive women ($>70\%$). Our initial results indicated the prevalence of metabolic syndrome in the HS group.

In table 2 we analyzed the parameters related to the metabolic syndrome characterization and we observe that 67% of the women in the SH group presented MS. In these group 69% of the women presented decreased levels of HDL, 61% high triglycerides levels, 67% high glucose levels, 54% were overweighted and 38% obese.

Characterization of circulating EPCs by flow cytometry

The most common markers for EPCs are CD34, CD133 and VEGFR2 [32]. We used CD 34 and VEGFR2 as the main markers in our research. Also we considered that our population of interest is included in the group of the CD45⁻ cells.

In table 3 we observed an increase of 50% in the CD45⁺ cells number when we compared the SH to the MH group with $p < 0,0026$. This increase may be related to the inflammatory profile of these patients, mainly in regards to the presence of high blood pressure and metabolic syndrome. The presence of CD45⁻/CD34⁺ and CD45⁻/CD34⁺/KDR⁺ cells was described in figure 1 and table 4.

The number of CD45⁻/CD34⁺/KDR⁺ cells decreases in patients as the severity of hypertension increases. First we analyzed the number of CD34 positive cells and we could observe a significant decrease ($p < 0,05$) of 61% in the number of CD34 positive cells in the SH when compared to CT group. Also when we compared the MH with the SH group there was a decrease of 52% in the CD34⁺ cells in the SH group ($p < 0,05$). Regarding CD45⁻/CD34⁺/KDR⁺ it was observed a significant reduction in these cells number, 74% in the MH group ($p < 0,05$) and 88% in the SH ($p < 0,01$) when compared to control.

Discussion and conclusion

Previous work demonstrated that the reduction of the EPCs numbers could be an independent predictor of morbidity and mortality in cardiovascular diseases (CVD) [34]. Aterogenic dislipidemia, diabetes and hypertension are inflammatory conditions associated with endothelial dysfunction. Also, several researches demonstrated a reduction on the EPCs numbers in chronically inflammatory conditions that may be related to diabetes and atherosclerosis and also in individuals presenting cardiovascular risk factors [13,15,35].

Hypertension is an inflammatory process and is related to RAAS, oxidative stress, and liberation of inflammatory mediators, growth factors and cytokines produced by the endothelium [36].

Metabolic syndrome (MS), also known as insulin resistance syndrome is characterized by the presence of a group of cardiovascular risk factors like hypertension; insulin resistance, presence of high levels of insulin, glucose intolerance/diabetes type 2, obesity - mainly abdominal with extra-abdominal deposits of fat and atherogenic dyslipidemia (high levels of LDL- cholesterol, high levels of triglycerides and low levels of HDL cholesterol) [30].

It has been reported that the cardiovascular risk factors of the MS were correlated with reduction of the EPCs numbers and that these individuals present endothelial dysfunction [12-14,30].

The main focus of this work was to investigate alteration in the EPCs numbers in hypertensive pre-menopausal women, but concomitantly, we could also observe that 67% of the women in the severe hypertensive group also presented characteristics that can indicate the presence of metabolic syndrome. Nakazone *et al.* [37] analyzed 340 Brazilians distributed in two groups (200 cardiac patients x 140 controls) and also observed that 55% of the patients against 8,6% of the control group ($p < 0,0001$) presented MS according to NCEP-ATPIII.

The presence of MS in the SH group is a very important factor demonstrating a synergy between the MS components with increased risk in the development of CVD. MS confers an increase of 2 to 4 times to higher risk in the development of CVD and 5 times to diabetes type 2 [14]. It also has been demonstrated that the endothelial dysfunction and the decrease in the microvasculature that is characteristic of hypertension may be associated with the development CVD, and that an unbalance in the vascular repair process promotes CVD progression. A possible mechanism involved in this process may be related with the number and reactivity of circulating EPCs [34]. Also it is believed that EPC dysfunction may be related with the establishment of hypertension [11].

Vasa *et al.* [15] observed that hypertensive patients presented reduced EPCs numbers in circulation and that it may be related to a decreased ability of EPCs to migrate from bone marrow to the circulation. Imanishi *et al.* [38] described that hypertension also

decreases the numbers of EPCs in bone marrow accelerating the process of cellular aging. Also the use of anti-hypertensive drugs increased the mobilization of EPCs from bone marrow and the recovery of injured endothelium, resulting in a decrease in neointimal formation and an improvement of the vascular integrity [39].

This study we showed an increase of 17% ($p < 0.05$) in the number of CD45 positive cells, when SH was compared to the control group and 50% between MH and SH groups ($p < 0.01$), this marker is characteristic of leukocytes and this increase may indicate an inflammatory profile in the SH group [33].

There are several different proteins that can be considered as EPCs markers. The expression of CD34⁺/KDR⁺ was chosen in this work as main EPCs markers because around 80% of the circulating EPCs present these markers and several researchers agreed that these are common markers of endothelial precursors [2, 13, 40].

Werner *et al.* [34] analyzed cardiovascular events and death promoted by CVD during 12 months in 519 patients with CVD and observed that an increase in the number and functionality of EPCs (CD34⁺/KDR⁺) can be related with a decrease in the death related with cardiovascular risk, hospitalization and occurrence of the first cardiovascular event of great proportion.

Peripheral blood CD34 positive cells can be considered a sub-population of EPCs and the number of these cells is directly related to the cardiovascular risk [41]. We analyzed the CD45⁺/CD34⁺ and observed a significant reduction of 61% ($p < 0,05$) in the SH group when compare to control, confirming the negative effect of hypertension in severe hypertensive women.

CD45⁺/CD34⁺/KDR⁺ cells presented a reduction of 74% ($p < 0,05$) in the MH group and of 88% in the SH group when they were compared to control women ($p < 0,01$). Vasa *et al.* [15] observed that the number of CD34⁺/KDR⁺ circulating cells analyzed by flow cytometry was reduced by 48% in patients with CVD when compared to health individuals.

Our results confirm that hypertension is an important cause of the decrease in the number of EPCs, and that is probably related to the inhibition of these cells migration from bone marrow to the peripheral blood. Also we observed that the number of EPCs is directly related to stage of hypertension (mild or severe) and that, in general, the appearance of severe hypertension is correlated to the appearance of MS, a condition observed in 67% of

the patients. Additionally, the inflammatory process promoted by MS might be related to this decrease. This results may explain in part the increased cardiovascular risk correlated to severe hypertension in association with MS presented by SH group analyzed in this work and that this can be considered a new biological marker of CV risks in pre-menopausal women with different stages of hypertension.

Acknowledgments

Fapesp 2012/23640-2 to C.P.V. supported this work, and T.M.R.G received a DINTER-CAPES grant (Doutorado Inter-institucional - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). Authorship: T.M.R.G performed the blood collection, preparation and FACS analysis and wrote the paper. M.C.A.B.C. and V.R.A.P. helped in the FACS analysis, G.T.N.D. helped with statistical analysis; P.M helped with the blood collection and flow cytometry and [C.P.V. was responsible for the overall project](#) and helped writing and revising the paper. We thank the liver institute of HUOC and the Research Center Aggeu Magalhães of Pernambuco, Brazil where the blood collection and analysis were realized.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

REFERENCES

1. T. Asahara, T. Murohara, A. Sullivan, M. Silver, R. van der Zee, T. Li, B. Witzgenbichler, G. Schatteman, J.M. Isner, Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis, *Science* 275 (1997) 964-967.
2. M. Hristov, W. Erl, P.C. Weber, Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23 (2003) 1185-1189.
3. Y. Iwami, H. Masuda, T. Asahara, Endothelial progenitor cells: past, state of the art, and future, *J Cell Mol Med* 8 (2004) 488-497.
4. S. Murasawa, T. Asahara, Endothelial progenitor cells for vasculogenesis, *Physiology (Bethesda)* 20 (2005) 36-42.
5. G.P. Fadini, M. Miorin, M. Facco, S. Bonamico, I. Baesso, F. Grego, M. Menegolo, S.V. de Kreutzenberg, A. Tiengo, C. Agostini, A. Avogaro, Circulating endothelial progenitor cells are reduced in peripheral vascular complications of type 2 diabetes mellitus, *J Am Coll Cardiol* 45 (2005) 1449-1457.
6. G.P. Fadini, L. Pucci, R. Vanacore, I. Baesso, G. Penno, A. Balbarini, R. Di Stefano, R. Miccoli, S. de Kreutzenberg, A. Coracina, A. Tiengo, C. Agostini, S. Del Prato, A.

- Avogaro, Glucose tolerance is negatively associated with circulating progenitor cell levels, *Diabetologia* 50 (2007) 2156-2163.
7. M.F. Lippincott, A. Desai, G. Zalos, A. Carlow, J. De Jesus, A. Blum, K. Smith, M. Rodrigo, S. Patibandla, H. Chaudhry, A.P. Glaser, W.H. Schenke, G. Csako, M.A. Waclawiw, R.O. Cannon, 3rd, Predictors of endothelial function in employees with sedentary occupations in a worksite exercise program, *Am J Cardiol* 102 (2008) 820-824.
 8. E.M. Van Craenenbroeck, V.Y. Hoymans, P.J. Beckers, N.M. Possemiers, K. Wuyts, B.P. Paelinck, C.J. Vrints, V.M. Conraads, Exercise training improves function of circulating angiogenic cells in patients with chronic heart failure, *Basic Res Cardiol* 105 (2010) 665-676.
 9. O.J. MacEaney, E.J. Kushner, G.P. Van Guilder, J.J. Greiner, B.L. Stauffer, C.A. DeSouza, Endothelial progenitor cell number and colony-forming capacity in overweight and obese adults, *Int J Obes (Lond)* 33 (2009) 219-225.
 10. F. Cesari, F. Sofi, A.M. Gori, I. Corsani, A. Capalbo, R. Caporale, R. Abbate, G.F. Gensini, A. Casini. Physical activity and circulating endothelial progenitor cells: an intervention study, *Eur J Clin Invest* 42 (2012) 927-932.
 11. A.J. van Zonneveld, T.J. Rabelink, Endothelial progenitor cells: biology and therapeutic potential in hypertension, *Curr Opin Nephrol Hypertens* 15 (2006) 167-172.
 12. T. Suzuki, K. Hirata, M.S. Elkind, Z. Jin, T. Rundek, Y. Miyake, B. Boden-Albala, M.R. Di Tullio, R. Sacco, S. Homma, Metabolic syndrome, endothelial dysfunction, and risk of cardiovascular events: the Northern Manhattan Study (NOMAS), *Am Heart J* 156 (2008) 405-410.
 13. G.P. Fadini, C. Agostini, E. Boscaro, A. Avogaro, Mechanisms and significance of progenitor cell reduction in the metabolic syndrome, *Metab Syndr Relat Disord* 7 (2009) 5-10.
 14. I. Jialal, S. Devaraj, U. Singh, B.A. Huet, Decreased number and impaired functionality of endothelial progenitor cells in subjects with metabolic syndrome: implications for increased cardiovascular risk, *Atherosclerosis* 211 (2010) 297-302.
 15. M. Vasa, S. Fichtlscherer, A. Aicher, K. Adler, C. Urbich, H. Martin, A.M. Zeiher, S. Dimmeler, Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease, *Circ Res* 89 (2001) E1-7.
 16. T. Imanishi, T. Hano, I. Nishio, Angiotensin II accelerates endothelial progenitor cell senescence through induction of oxidative stress, *J Hypertens* 23 (2005) 97-104.
 17. C. Urbich, S. Dimmeler, Endothelial progenitor cells functional characterization, *Trends Cardiovasc Med* 14 (2004) 318-322.
 18. J. Case, L.E. Mead, W.K. Bessler, D. Prater, H.A. White, M.R. Saadatzaheh, J.R.

- Bhavsar, M.C. Yoder, L.S. Haneline, D.A. Ingram, Human CD34+AC133+VEGFR-2+ cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors, *Exp Hematol* 35 (2007) 1109-1118.
19. B.K. Masouleh, A. Baraniskin, W. Schmiegel, R. Schroers, Quantification of circulating endothelial progenitor cells in human peripheral blood: establishing a reliable flow cytometry protocol, *J Immunol Methods* 357 (2010) 38-42.
 20. E. Shantsila, B.J. Wrigley, A. Shantsila, L.D. Tapp, P.S. Gill, G.Y. Lip, Monocyte-derived and CD34+/KDR+ endothelial progenitor cells in heart failure, *J Thromb Haemost* 10 (2012) 1252-1261.
 21. T. Marumo, H. Uchimura, M. Hayashi, K. Hishikawa, T. Fujita, Aldosterone impairs bone marrow-derived progenitor cell formation, *Hypertension* 48 (2006) 490-496.
 22. M. Burnier, H.R. Brunner, Angiotensin II receptor antagonists, *Lancet* 355 (2000) 637-645.
 23. C. Vassalle, T. Simoncini, P. Chedraui, F.R. Perez-Lopez, Why sex matters: the biological mechanisms of cardiovascular disease, *Gynecol Endocrinol* 28 (2012) 746-751.
 24. J. Favre, J. Gao, J.P. Henry, I. Remy-Jouet, I. Fourquaux, A. Billon-Gales, C. Thuillez, J.F. Arnal, F. Lenfant, V. Richard, Endothelial estrogen receptor {alpha} plays an essential role in the coronary and myocardial protective effects of estradiol in ischemia/reperfusion, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30 (2010) 2562-2567.
 25. M.A. Sader, D.S. Celermajer, Endothelial function, vascular reactivity and gender differences in the cardiovascular system, *Cardiovasc Res* 53 (2002) 597-604.
 26. T. Simoncini, S. Garibaldi, X.D. Fu, S. Pisaneschi, S. Begliuomini, C. Baldacci, E. Lenzi, L. Goglia, M.S. Giretti, A.R. Genazzani, Effects of phytoestrogens derived from red clover on atherogenic adhesion molecules in human endothelial cells, *Menopause* 15 (2008) 542-550.
 27. A.A. Miller, T.M. De Silva, K.A. Jackman, C.G. Sobey, Effect of gender and sex hormones on vascular oxidative stress, *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34 (2007) 1037-1043.
 28. T. Ide, H. Tsutsui, N. Ohashi, S. Hayashidani, N. Suematsu, M. Tsuchihashi, H. Tamai, A. Takeshita, Greater oxidative stress in healthy young men compared with premenopausal women, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22 (2002) 438-442.
 29. S.B.d.C.S.B.d.H.S.B.d.d. Nefrologia, Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia 2010.
 30. R.H. Eckel, S.M. Grundy, P.Z. Zimmet, The metabolic syndrome, *Lancet* 365 (2005) 1415-1428.
 31. C. Bakogiannis, D. Tousoulis, E. Androulakis, A. Briasoulis, N. Papageorgiou, G.

- Vogiatzi, A.M. Kampoli, M. Charakida, G. Siasos, G. Latsios, C. Antoniadis, C. Stefanadis, Circulating endothelial progenitor cells as biomarkers for prediction of cardiovascular outcomes, *Curr Med Chem* 19 (2012) 2597-2604.
32. G.P. Fadini, D. Losordo, S. Dimmeler, Critical reevaluation of endothelial progenitor cell phenotypes for therapeutic and diagnostic use, *Circ Res* 110 (2012) 624-637.
 33. C. Schmidt-Lucke, S. Fichtlscherer, A. Aicher, C. Tschöpe, H.P. Schultheiss, A.M. Zeiher, S. Dimmeler, Quantification of circulating endothelial progenitor cells using the modified ISHAGE protocol, *PLoS One* 5 (2010) e13790.
 34. N. Werner, S. Kosiol, T. Schiegl, P. Ahlers, K. Walenta, A. Link, M. Böhm, G. Nickenig, Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes, *N Engl J Med* 353 (2005) 999-1007.
 35. J.M. Hill, G. Zalos, J.P. Halcox, W.H. Schenke, M.A. Waclawiw, A.A. Quyyumi, T. Finkel, Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk, *N Engl J Med* 348 (2003) 593-600.
 36. T.H. Lan, X.Q. Huang, H.M. Tan, Vascular fibrosis in atherosclerosis, *Cardiovasc Pathol* 22 (2013) 401-407.
 37. M.A. Nakazone, A. Pinheiro, M.C. Braile, M.A. Pinhel, G.F. de Sousa, S. Pinheiro, Jr., A.C. Brandao, J.C. Toledo, D.M. Braile, D.R. Souza, [Prevalence of metabolic syndrome using NCEP-ATPIII and IDF definitions in Brazilian individuals], *Rev Assoc Med Bras* 53 (2007) 407-413.
 38. T. Imanishi, C. Moriwaki, T. Hano, I. Nishio, Endothelial progenitor cell senescence is accelerated in both experimental hypertensive rats and patients with essential hypertension, *J Hypertens* 23 (2005) 1831-1837.
 39. D.H. Walter, A.M. Zeiher, S. Dimmeler, Effects of statins on endothelium and their contribution to neovascularization by mobilization of endothelial progenitor cells, *Coron Artery Dis* 15 (2004) 235-242.
 40. C. Schmidt-Lucke, L. Rossig, S. Fichtlscherer, M. Vasa, M. Britten, U. Kamper, S. Dimmeler, A.M. Zeiher, Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair, *Circulation* 111 (2005) 2981-2987.
 41. G.P. Fadini, S. de Kreutzenberg, C. Agostini, E. Boscaro, A. Tiengo, S. Dimmeler, A. Avogaro, Low CD34+ cell count and metabolic syndrome synergistically increase the risk of adverse outcomes, *Atherosclerosis* 207 (2009) 213-219.

FIGURES

Number of circulating EPCs in normotensive and hypertensive women.

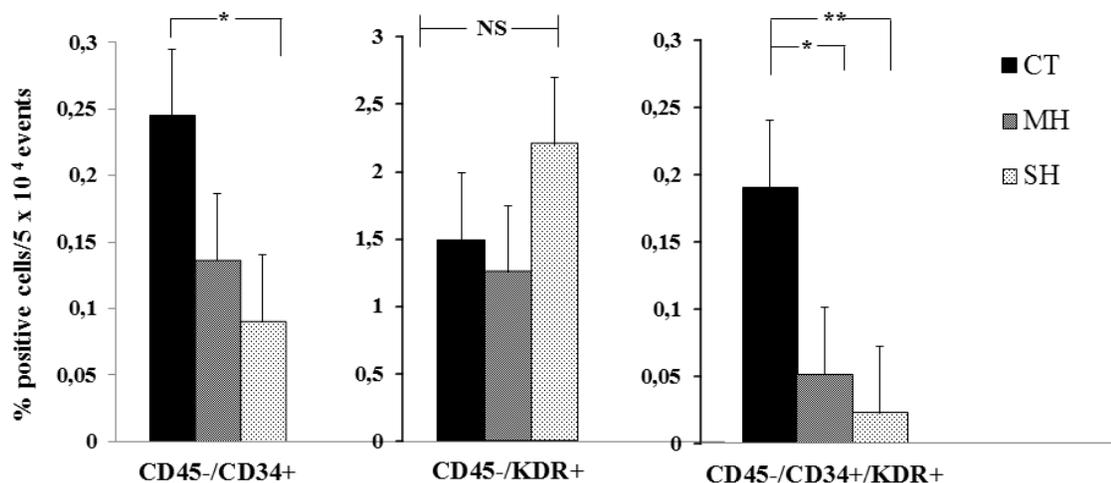


Figure 1: Analysis of the number of circulating EPCs in normotensive and hypertensive women. We analyzed 3 groups: Control (CT), normotensive women, Mild Hypertension (MH) SBP 140-159 mmHg and DBP 90-99 mmHg; Severe Hypertension (SH) SBP ≥ 180 mmHg and DBP ≥ 110 mmHg. Values are reported as mean \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Analyzed by t student test.

Flow cytometry gates for the analysis of circulating EPCs.

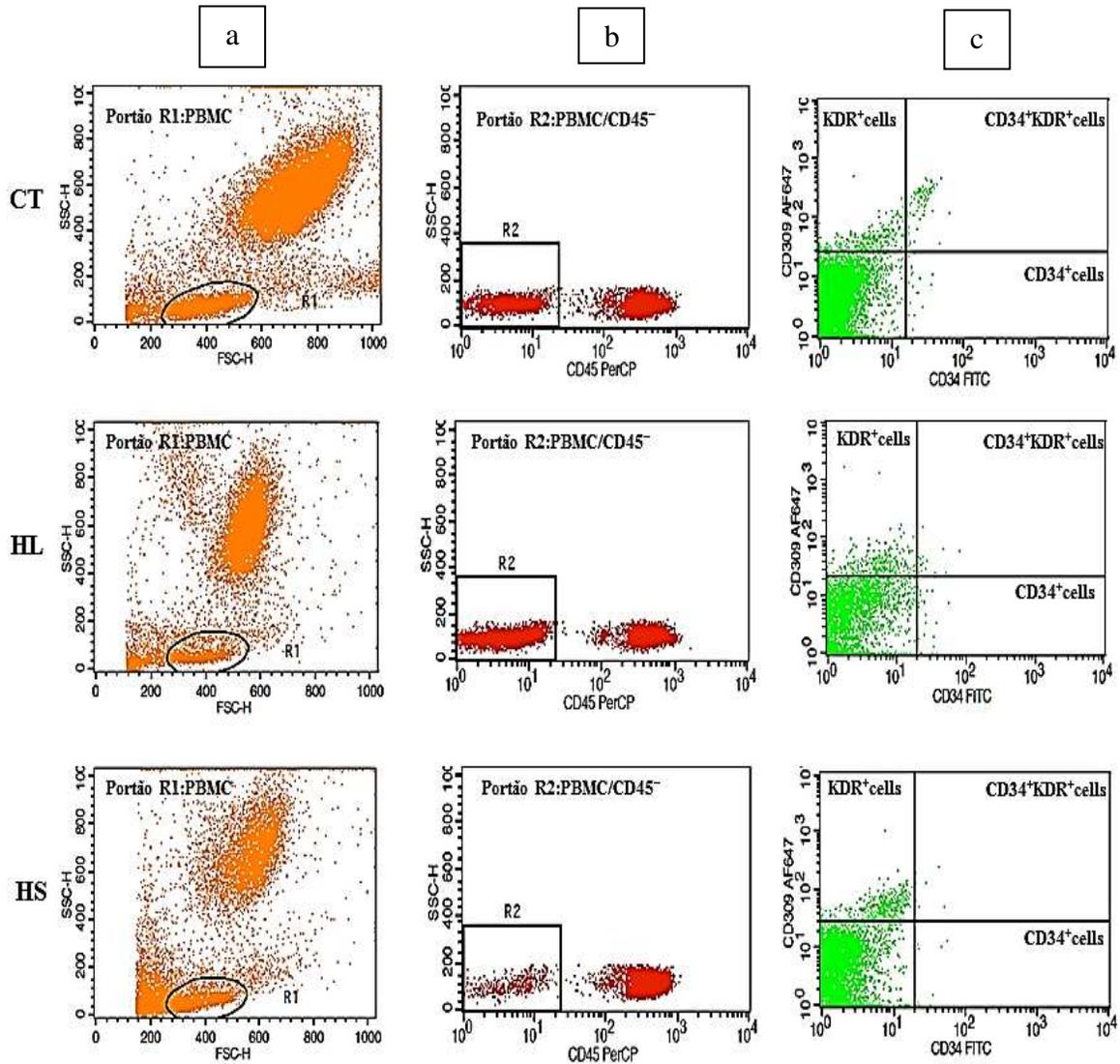


Figure 2: Flow cytometry gates for the analysis of circulating EPCs. Control (CT), normotensive women, Mild Hypertension (MH) SBP 140-159 mmHg and DBP 90-99 mmHg; Severe Hypertension (SH) SBP ≥ 180 mmHg and DBP ≥ 110 mmHg. a) SSC x FCS, circle indicates the mononuclear cells. b) CD45 x SSC, squares indicates de CD45 dim gate, where the major population of EPCs were expected. c) KDR x CD34 gate showing the CD34, KDR and CD34/KDR positive cells, where the main population of EPCs is localized.

TABLES

Table 1: Physiological parameters in normotensive and hypertensive women.

Parameters	CT	MH	SH	Comparison	p-value
SBP (mmHg)	113±15	133 ± 12	159 ± 27	CT vs. MH	<0,0001 ^K
				CT vs. SH	
				MH vs. SH	
DBP (mmHg)	73 ±8	86 ± 8	98±19	CT vs. MH	<0,0001 ^K
				CT vs. SH	
				MH vs. SH	
Glucose (mg/dL)	87±7	95±7	121±39	CT vs. MH	0,0014 ^K
				CT vs. SH	0,0014 ^K
				MH vs. SH	0,0080 ^T
HDL cholesterol (mg/dL)	56±8	52±7	48±6	CT vs. MH	0,0995 ^T
				CT vs. SH	0,0028 ^T
				MH vs. SH	0,0688 ^T
LDL cholesterol (mg/dL)	121±18	130±8	143±15	CT vs. MH	0,0654 ^T
				CT vs. SH	0,0049 ^A
				MH vs. SH	0,0071 ^T
Triglycerides (mg/dL)	105±10	138±19	153±40	CT vs. MH	0,0001 ^K
				CT vs. SH	0,0001 ^K
				MH vs. SH	0,1208 ^T
BMI (Kg/m ²)	26±3	31±4	29±3	CT vs. MH	0,0006 ^T
				CT vs. SH	0,0138 ^T
				MH vs. SH	0,0684 ^T

CT: Control; MH: Mild Hypertension; SH: Severe Hypertension. SBP: Systolic Blood pressure; DBP: Diastolic Blood pressure; LDL: low density lipoproteins; HDL: High density lipoproteins; BMC: Body mass index; Values are reported as mean ± SD. ^AAnova/Tukey, ^KKruskal Wallis/Kruskalmc, ^T Student t.

Table 2: Biochemical parameters and metabolic syndrome diagnosis.

Parameters	CT (n=11-15)	MH (n=10-15)	SH (n=13-15)
HDL (mg/dL)			
< 50	2 (18%)	4 (40%)	9 (69%)
50-60	9 (82%)	6 (60%)	4 (31%)
LDL(mg/dL)			
<130	5 (46%)	4 (40%)	1 (8%)
130-160	6 (54%)	6 (60%)	11(84%)
>160	0	0	1(8%)
Triglycerides (mg/dL)			
< 150	11(100%)	9 (90%)	5 (39%)
150-199	0	1 (10%)	8 (61%)
Glucose (mg/dL)			
< 100	15 (100%)	13 (87%)	5 (33%)
≥ 100	0	2 (13%)	10 (67%)
BMI (kg/m²)			
18,5 – 24,9	8 (53%)	0	1 (8%)
25,0 – 29,9	4 (27%)	6 (43%)	7 (54%)
≥ 30	3 (20%)	8 (57%)	5 (38%)
Metabolic Syndrome			
Yes	1(7%)	5(33%)	10(67%)
No	14(93%)	10(67%)	5(33%)

Table 3: Variation on the number of circulating cells presenting CD45 positive or negative in normal and hypertensive women.

%Cells/5 x 10⁴events	Mean	SD	SEM	Comparison	p-value
CD45 positive					
CT	68	20	5	CT vs. MH	0,0493 ^T
MH	53	30	8	CT vs. SH	0,0460 ^T
SH	80	16	4	MH vs. SH	0,0026 ^T
CD45 negative					
CT	32	20	5	CT vs. MH	0,0532 ^T
MH	46	30	8	CT vs. SH	0,0447 ^T
SH	20	16	4	MH vs. SH	0,0028 ^T

CT: Control; MH: Mild Hypertension; SH: Severe Hypertension. Values are reported as mean \pm SEM and were analyzed using ^T t Student test.

Table 4: Percentage of CD45⁺/CD34⁺ and EPCs (CD45⁺/CD34⁺/KDR⁺) in peripheral blood of normotensive and hypertensive women.

<i>%Cells/5 x 10⁴events</i>	Mean	SD	SEM	<i>Comparison</i>	p-value
CD45⁺/CD34⁺					
CT	0,24	0,27	0,07	CT vs. MH	0,0919 ^T
MH	0,13	0,15	0,04	CT vs. SH	0,0203 ^T
SH	0,09	0,07	0,02	MH vs. SH	0,1415 ^T
CD45⁺/CD34⁺/KDR⁺					
CT	0,19	0,26	0,07	CT vs. MH	0,0284 ^T
MH	0,05	0,09	0,02	CT vs. SH	0,0087 ^T
SH	0,02	0,02	0,01	MH vs. SH	0,125 ^T

CT: control (n=15); MH: Mild hypertension (n=15); SH: Severe Hypertension (n=15).

Values are reported as mean ± SEM and were analyzed using ^T t Student test.

ANEXOS

ANEXO A-PARECER CEP FCM-UNICAMP

FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PERFIL DE EXPRESSÃO DAS CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIAIS CD34/CD133/KDR NO SANGUE PERIFÉRICO DE MULHERES HIPERTENSAS NA PRÉ-MENOPAUSA, EM COMPARAÇÃO COM MULHERES SAUDÁVEIS OU LÍMITROFES PARA HIPERTENSÃO.

Pesquisador: Tânia Maria Rocha Guimarães

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 01582212.4.0000.5192

Instituição Proponente: FACULDADE DE ENFERMAGEM NOSSA SENHORA DAS GRACAS ((FENSG))

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 187.777

Data da Relatoria: 22/01/2013

Apresentação do Projeto:

O projeto está escrito adequadamente, sendo bastante claros a sua motivação, a metodologia e seus objetivos. Ele apresenta uma proposta de avaliação do perfil das células progenitoras endoteliais (CPE) CD34/CD133/KDR no sangue periférico de mulheres hipertensas na pré-menopausa, quando comparadas às mulheres saudáveis ou limítrofes para hipertensão. As CPE são células-tronco capazes de se diferenciarem em células endoteliais maduras que originam novos vasos sanguíneos. Segundo a literatura, o número e as características das CPE presentes no sangue podem trazer informações referentes à probabilidade de ocorrência de doenças cardiovasculares e a ocorrência de reparos vasculares na ocorrência destas patologias. Quanto menor o número de CPE, maior a probabilidade de morbidade e mortalidade por doenças cardiovasculares em função da redução na chance de ocorrência de reparos celulares vasculares. As CPE para o estudo serão obtidas a partir do processamento de amostras sanguíneas das pacientes, sendo posteriormente analisadas via citometria de fluxo. A pesquisa será realizada no PROCAPE, hospital especializado em cardiologia vinculado à Universidade Federal de Pernambuco.

Objetivo da Pesquisa:

Identificar e analisar o perfil de expressão das Células Progenitoras Endoteliais CD34/CD133/KDR no sangue periférico de mulheres hipertensas na pré-menopausa em comparação com mulheres saudáveis ou limítrofes para hipertensão. Caracterizar o grupo de mulheres hipertensas na pré-

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

menopausa quanto aos fatores de risco para as doenças cardiovasculares: níveis de pressão arterial, níveis sanguíneos de colesterol, Lipoproteínas plasmáticas de Alta Densidade (HDL-High Density Lipoprotein), Lipoproteínas plasmáticas de Baixa Densidade (LDL-Low Density Lipoprotein); diabetes mellitus, hábitos de fumo e de práticas regulares de exercício físico.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos às pacientes participantes do projeto são aqueles relacionados à coleta de sangue para análise clínica laboratorial, sendo descritas no projeto medidas de segurança adequada para a realização do procedimento. Como benefícios, será obtida uma contribuição científica no que se refere ao papel das CPE na ocorrência e evolução de doenças cardiovasculares.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa de interesse para avaliação do papel das CPE na ocorrência de doenças cardiovasculares e resposta do organismo as mesmas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória foram entregues de acordo com as normas vigentes. O termo de consentimento está bastante claro e contém todas as informações necessárias.

Recomendações:

Nenhuma recomendação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências. Aprovado em plenária.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

CAMPINAS, 22 de Janeiro de 2013

Assinador por:
Carlos Eduardo Steiner
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

ANEXO B-PARECER CEP HUOC/PROCAPE

COMPLEXO HOSPITALAR
HUOC/PROCAPE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PERFIL DE EXPRESSÃO DAS CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIAIS CD34/CD133/KDR NO SANGUE PERIFÉRICO DE MULHERES HIPERTENSAS NA PRÉ-MENOPAUSA, EM COMPARAÇÃO COM MULHERES SAUDÁVEIS OU LÍMITROFES PARA HIPERTENSÃO.

Pesquisador: Tânia Maria Rocha Guimarães

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 01582212.4.0000.5192

Instituição Proponente: FACULDADE DE ENFERMAGEM NOSSA SENHORA DAS GRACAS ((FENSG))

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Outros

Detalhe: Parecer Instituição Co-participante

Justificativa: Envio parecer do CEP da UNICAMP aprovando integralmente a pesquisa. Solicito

Data do Envio: 31/01/2013

Situação da Notificação: Aguardando revisão do parecer do colegiado

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 213.470

Data da Relatoria: 06/02/2013

Apresentação da Notificação:

bem apresentado, tema relevante que aborda Estudo tipo caso-controle prospectivo realizado em mulheres hipertensas em pré-menopausa acompanhadas no Ambulatório de Cardiologia do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE), que terão amostras sanguíneas analisadas para marcadores biológicos de Células Progenitoras Endoteliais, pareadas com um grupo controle de mulheres saudáveis ou limitrofes para hipertensão (pressão sistólica 130-139 mmHg/pressão diastólica 85-89mmHg). As mulheres hipertensas serão divididas em 3 grupos de acordo com a classificação do grau de hipertensão: Estágio 1 (PS=140-159mmHg/PD=90-99mmHg); Estágio 2 (PS= 160-179mmHg/PD= 100-109mmHg); Estágio 3 (PS 180mmHg/PD 110mmHg). Quando as pressões sistólica e diastólica se situarem em categorias

Endereço: Rua Arnóbio Marques, 310

Bairro: Santo Amaro

CEP: 50.100-130

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)3184-1271

Fax: (81)3184-1271

E-mail: cep_huoc.procaprocape@yahoo.com.br

diferentes a maior será utilizada para classificação. Os grupos serão selecionados de acordo com os critérios de inclusão/exclusão estabelecidos. As mulheres serão entrevistadas quanto aos hábitos de fumo e prática de exercícios físicos, sendo verificados os níveis de pressão arterial. Será coletado dos prontuários o resultado mais recente de exames sanguíneos de colesterol, HDL, LDL e glicemia.

Objetivo da Notificação:

Identificar e analisar o perfil de expressão das Células Progenitoras Endoteliais CD34/CD133/KDR no sangue periférico de mulheres hipertensas na pré-menopausa em comparação com mulheres saudáveis ou limitrofes para hipertensão.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Risco mínimo referente ao procedimento de coleta de amostra sanguínea; Benefícios:

O projeto apresenta relevância no estudo da imunologia das doenças cardiovasculares sendo importante para ampliar o conhecimento da atividade da célula progenitora endotelial, gerando parâmetros para um potencial diagnóstico precoce das doenças cardiovasculares em mulheres na prémenopausa.

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

aprovado, inclusive com parecer da Instituição promotora UNICAMP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória foram entregues de acordo. O termo de consentimento está claro incluindo informações necessárias.

Recomendações:

aprovado

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

aprovado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

aprovado

Endereço: Rua Antônio Marques, 310

Bairro: Santo Amaro

CEP: 50.100-130

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)3184-1271

Fax: (81)3184-1271

E-mail: cep_huoc.procap@yaho.com.br

ANEXO C-CARTA DE ANUÊNCIA PROCAPE



CARTA DE ANUÊNCIA

Recife, 09 de agosto de 2012

Ao

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

CEP-HUOC/PROCAPE

Concordamos em receber no Ambulatório de Cardiologia do PROCAPE a Profª Tânia Maria Rocha Guimarães - FENSG/UPE, Matrícula nº 107506 - para realizar a pesquisa de título: **“PERFIL DE EXPRESSÃO DAS CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIAIS CD34/CD133/KDR NO SANGUE PERIFÉRICO DE MULHERES HIPERTENSAS NA PRÉ-MENOPAUSA EM COMPARAÇÃO COM MULHERES SAUDÁVEIS OU LIMÍTROFES PARA HIPERTENSÃO”** no período de agosto a dezembro de 2012, a ser realizada sob orientação da professora Dra. Patrícia M.M. Freire de Moura, como requisito para conclusão de Doutorado em Biologia Celular e Estrutural UNICAMP/UPE-DINTER-NF.

Dr. Sérgio Tavares Montenegro
Diretor
Pronto Socorro Cardiológico
Universidade de PE - PROCAPE

Dr. Sérgio Tavares Montenegro

Diretor

Rua dos Palmares s/n - Santo Amaro - CEP: 50100-060- Recife-PE
Fone: 3181.7100

ANEXO D-DEFERIMENTO DO CEP-FCM-UNICAMP

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha Tese de Doutorado intitulada "Perfil de expressão das células progenitoras endoteliais circulantes CD45-CD34+/KDR+ em mulheres hipertensas na pré-menopausa, em comparação com mulheres saudáveis normotensas":

() não se enquadra no § 4º do Artigo 1º da Informação CCPG 002/13, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

() CIBio - Comissão Interna de Biossegurança , projeto no. _____, Instituição: _____

() CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto no. _____, Instituição: _____

(X) CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo nº 187.777, Instituição: Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (FCM/UNICAMP).

**Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*

Tânia Maria Rocha Guimarães
Aluna: Tânia Maria Rocha Guimarães

Cristina Pontes Vicente
Orientadora: Profa. Dra. Cristina Pontes Vicente

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

Profa. Dra. Pátima Ap. Böhmer Leit
Coordenadora do
Comitê de Ética em Pesquisa
FCM/UNICAMP
Matrícula: 06920-5

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura