RAQUEL DELGADO SARAFIAN

Estabelecimento de um modelo *in vitro* para o estudo do papel das NADPH-oxidases na hipertensão

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnólogicas para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2019

RAQUEL DELGADO SARAFIAN

Estabelecimento de um modelo *in vitro* para o estudo do papel das NADPH-oxidases na hipertensão

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnólogicas para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador(a): Profa. Dra. Lygia da Veiga Pereira Carramaschi

Versão corrigida. A versão corrigida eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2019

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Delgado Sarafian, Raquel
Estabelecimento de um modelo in vitro para o estudo do papel das NADPH-oxidases na hipertensão / Raquel Delgado Sarafian; orientadora Lygia da Veiga Pereira Carramaschi. -- São Paulo, 2019.
79 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. hiPSC. 2. Hipertensão. 3. Cardiomiócitos. 4. Estresse Oxidativo. 5. NOXes . I. da Veiga Pereira Carramaschi, Lygia , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Raquel Delgado Sarafian

Titulo da Dissertação: Estabelecimento de um modelo *in vitro* para o estudo do papel das NADPH-oxidases na hipertensão

Orientador: Profa. Dra. Lygia da Veiga Pereira Carramaschi

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão publica realizada a **...../...../.....**, considerou o(a) candidato(a):

( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

São Paulo, 21de maio de 2010.

Ilmo(a). Sr(a).
Profa. Dra. Lygia da Veiga Pereira Carramaschi
Laboratório de Genética Molecular do Instituto de Biociências
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

REFERENTE: **Projeto de Pesquisa** "Estabelecimento de uma biblioteca celular da diversidade genética brasileira" - **Pesquisador(a) Responsável**: Profa. Dra. Lygia da Veiga Pereira Carramaschi - **Co-Investigador(es):** Fernanda De Luca Silvestro - **Registro CEP-HU/USP**: 976/10 – **SISNEP CAAE:** 0003.0.198.000-10.

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião ordinária realizada no dia 21 de maio de 2010, analisou o Projeto de Pesquisa acima citado, considerando-o como **APROVADO**, bem como o seu **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.**

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final, em função da duração da pesquisa), de acordo com a Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, inciso IX.2, letra "c".

O primeiro relatório está previsto para 21 de maio de 2011.

Atenciosamente,

Dr. Mauricio Seckler
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital Universitário da USP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA USP
Avenida Professor Lineu Prestes, 2565 - Cidade Universitária – 05508-000 - São Paulo - SP
Tele: (11) 3091-9457 - Fax: (11) 3091-9452 - E-mail: cep@hu.usp.br

Aos meus pais e irmão, por todo amor incondicional e inigualável apoio durante minha trajetória acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à FAPESP/CAPES (processo nº: 2016/20650-8), que financiou este projeto, incluindo o período em que pude realizar estágio no exterior. Também gostaria de agradecer ao CNPq e o BNDS por financiarem os projetos dos quais a verba para realização deste projeto foram retirados.

À Professora Lygia por ter acreditado em mim e na realização não só desse como de outros projetos nos quais estive envolvida desde 2015 no LaNCE. Pela confiança para me dar a liberdade de desenvolver minhas ideias, me fornecendo suporte necessário, principalmente para enfrentar os (vários) obstáculos durante esse período. A convivência ao longo destes anos só aumentou minha admiração.

À Mari Morato, peça fundamental na minha trajetória dentro do LaNCE. Por me ensinar todos os dias muito mais do que técnicas e o desenvolvimento do pensamento científico. Pelo olhar cuidadoso materno em todos os momentos, além dos conselhos, broncas e as inúmeras situações de alegrias que dividimos. Certamente foi uma das melhores referências do meu dia a dia, e tornou-se além de uma querida co-orientadora uma “mãe postiça” que levarei para sempre.

À “Jubinha” e “Isabobora” pela amizade e companheirismo sem igual. Por me darem suporte para enfrentar as difíceis situações do dia a dia. Por dividirem desde almoços altamente científicos até “rolês aleatórios”. Por aconselharem, confortarem e proporcionarem risadas tão boas quantos os momentos compartilhados. Por me fazerem questionar a vida e interpretá-la de maneira mais leve. Além da imensurável ajuda no processo de execução, interpretação e escrita desse trabalho. Definitivamente são amizades que levarei para o resto da minha vida.

À todos meus companheiros de laboratório que dividiram comigo muito mais do que técnicas, mas o pesado fardo das frustrações diárias que envolvem a pesquisa. Em especial, Luís, Fabiano, Rodrigo e AnaLu que tanto me acrescentaram profissional e pessoalmente ao longo desses anos.

Aos meus amigos de departamento, em especial, ao Ally, Renan, Rodriguinho, Guga e Thiago que amenizavam meus dias e me proporcionaram ótimos momentos de descontração, principalmente nas nossas pausas para o café, tornando meus dias mais leves. Além de todo apoio, incentivo e companheirismos que serviram de alicerce para que eu continuasse em busca dos meus objetivos.

À professora Rhian Touyz, por me aceitar durante 6 meses em seu laboratório em Glasgow e dessa maneira me proporcionar uma das mais importantes vivências que já tive até esse momento da minha vida. Além de ter sido uma experiência profissional sem igual na qual tive a oportunidade de conhecer excelentes profissionais dos quais muitos se tornaram amigos queridos, em especial “The Livia”, Rheure e Karla. Também fui exposta a trocas culturais que mudaram minha forma de ver a vida e minhas relações interpessoais.

Ao Guto e Fran, por acreditarem em mim e no meu projeto mesmo quando tudo deu errado. Por todo incentivo e apoio e principalmente por não me deixarem desistir. Além disso, me mostraram uma nova maneira de ver o mundo acadêmico e despertaram em mim ainda mais paixão pela ciência. Agradeço também por toda preocupação e cuidado que tiveram comigo durante meu período em Glasgow. Se tornaram muito mais do que colaboradores e co-orientadores, mas amigos queridíssimos.

À minha mãe Rita, meu pai Pedro e meu irmão Vini, por todo apoio, incentivo, amor e cuidado incondicional. Por sempre acreditarem na minha capacidade. Pelos seus exemplos de caráter e honestidade, pela paciência e cumplicidade e pelas palavras de carinho que me confortaram durante os momentos mais difíceis.

Ao meu tio Bosco, por acreditar em mim mais do que eu mesma e por me encher de amor e carinho, além de apoio, conselhos e conversas que foram meu porto-seguro para acreditar, continuar e nunca desistir dos meus ideais.

Aos meus tios Júlio e Mazé, por acompanharem cada passo desta e de todas as minhas fases. Pelas palavras de consolo e incentivo nos melhores e nos piores momentos e além disto, por me ensinarem sempre através do amor, grandes lições.

À minha segunda família, Cordeiro Alves, que me acolheu com tanto cuidado e amor. Torceram junto a cada conquista, entenderam minhas (várias) ausências me dando todo suporte e carinho necessário.

A todos os meus amigos, em especial Ju, Guzinho, Gério, Lulis, Adler, Mare, Coxas, Fefita, Ikedinha, Ferrézito, Renata, Marcelitchus e Vini, por curtirem comigo cada etapa dessa jornada. Pelos momentos de descontração e risadas e por tanto terem me ensinado ao longo dos anos. São a família que eu escolhi e tenho certeza que continuarão me apoiando a cada novo desafio.

À minhas amigas de graduação Parda, Xapis, Amém, Nati e Negresco, por me acompanharem desde o início da minha trajetória acadêmica me dando o suporte e a amizade incontestáveis mesmo que agora distantes fisicamente, sempre fazendo questão de me relembrarem que não importa onde estivermos, terei sempre amor, apoio e consolo.

Por fim, ao meu melhor amigo, namorado e amor da minha vida, Gordo. Por estar ao meu lado em absolutamente todos os momentos, rindo, torcendo e sofrendo junto. Por entender minhas idas ao lab aos finais de semana, e na maioria das vezes por me acompanhar nessa empreitada. Agradeço por me trazer para realidade, por me fazer crescer e por me ensinar tanto, sempre. Agradeço por curtir cada momento desta etapa ao meu lado, me incentivando dia a dia. Seu amor foi fundamental.

"…Life's a journey, not a destination
And I just can't tell just what tomorrow brings…"

Steven Tylor

RESUMO

SARAFIAN, Raquel Delgado. Estabelecimento de um modelo *in vitro* para o estudo do papel das NADPH-oxidases na hipertensão,2019 74f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A hipertensão é um importante fator de risco para várias doenças cardiovasculares, como acidente vascular cerebral, infarto agudo do miocárdio e doença renal crônica. É uma doença complexa, multifatorial, cujos mecanismos celulares não são bem compreendidos. Recentemente, vários estudos se concentraram no papel do estresse oxidativo no desenvolvimento da hipertensão. Evidências crescentes nas últimas décadas indicam uma associação entre espécies reativas de oxigênio (ROS) e hipertensão arterial. As ROS são essenciais para a fisiologia celular, mas em uma situação desequilibrada, uma produção exacerbada de ROS pode danificar os componentes celulares e desencadear processos patológicos. No que se refere à função cardíaca, as NADPH oxidases (NOXes) são particularmente importantes porque estão envolvidas em muitas características da disfunção do coração. No entanto, em humanos, o papel dos NOXes nas patologias cardíacas causadas pela hipertensão e a relação com ROS derivadas de NOX são mal compreendidos. Neste cenário, células-tronco pluripotentes induzidas humanas (hiPSC) podem ser uma ferramenta poderosa para compreender os mecanismos celulares em resposta ao estresse oxidativo na disfunção dos cardiomiócitos induzida pela hipertensão. No presente trabalho, estabelecemos uma coleção de hiPSCs derivadas de indivíduos hipertensos responsivos e resistentes a medicamentos, e normotensos. Mostramos que as hiPSC apresentam diferentes perfis de expressão gênica entre os grupos, indicando que essas células podem manter o fenótipo relacionado à hipertensão *in vitro*, mesmo após a reprogramação nuclear. Além disto, cardiomiócitos derivados das células apresentaram expressão diferencial das *NOXe*s, se mostrando então um modelo *in vitro* para o estudo do papel das NOX na hipertensão.

Palavras-chave: hiPSC; Hipertensão; Cardiomiócitos; Estresse oxidativo; NOX

ABSTRACT

SARAFIAN, Raquel Delgado. Establishment of an *in vitro* model to study the role of NADPH oxidases in hypertension, 2019 74f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Hypertension is a major risk factor for many cardiovascular diseases, such as stroke, acute myocardial infarction, and chronic kidney disease. It is a complex, multifactorial disease whose cellular mechanisms are not well understood. Recently, several studies have focused on the role of oxidative stress in the development of hypertension. Increasing evidence in recent decades indicates an association between reactive oxygen species (ROS) and hypertension. ROS is essential for cellular physiology, but in an unbalanced situation, an exacerbated production of ROS can damage cellular components and trigger pathological processes. About cardiac function, NADPH oxidases (NOXes) are particularly important because they are involved in many characteristics of heart dysfunction. However, in humans, the role of NOXes in cardiac pathologies caused by hypertension and the relationship with NOX-derived ROS are poorly understood. In this scenario, human induced pluripotent stem cells (hiPSC) can be a powerful tool for understanding cellular mechanisms in response to oxidative stress in hypertension-induced cardiomyocyte dysfunction. In the present work, we established a collection of hiPSCs derived from responsive, drug-resistant and normotensive hypertensive individuals. We show that hiPSC present different gene expression profiles between groups, indicating that these cells may maintain the phenotype related to hypertension in vitro, even after nuclear reprogramming. Also, cell-derived cardiomyocytes showed differential expression of NOXes, thus showing an in vitro model for the study of the role of NOX in hypertension

Key- word: hiPSC; Hypertension; Cardiomyocyte; Oxidative stress; NOX

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diferença na produção de ROS entre a condição fisiológica e patofisiológica..... 20
Figura 2 - Estrutura das isoformas NOXes presentes no sistema cardiovascular 24
Figura 3 - Delineamento experimental representando esquematicamente o estudo.....29
Figura 4 - Esquema representando as etapas do protocolo de diferenciação cardíaca a partir de hiPSC.....36
Figura 5 - Esquema da placa usada para diferenciação cardiomiocítica.....36
Figura 6 - Citometria de fluxo após cultivo e expansão de eritroblastos..... 43
Figura 7- Morfologia de colônias de hiPSC..... 44
Figura 8 - Caracterização das hiPSC por Citometriade Fluxo..... 46
Figura 9 - Caracterização das hiPSC por Imunofluorescência.....47
Figura 10 - PCR para avaliação da integração dos vetores de reprogramação..48
Figura 11 - Diferenciação de corpos embrióides..... 49
Figura 12 - ScoreCard para avaliar a expressão de marcadores de diferenciação..... 50
Figura 13 - Análise de identidade por STR.....52
Figura 14 - Expressão relativa por qRT-PCR de genes relacionados com a Hipertensão em hiPSC..... 55
Figura 15 – Expressão relativa por qRT-PCR de genes relacionados com o transporte de Magnésio em hiPSC. 55
Figura 16 - Expressão dos genes das *NOXes* em hiPSC.....56
Figura 17 – Expressão proteica das NOXes em hiPSC.....57
Figura 18 - Quantificação da produção de ROS dependente de NADPH-oxidase pelo ensaio de Lucigenina.....58
Figura 19 - Citometria de fluxo para análise da eficiência da diferenciação cardiomiocítica..... 60
Figura 20 - Caracterização dos hiPSC-CM por Imunofluorescência.....61
Figura 21. Expressão de *NOX1* em hiPSC e cardiomiócitos..... 63
Figura 22 – Expressão de *NOX2* em hiPSC e cardiomiócitos.....64
Figura 23 – Expressão de *NOX4* em hiPSC e cardiomiócitos 65

Figura 24 – Expressão de *NOX5* em hiPSC e cardiomiócitos..... 65
Figura 25 – Expressão das *NOXes* em CM dos diferentes grupos.....66
Figura 26 - Expressão dos genes *NPPA* e *NPPB* em CM.....68

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....15
1.1 Hipertensão..... 15
1.2 Tratamento da hipertensão.....17
1.3 Metabolismo Oxidativo.....18
1.3.1 NOX 1.....21
1.3.2 NOX 2.....21
1.3.3 NOX 4.....22
1.3.4 NOX 5.....23
1.4 Importância das células-tronco humanas de pluripotência induzida humanaspara modelagem de doenças *in vitro*.....24
2 OBJETIVOS.....27
2.1 Objetivo geral 27
2.2 Objetivos específicos..... 27
3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....27
4 MATERIAL E MÉTODOS.....29
4.1 Seleção de pacientes utilizados no estudo.....29
4.2 Geração e caracterização de hiPSC a partir de sangue periférico de pacientes do ELSA-BRASIL.....30
4.3 Cultura de hiPSC.....31
4.4 Análise de Micoplasma.....31
4.5 Citometria de Fluxo – Pluripotência.....31
4.6 Imunofluorescência - Pluripotência.....32
4.7 Análise da integração do vetor plasmidial.....33
4.8 Integridade Cromossômica.....33
4.9 Análise da identidade celular por STR.....34
4.10 Formação de Corpos Embrióides.....34
4.11 Análise de expressão gênica dos EBs por qRT-PCR (SCORECARD).....35
4.12 Diferenciação Cardiomiocítica.....35
4.13 Caracterização dos cardiomiócitos.....37
4.13.1 Citometria de Fluxo – Troponina T Cardíaca.....37
4.13.2 Imunofluorescência.....37

4.14. Extração de RNA..... 37
4.15 Síntese de cDNA.....38
4.16 Avaliação da qualidade da reação de transcrição reversa.....38
4.17 qRT-PCRs específicas para os genes de interesse e cálculo da expressão gênica diferencial.....39
4.18 Quantificação proteica por *Western Blot* – SDS-PAGE.....39
4.19 Geração de ROS dependente de NADPH – oxidase pelo ensaio de Lucigenina.....40
4.20 Estatística.....41
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES..... 41
Parte I – Geração das linhagens de hiPSC.....41
5.1 Seleção dos pacientes 41
5.2 Geração e caracterização das hiPSC.....42
5.3 Fenotipagem para o estudo da hipertensão.....52
5.4 Diferenciação de hiPSC em Cardiomiócitos.....59
Parte II – **Análise de estresse oxidativo** 62
5.5 Análise de expressão gênica de cardiomiócitos derivados de hiPSC...62
6 CONCLUSÃO..... 68
REFERÊNCIAS..... 70
APÊNDICES.....76

1 INTRODUÇÃO

1.1 HIPERTENSÃO

As doenças cardiovasculares continuam sendo a principal causa de morbimortalidade em todo planeta, onde a hipertensão definida pela elevação da pressão arterial (PA) é um dos principais contribuintes para desenvolvimento de doenças cardiovasculares (AHLUWALIA; BANGALORE, 2017; WENZEL et al., 2016). Aproximadamente um quarto da população adulta é diagnosticada com hipertensão (AHLUWALIA; BANGALORE, 2017), afetando mais de um bilhão de pessoas no mundo. Estima-se que em 2025 este número possa chegar a cerca de 1.5 bilhão de pessoas (WENZEL et al., 2016). Só nos Estados Unidos (EUA) as doenças cardíacas já são a principal causa de morte, responsável por cerca de 610.000 mortes por ano.

A hipertensão é uma doença multifatorial, complexa, na qual 90% dos casos são classificados como hipertensão essencial, condição na qual não se sabe a causa precisamente (DINH et al., 2014), mas é caracterizada pelo aumento crônico da pressão arterial (SHIH; CONNOR, 2008). Uma minoria dos hipertensos possui hipertensão secundária, na qual um fator de risco conhecido é responsável por causar o aumento da pressão arterial, isto é, a hipertensão ocorre como uma condição secundária, como por exemplo no caso de doenças renais crônicas (DINH et al., 2014). Apesar de se tratar de uma doença multifatorial, é sabido que sua incidência aumenta principalmente em populações obesas e idosas.

A pressão arterial descontrolada tem consequências devastadoras, levando a doenças como insuficiência cardíaca, acidente vascular cerebral, infarto do miocárdio e insuficiência renal, demência, doença renal crônica, cardiopatia isquêmica e morte (CAMERON; LANG; TOUYZ, 2016; WENZEL et al., 2016). Além disto, a hipertensão arterial leva ao estresse cardíaco, e um coração sob estresse crônico sofre remodelação cardíaca, um processo que compreende alterações estruturais e funcionais, incluindo hipertrofia de cardiomiócitos, fibrose intersticial, disfunção contrátil, morte celular e dilatação

ventricular (SANTOS et al., 2011). A progressão da doença também sugere que elevações no volume de sangue desencadeiam mudanças no sistema vascular, como espessamento da parede dos vasos e hipertrofia cardíaca (ARMANI; BOTTO; G. ANDREASSI, 2011).

A pressão sanguínea é regulada por vias fisiológicas que controlam a contração cardíaca, volume do fluido extracelular e tônus vascular. Ela é determinada tanto pela força cardíaca quanto pela resistência vascular e, perturbações nas vias que a regulam podem ocorrer devido a variações no ambiente (como a dieta) e a fatores genéticos (KEARNEY et al., 2005; STAESSEN et al., 2003).

Estudos anteriores baseados em dados sobre a história familiar de indivíduos afetados, assim como dados da doença em gêmeos, estabeleceram que fatores genéticos e ambientais associados determinam a susceptibilidade à hipertensão. A herdabilidade da hipertensão é estimada entre 30% a 60% (SHIH; CONNOR, 2008). A heterogeneidade étnica e genética contribuem para a grande variabilidade clínica da doença, inclusive no que diz respeito à resposta aos medicamentos, o que faz com que estudos genéticos envolvendo a hipertensão sejam difíceis e desafiadores (SHIH; CONNOR, 2008).

No cenário hipertenso é comum ocorrer insuficiência cardíaca crônica, que é o resultado de uma complexa interação entre alterações estruturais e funcionais no miocárdio (NABEEBACCUS; ZHANG; SHAH, 2011). Essas alterações geralmente se caracterizam por uma resposta adaptativa à hipertrofia ventricular que pode progredir para uma série de alterações deletérias como fibrose intersticial, disfunção contrátil, déficit energético, morte de cardiomiócitos, disfunção vascular e dilatação da câmara. Esse conjunto de alterações deletérias são denominadas de remodelação cardíaca adversa (NABEEBACCUS; ZHANG; SHAH, 2011).

O processo de remodelação pode ser iniciado por mecanismos moleculares que envolvem diferentes vias. Dentre elas, um evento observado nos diferentes órgãos envolvidos na hipertensão é o aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS – *Reactive Oxygen Species*) (HARRISON et al., 2011). O aumento do metabolismo oxidativo está relacionado com o remodelamento tecidual, vasoconstrição, desregulação endócrina e morte celular. Estudos em modelos animais mostram que a atenuação de estresse

oxidativo pelo aumento da expressão de defesas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD), ou tratamento com antioxidantes, melhoram os efeitos da hipertensão, enquanto que deleção de SOD agrava a hipertensão (FUKAI; USHIO-FUKAI, 2011). Ainda que existam cada vez mais estudos que demonstram uma clara associação do estresse oxidativo e disfunção mitocondrial com a manutenção da hipertensão, o uso de antioxidantes para terapia em humanos ainda não foi bem desenvolvido (DIKALOVA et al., 2017).

1.2 TRATAMENTO DA HIPERTENSÃO

As drogas anti-hipertensivas diminuem a pressão sanguínea e reduzem o risco de acidentes cardiovasculares. Atualmente existem diferentes classes que atuam em órgãos distintos e diferem quanto à proteção de mortalidade cardiovascular, sendo que a maior parte dos pacientes necessita de duas ou mais drogas para controlar a pressão sanguínea (BAVISHI; BANGALORE; MESSERLI, 2017).

As drogas anti-hipertensivas recomendadas envolvem um diurético como primeira opção; seguido de bloqueadores de canal de cálcio como segundo alvo e inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) ou antagonista do receptor de angiotensina. Como quarta opção de alvo, recomenda-se antagonista do receptor de mineralocorticoide e, como última opção, β-bloqueadores, α-bloqueadores, agonistas α-adrenérgicos ou vasodilatadores diretos (VONGPATANASIN, 2014).

Segundo *a American Heart Association* (AHA - www.heart.org), define-se por Hipertenso Resistente pacientes que necessitam de 3 ou mais medicamentos havendo ou não o controle da pressão arterial. Estudos que utilizam bancos de dados disponíveis estimaram que só nos Estados Unidos a prevalência da hipertensão resistente teve um aumento de 8.8% em 1988-1994 para 14.5% em 1999-2004 e, posteriormente houve um aumento para 20.7% nos anos de 2005-2008. As causas para esses aumentos ainda não são muito bem compreendidas, mas sugere-se que esteja associada aos fatores de riscos comuns, como idade avançada, obesidade e doenças crônicas renais (CALHOUN, 2016).

No entanto, ainda que a utilização intensa de medicamentos possa conduzir a redução da pressão arterial, estudos recentes apontam para os

efeitos prejudiciais e desvantagens adquiridas a longo prazo pelo paciente exposto a estas condições, como por exemplo, insuficiência renal, dentre outros (AHLUWALIA; BANGALORE, 2017).

1.3 METABOLISMO OXIDATIVO

Sabe-se que espécies reativas de oxigênio, em baixas concentrações, desempenham uma importante função na homeostase celular (VAN DER POL et al., 2019), incluindo diversos processos fisiológicos como defesa do hospedeiro, biossíntese de hormônios, fertilização e sinalização celular. O desbalanço de ROS intracelular é denominado estresse oxidativo, e diversos estudos nos últimos anos vêm demonstrando uma efetiva relação entre o excesso de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RNS – *Reactive Nitrogen Species*) no agravamento de doenças cardiovasculares como hipertensão, aterosclerose, hipertrofia, falência cardíaca, entre outras (RABELO et al., 2010). É comum encontrar ROS e RNS em tecidos lesionados e em pacientes com processos inflamatórios, pois essas moléculas atuam como intermediários sendo comum para várias doenças, incluindo complicações macro e microvasculares (ALTENHÖFER et al., 2015; JHA et al., 2017; PARAVICINI; TOUYZ, 2008). Além disto, essas moléculas já foram relacionadas também com proliferação, contração, migração e inflamação de células vasculares (MONTEZANO et al., 2015).

As ROS são compostos intermediários reativos formados por causa da configuração eletrônica do oxigênio, o que proporciona seu recebimento de elétrons. As ROS incluem ânion superoxidos de radicais livres (O_2^-), hidroxila (OH) assim como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (NABEEBACCUS; ZHANG; SHAH, 2011). Essas ROS podem causar danos oxidativos graves no DNA, proteínas, lipídios e outras macromoléculas, além de ter papel fundamental na sinalização celular de todo o sistema Redox. Este sistema é responsável por reações de oxidação-redução existente em todas as células. É essencial para manutenção da homeostase celular, sinalização, incluindo metabolismo energético, expressão gênica, regulação do ciclo celular, resposta imune, crescimento celular e apoptose celular (ZHAO; YANG; LOSCALZO, 2014). Sendo assim, naturalmente os níveis celulares de ROS e suas respostas são reguladas por uma série de sistemas antioxidantes que envolvem enzimas como

catalase, superóxido dismutase, glutationa peroxidases, peroxidarredoxinas, entre outras (NABEEBACCUS; ZHANG; SHAH, 2011).

Além dessas, existem diversas enzimas com potencial para gerar ROS, como as do citocromo b5 redutase, FADH oxidases e citocromo c oxidase (KANAAN; HARPER, 2017), enzimas da cadeia respiratória mitocondrial, e as proteínas NOXes (ZHANG et al., 2012). A família de enzimas pró-oxidantes, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidases (denominadas NOX), são enzimas com múltiplas subunidades transmembranas (ZHANG et al., 2012) que são especialmente importantes, pois são reguladoras do sistema de homeostase cardiovascular. Além disso, até o momento são as únicas enzimas conhecidas exclusivamente dedicadas à geração de ROS em tecidos vasculares, rim, aorta e olhos (JHA et al., 2017). As NOXes utilizam o NADPH como um elétron doador para reduzir oxigênio em ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (ZHANG et al., 2012).

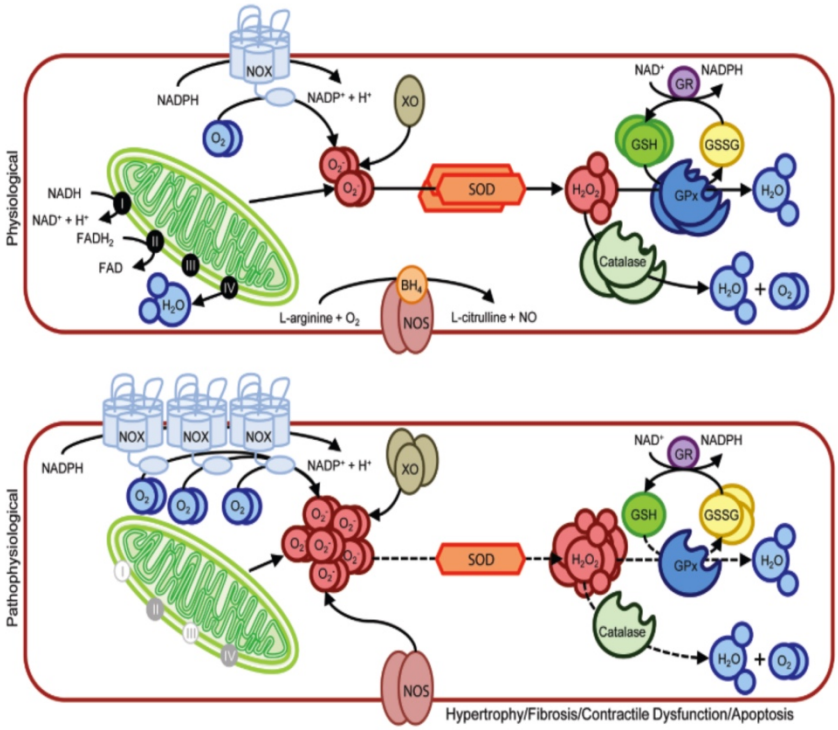
Todos os membros da família das NOXes compartilham uma estrutura central comum composta de 6 domínios transmembrana (2 domínios de ligação a heme) e um terminal C citoplasmático longo (com domínios de ligação FAD e NADPH) (PENDYALA; NATARAJAN, 2010; TOUYZ; BRIONES; SEDEEK, 2011). A atividade catalítica se origina com a ligação de NADPH ao sítio C-terminal e a transferência de elétrons através do FAD para 2 resíduos heme e, por último a molécula de oxigênio para produzir ROS (CHEN et al., 2012). A exceção se dá para NOX5, que possui uma extensão N-terminal que consiste de 4 domínios com a capacidade de se ligar a cálcio, fazendo com que esta seja ativada por Ca^{2+} (PENDYALA; NATARAJAN, 2010).

As ROS derivadas de NADPH oxidase desempenham um papel fisiológico importante na regulação da função endotelial e do tônus vascular, além do papel fisiopatológico na disfunção endotelial, hipertrofia, apoptose, fibrose, migração entre outros processos importantes relacionados a doenças cardiovasculares como a sinalização Redox (PARAVICINI; TOUYZ, 2008). Em baixas concentrações, as ROS dependentes de NOXes participam da regulação fisiológica normal das células, contração e relaxamento do vaso e pressão arterial (KANAAN; HARPER, 2017). No entanto, quando o sistema antioxidante encontra-se em desequilíbrio, a produção excessiva de ROS está fortemente associada às disfunções cardíacas e aos processos inflamatórios ligados à

aterosclerose, hipertensão, diabetes e hipercolesterolemia (JHA et al., 2017) além de estarem envolvidas com hipertrofia cardiomiocítica, fibrose intersticial e disfunções contráteis (NABEEBACCUS; ZHANG; SHAH, 2011) (Figura 1).

Sob condições patológicas, a quantidade desbalanceada de ROS gerada por NOXes pode aumentar várias vezes dependendo do estímulo específico, incluindo estiramento mecânico, angiotensina II, endotelina-1 e fator de necrose tumoral (TNF-α) (VAN DER POL et al., 2019), alterando o status redox e a função de diversas macromoléculas dentro da célula (ZHANG et al., 2012). Especificamente no coração, um aumento fora do normal de ROS pode levar ao remodelamento do miocárdio não adaptativo e insuficiência cardíaca, pois, atuam diretamente na eletrofisiologia e contratilidade dos cardiomiócitos, modificando importantes proteínas da maquinaria de excitação e contração (VAN DER POL et al., 2019).

Figura 1. Diferença na produção de ROS entre a condição fisiológica e patofisiológica.



Retirado de van der Pol et al, 2019. Imagem ilustrativa do aumento da expressão de NOX em condições patofisiológicas, aumentando a quantidade de ROS gerada, enquanto que o sistema antioxidante (SOD) não aumenta sua expressão proporcionalmente, fazendo com que fique desbalanceada a quantidade de ROS intracelular, gerando o estado de estresse oxidativo.

As células vasculares possuem múltiplos homólogos de NOXes. Até o momento já foram descritas sete isoformas (MONTEZANO et al., 2015). De modo geral, a maioria das NOXes possui baixa atividade constitutiva. Porém,

elas podem ter sua expressão aumentada tanto a nível gênico quanto proteico em estados patológico como encontrado na hipertensão ou diabetes. Quando isto ocorre, as NOX geram níveis de ROS acima da capacidade natural que o sistema antioxidante é capaz de controlar, levando com isso, ao aumento do estresse oxidativo e, consequentemente, à lesão tecidual (JHA et al., 2017).

1.3.1 NOX1:

A NOX1 é encontrada no epitélio do cólon, endotélio, músculo liso, fibroblasto, cardiomiócitos e células da glia (MONTEZANO; TOUYZ, 2014). Para sua atividade, interage com uma pequena proteína transmembrana p22phox e depende de proteínas organizadoras p7phox (ou seu homólogo NoxO1- *Nox organizer 1*) e p67phox (ou seu homólogo NoxA1 - *Nox ativador 1*) (MONTEZANO; TOUYZ, 2014; PENDYALA; NATARAJAN, 2010) (Figura 2A).

NOX1 é capaz de gerar O_2^- em níveis muito baixos sob condições basais e pode aumentar dependendo do estímulo. Em VSMC e em células endoteliais, a NOX1 é regulada através de fatores mecânicos, agentes vasoativos (como Angiotensina II, aldosterona, entre outros) e fatores de crescimento (fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento derivado e plaquetas - PDGF). Além destes, em VSMC a NOX1 pode ser ativada por H_2O_2 exógeno fazendo com que aumente a quantidade de O_2^- derivado de NOX1, o que pode levar a hipertrofia (MONTEZANO; TOUYZ, 2014).

A NOX1 possui tanto sua expressão quanto sua atividade aumentada na vasculatura em modelos de doenças cardiovasculares, como a hipertensão. No entanto, embora exista uma vasta literatura sugerindo papel da NOX1 em doenças cardiovasculares utilizando modelos de camundongos com deficiência em Nox 1, ainda existe pouca informação a respeito da sua atividade em humanos (MONTEZANO; TOUYZ, 2014).

1.3.2 NOX2:

NOX2 é uma subunidade catalítica do sistema respiratório, mas também é encontrada em fagócitos, e expressa na membrana celular de células vasculares, cardíacas, renais e neurais (TOUYZ; BRIONES; SEDEEK, 2011). O gene da *NOX2* é altamente regulado por Angiotensina II e por estiramento (MONTEZANO; TOUYZ, 2014). É uma proteína altamente glicosilada

(PENDYALA; NATARAJAN, 2010) e sua ativação depende da interação com pelo menos 5 subunidades: as citoplasmáticas p47phox, p67phox, p40phox e as de membrana p22phox e a subunidade catalítica NOX2 (TOUYZ; BRIONES; SEDEEK, 2011) (Figura 2B).

Apesar das funções fisiológicas da NOX2 ainda serem incertas, já existem diversos estudos que mostram aumentos patológicos da NOX2 contribuindo para lesão oxidativa e danos vasculares, o que inclui angiogênese, disfunção endotelial, inflamação vascular e remodelamento estrutural (TOUYZ; BRIONES; SEDEEK, 2011). Existem ainda dados experimentais que mostram que a NOX2 pode estar super regulada em modelos experimentais de hipertensão, aterosclerose e AVC (MONTEZANO; TOUYZ, 2014).

1.3.3 NOX4:

A NOX4 é encontrada em células vasculares, fibroblastos, adipócitos, hepatócitos e células renais, e possui ao menos quatro variantes de *splicing* identificadas (NOX4B, NOX4C, NOX4D e NOX4E) (TOUYZ; BRIONES; SEDEEK, 2011). Está envolvida em migração, proliferação e diferenciação celular. Além disto, esta NOX é constitutiva e seu produto principal é H_2O_2, ainda que o produto primário seja O_2^-, mas este é rapidamente dismutado para H_2O_2 (MONTEZANO; TOUYZ, 2014). Contribui constitutivamente para a produção basal de ROS, mas pode ter sua produção aumentada em resposta à Angiotensina II, glicose, TNF-α e fatores de crescimento (TOUYZ; BRIONES; SEDEEK, 2011).

Alguns estudos recentes identificaram NOX4 localizada no núcleo, retículo endoplasmático e mitocôndrias das células vasculares (TOUYZ; BRIONES; SEDEEK, 2011), e foi sugerido que pode ter efeitos fisiopatológicos importantes através da sinalização nuclear até danos no DNA. O papel da NOX4 em patologias ainda não é muito claro, porém ela tem sido implicada na hipertensão, aterosclerose, complicações cardiovasculares e renais em decorrência da diabete, e remodelamento de artérias durante a hipertensão pulmonar, assim como na senescência celular e envelhecimento (TOUYZ; BRIONES; SEDEEK, 2011). Entretanto seu papel é controverso. Estudos recentes também demonstraram que a atividade da NOX4 pode ter efeitos protetores, provavelmente através da H_2O_2 gerada, pois, em condições fisiológicas, níveis

baixos de H_2O_2 têm sido vinculados à diminuição da pressão sanguínea (MORAWIETZ, 2018) devido ao seu efeito vasodilatador (MONTEZANO; TOUYZ, 2014). O H_2O_2 é considerado como um fator hiperpolarizado derivado do endotélio que promove vasorelaxamento. Neste sentido, outro ponto importante a se considerar é o fato de que o H_2O_2, diferentemente do O_2^- , não reage com NO em quantidades consideráveis, e sendo assim, não reduz significativamente a biodisponibilidade de NO. Para sustentar ainda mais a função protetora que NOX4 pode ter no sistema cardiovascular, é importante lembrar que o H_2O_2 é um intermediário na sinalização celular, com grande capacidade de oxidar resíduos de cisteína reativos e com isso, modificar a função de fosfatases, quinases, canais iônicos e até fatores de transcrição (MORAWIETZ, 2018).

1.3.4 NOX5:

A NOX5 é a isoforma mais recentemente identificada e diferentemente das outras isoformas, a NOX5 possui 4 sítios de ligação para Ca^{2+} e não necessita da p22phox para sua ativação (Figura 2D) (FULTON, 2009). Pode ser encontrada em testículos, baço, tecido linfóide, células renais e vasculares. Tem sua atividade dependente de Ca^{2+} e só foi identificada até o momento em grandes mamíferos, sendo ausente em roedores, o que contribui para a dificuldade de ser estudada (TOUYZ; BRIONES; SEDEEK, 2011). Além disto, sabe-se que existem 5 variantes de splicing: Nox5α, β, δ e ϒ e uma variante truncada Nox5-S ou ε (FULTON, 2009).

Sua função ainda não foi bem elucidada, embora já se saiba do seu papel na proliferação de células endoteliais. A NOX5 vascular é ativada por trombina, PDGF, Angiotensina II e Endotelina 1 e sua expressão é regulada pelo fator de transcrição sensível ao cálcio (TOUYZ; BRIONES; SEDEEK, 2011). Embora seu papel ainda não esteja tão claro, existem dados na literatura que associam o aumento da expressão de NOX5 e de ROS a doenças cardiovasculares (FULTON, 2009). No entanto, a falta de modelos de estudo humanos junto à ausência de NOX5 em roedores contribuem para a dificuldade no entendimento a respeito desta isoforma.

Figura 2. Estrutura das isoformas NOXs presentes no sistema cardiovascular.

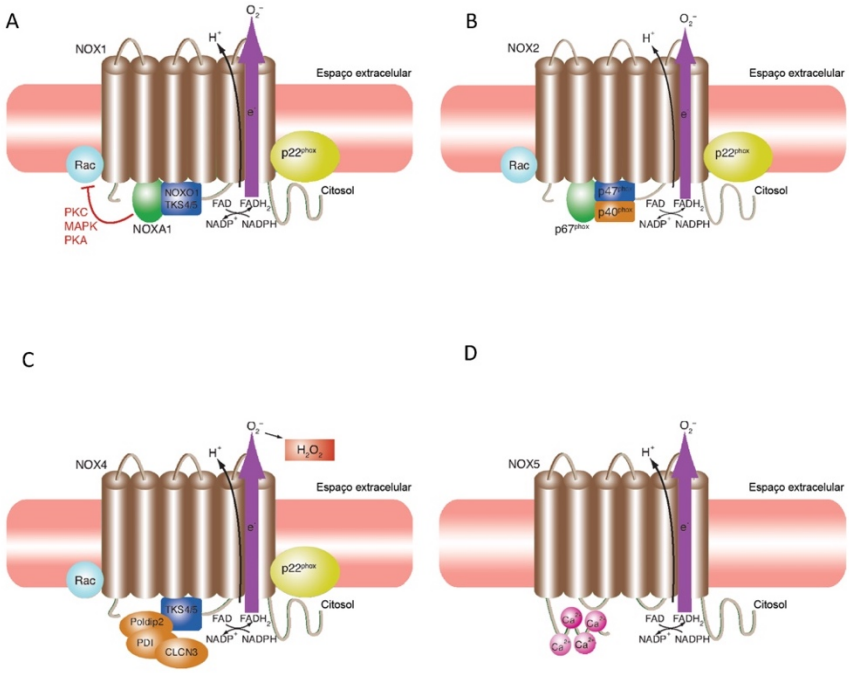


Imagem adaptada de Touyz et al, 2011. **A.** NOX 1; **B.** NOX 2; **C.** NOX 4; **D.** NOX 5.

A somatória desses achados em relação às isoformas de NOXes despertam grande interesse devido às possibilidades de terapias contra essas enzimas com o intuito de diminuir a geração de ROS, além de estratégias com a finalidade de minimizar lesões vasculares e dessa forma, prevenir ou regredir danos em órgãos-alvos associados à hipertensão (PARAVICINI; TOUYZ, 2008). No entanto, ainda faltam dados mais robustos na literatura sobre o papel das NOXes em cardiomiócitos humanos.

1.4 IMPORTÂNCIA DAS CÉLULAS-TRONCO HUMANAS DE PLURIPOTÊNCIA INDUZIDA HUMANAS PARA MODELAGEM DE DOENÇAS IN VITRO

Usualmente modelos de cultura celular são derivados de linhagens tumorais ou células imortalizadas por transformação genética. As linhagens frequentemente apresentam alterações genéticas e muitas vezes seu fenótipo

não é relacionado ao fenótipo do tecido de interesse (POUTON; HAYNES, 2005). Sendo assim, não é possível garantir que as células expressem a sinalização apropriada em relação a um receptor alvo. Este fato limita os modelos funcionais baseados em linhagens de células (POUTON; HAYNES, 2005). Nos últimos anos outra categoria celular, as células-tronco pluripotentes, tem se mostrado uma potencial ferramenta para estudos na área. Um exemplo são as células-tronco embrionárias (ESCs), células derivadas da massa celular interna de blastocistos, indiferenciadas e pluripotentes e que são capazes de se dividir indefinidamente e manter sua pluripotência *in vitro*, preservando suas características genéticas e epigenéticas (RAO, 2008). Estas podem gerar células com fenótipos que se assemelham a vários tipos celulares adultos (POUTON; HAYNES, 2007). Além das ESCs, uma alternativa pode ser o uso de células – tronco pluripotentes induzidas a partir de células somáticas através da metodologia de reprogramação celular (TAKAHASHI et al., 2007). Estas são chamadas de Células-Tronco Pluripotentes induzidas humanas (*human induced Pluripotent Stem Cells* -hiPSCs). A indução da expressão dos genes OCT4, SOX2, c-MYC e KLF4 levam à reprogramação do núcleo somático, que regride a um estágio pluripotente equivalente ao das ESCs (YAMANAKA, 2007). Além das linhagens de hiPSCs serem mais fáceis de ser estabelecidas do que as ESCs, é possível a produção de linhagens celulares portando genótipos de interesse.

As hiPSC podem ser exploradas para modelagem de diversas doenças *in vitro*, com o intuito de estudar os mecanismos moleculares da patogênese e testar novas drogas para tratamento. Estas células possuem o potencial de serem diferenciadas em qualquer tipo de célula somática de interesse (POUTON; HAYNES, 2005). A capacidade de estabelecer hiPSC através da reprogramação de células somáticas adultas permite o desenvolvimento de bancos de células-tronco que abrangem de forma mais ampla a diversidade genética humana (TURNER et al., 2013).

As hiPSC têm se mostrado uma importante ferramenta para entender a relação entre perfil genético, metabolismo de drogas e mecanismos de manutenção de doenças (complexas e mendelianas) além de ter aberto novas possibilidades para testes de toxicidade de novas drogas em populações de pacientes – os chamados ensaios clínicos *in vitro* (MEDINE et al., 2013). Um

exemplo recente da aplicação desses ensaios/modelos pode ser observado em estudos com cardiomiócitos derivados de hiPCS (CM-hiPSC), em que foi demonstrado que estes são capazes de recapitular a predileção da resposta celular de pacientes que apresentavam cardiotoxicidade induzida por doxorrubicina (agente quimioterápico utilizado para tratamento em uma gama de neoplasias) (BURRIDGE et al., 2016).

No entanto, não existem estudos que utilizem cardiomiócitos derivados de hiPSCs (hiPSC-CM) como modelo para hipertensão. A grande maioria dos estudos utilizam hiPSC-CM como modelos para doenças como: cardiomiopatia dilatada (JIANG et al., 2017), mal de chagas (DA SILVA LARA et al., 2018) e insuficiência cardíaca (TIBURCY et al., 2017). Além disto, até este trabalho, há apenas um estudo publicado descrevendo hiPSCs de hipertensos (BIEL et al., 2015) e neste, os pacientes utilizados variavam em idade, sexo e etnia. Sendo a hipertensão uma doença multifatorial, a homogeneidade das amostras se faz necessária para estudos *in vitro* que visam elucidar mecanismos biológicos relacionados com a patologia.

Diante da importância de estudos populacionais envolvendo esta temática, em 2008, a Fundação Oswaldo Cruz e mais cinco universidades brasileiras (Universidade Federal da Bahia, do Espírito Santo, de Minas Gerais, do Rio Grande do Sul e Universidade de São Paulo) criaram o Estudo Longitudinal da Saúde do Adulto (ELSA-Brasil – www.elsa.org.br), com o intuito de contribuir para o melhor entendimento de doenças crônicas como as cardiovasculares e diabetes na população adulta brasileira (AQUINO et al., 2012). Esse estudo acompanha 15.105 adultos de 35 a 74 anos. Para estes, foi estabelecido um banco de dados de exames clínicos e entrevistas realizados a cada 2-3 anos, incluindo exames antropométricos, eletrocardiograma e outras análises cardiovasculares, ultrassom hepático, teste de tolerância à glicose oral, e coleta de urina (MUELLER et al., 2014).

Em particular, o ELSA-Brasil identificou um grupo de 4.116 indivíduos atualmente em tratamento para hipertensão (LOTUFO et al., 2015). Destes, 11% apresentam hipertensão resistente, definida como indivíduos com pressão sanguínea sistólica ≥140 mmHg ou diastólica ≥ 90mmHg em tratamento com pelo menos três drogas. Em nosso laboratório, células mononucleares do sangue (MNCs) periférico de aproximadamente 1.800 participantes do ELSA-

Brasil, foram isoladas e criopreservadas para estudos futuros (TOFOLI et al., 2016). Sendo assim, este estudo mostrou uma grande oportunidade para estabelecer uma coleção de hiPSC derivadas destes participantes com hipertensão, baseado em características clínicas homogêneas.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer um modelo *in vitro* que permita analisar o papel das enzimas NOXes humanas na hipertensão.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Gerar e caracterizar 9 linhagens de hiPSC, sendo 3 de indivíduos hipertensos responsivos, 3 de hipertensos resistentes e 3 de indivíduos normotensos pertencentes ao ELSA-Brasil com características como idade, IMC e sexo homogêneas;
- Diferenciar 9 linhagens de hiPSC em cardiomiócitos e caracterizar por citometria de fluxo (% de células positivas para Troponina-T cardíaca) e imunofluorescência ($\propto$-actinina);
- Quantificar a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas hiPSC indiferenciadas pelo ensaio de Lucigenina;
- Analisar a expressão gênica e proteica basal das *NOX1, NOX2, NOX4 e NOX5* nas hiPSC indiferenciadas;
- Analisar a expressão gênica das *NOX1, NOX2, NOX4* e *NOX5* nos cardiomiócitos derivados de hiPSC;

3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

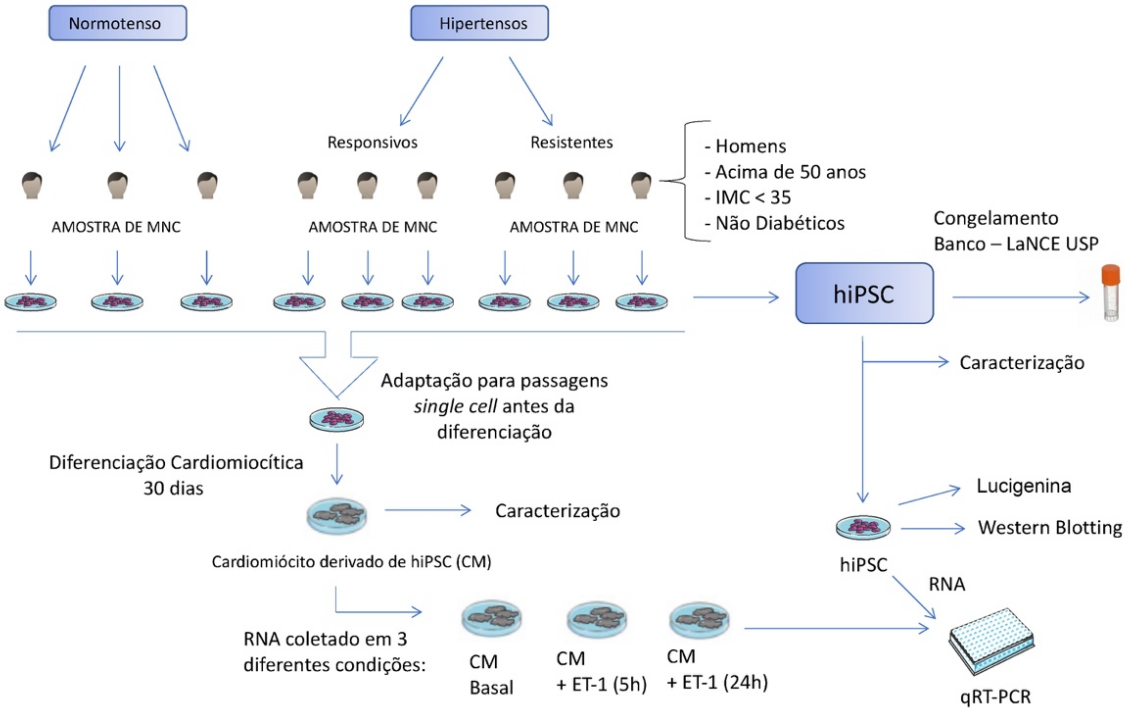
Para estabelecer um modelo *in vitro* que permitisse correlacionar dados clínicos e ação celular, fizemos o delineamento experimental do estudo conforme o diagrama representado na Figura 3 de forma que a escolha dos pacientes em relação às características clínicas fossem mais homogêneas, minimizando variáveis. Foram coletadas e reprogramadas 8 amostras de sangue periférico

de pacientes hipertensos (homens, com mais de 45 anos, não diabéticos, não obesos mórbidos) pertencentes ao ELSA-USP para a geração de hiPSC, somado a uma hiPSC que havia sido previamente gerada em projetos anteriores, totalizando três normotensos, três hipertensos responsivos e três hipertensos resistentes.

Uma vez estabelecidas, as hiPSC foram diferenciadas em cardiomiócitos e caracterizadas através de Citometria de Fluxo para Troponina T. Após a caracterização, os cardiomiócitos derivados de hiPSC foram estimulados com ET-1, o RNA total dos cardiomiócitos foi extraído e as amostras foram submetidas a análises de expressão gênica das enzimas *NOXes* por PCR quantitativo em tempo real em duas condições: **1) Basal:** os cardiomiócitos que foram cultivados até o 30º dia de diferenciação e tiveram seu RNA coletado sem nenhum estímulo ; **2) Tratados com Endotelina 1 (ET-1)**: os cardiomiócitos que foram cultivados até o 29º dia de diferenciação, e foram estimulados com ET-1 (100nM/mL) (Montezano et al, 2010) durante 5 e 24 horas.

Como complementação, foram realizados experimentos em colaboração com o laboratório da Profª Rhian Touyz, no *BHF Glasgow Cardiovascular Research Center*, *University of Glasgow*– Escócia. Foi avaliado a expressão gênica e proteica nas hiPSC indiferenciadas de importantes genes relacionados com a hipertensão, assim como a quantificação de ROS dependente de NADPH pelo ensaio de Lucigenina.

Figura 3. Delineamento experimental representando esquematicamente o estudo.



Para cada paciente escolhido de acordo com as características requeridas foi gerada linhagem de hiPSC. Cada linhagem foi expandida para formação do banco de estoque e caracterizada quanto a capacidade de pluripotência adquirida. Essas linhagens foram submetidas a diferenciação cardiomiocítica no qual todas foram caracterizadas em relação à morfologia e citometria para o marcador cardíaco Troponina-T. Estas também foram utilizadas para a realização de experimentos com indução de estresse oxidativo por ET-1 para avaliar diferenças na expressão das enzimas NOXes (*NOX1, NOX2, NOX4 e NOX5*) nas diferentes condições clínicas de cada indivíduo utilizado no estudo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO DOS PACIENTES UTILIZADOS NO ESTUDO

Filtragem inicial dos pacientes foi realizada a partir do banco de dados do ELSA-Brasil (aprovado pelo comitê de ética - CAAE: 34595414.3.0000.5464) utilizando o software R (versão 3.4.1), como pacote “Matchlt” para que a seleção das amostras permitisse que os grupos analisados possuíssem a distribuição mais homogênea possível no que se refere a fatores que podem influenciar o

fenótipo hipertenso. Consideramos portanto: presença de diabetes, sexo, idade e IMC dos pacientes (Item 5.1;Tabela 4).

4.2 GERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE HIPSC A PARTIR DE SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES DO ELSA-BRASIL

Em nosso laboratório, das 1.800 MNCs que foram isoladas e congeladas a partir de sangue periférico de pacientes do ELSA-Brasil, 351 são de participantes hipertensos responsivos e 42 de não responsivos. Previamente já haviam sido reprogramados 9 pacientes do grupo de hipertensos resistentes à drogas, sendo que destes apenas 1 se encaixava nas características requeridas para este projeto. Portanto, reprogramamos mais 8 amostras de MNC do banco, selecionadas segundo o item 4.1.

As células MNCs foram descongeladas e transferidas para um meio de cultura StemSpan (STEMCELL) suplementado com dexametasona, IL-3, IGF-1, SCF e EPO, que privilegia o crescimento dos eritroblastos.Cada cultura foi colocada em um poço de uma placa de cultura de seis poços com a proporção de $2x10^6$células/mL a 37ºC e 5% de CO_2. No dia seguinte as células foram trocadas de poço eliminando os monócitos que ficaram aderidos no poço de descongelamento. O meio de cultura foi trocado a cada três dias, e as células foram cultivadas por aproximadamente 12 dias, para então serem nucleoporadas, segundo o protocolo estabelecido por Chou e colaboradores (2011) com modificações. Os eritroblastos foram nucleoporados com os plasmídeos MBX (Addgene® - expressão de BCL), MOS (Addgene® - expressão de Oct4 e Sox2) e MMK (Addgene® - expressão de Myc e KLF4) utilizando o Kit Amaxa® Human CD34 Cell Nucleofector® (Lonza), conforme o protocolo do fabricante. Após a nucleoporação, as células serão mantidas por 72 horas no meio original, sendo então transferidas para placas contendo *Mouse Embryonic Fibroblasts* (MEFs) inativados com mitomicina C e meio HESC e em matriz Geltrex (Life Tech) e meio E8 (Life Tech). O meio foi trocado dia sim dia não até a observação da formação de colônias de hiPSCs. Após o aparecimento das primeiras colônias, o meio foi trocado diariamente. As colônias foram passadas em pool para poços de 6 well e as culturas foram expandidas até se obter uma quantidade suficiente de células para realizar os testes de caracterização de

pluripotência por citometria de fluxo, teste de presença de micoplasma, integração plasmidial, cariótipo para análise de integridade genômica, ScoreCard (para análise de potencial de diferenciação para os 3 folheto germinativos) e identidade *fingerprint* por STR.

4.3 CULTURA DAS HIPSCS

As células foram cultivadas em meio E8 na matriz Geltrex® (ambos da Thermo Fischer Scientific) em incubadora a 37ºC, atmosfera de 5% CO_2 e alta umidade. A troca do meio de cultura acontece diariamente e as passagens foram feitas em fragmentos utilizando-se *Gentle Cell Dissociation Reagent* (STEMCELL Technologies) ou Versene Solution (Thermo Fischer Scientific) ou em *single cell* com TrypLE™ (Thermo Fischer Scientific) em meio de cultura suplementado com 10 µM do inibidor de ROCK Y-27632 (Sigma Aldrich).

4.4 ANÁLISE DE MICOPLASMA

A detecção de micoplasma foi feita utilizando 100µl de amostras de sobrenadante de culturas confluentes (>80%) com o Kit MycoAlert™PLUS Mycoplasma Detection (Lonza) seguindo as especificações do fabricante. É um teste bioquímico que explora atividades de enzimas micoplasmáticas encontradas em seis principais contaminantes da cultura. Enzimas do micoplasma se tiverem presentes no sobrenadante reagem com o substrato fornecido pelo kit, convertendo ADP em ATP, que é transferido como sinal de luz através da enzima luciferase. A luminescência é medida antes (leitura A) e depois da adição do substrato (leitora B) pelo luminômetro GLOMAX Multi Jr (Promega). Uma razão entre as duas leituras indica a presença ou ausência de micoplasma.

4.5 CITOMETRIA DE FLUXO - PLURIPOTÊNCIA

Para os experimentos de citometria de fluxo, as hiPSC foram individualizadas com Accutase (BD Biosciences) por 5 minutos à 37ºC e após, neutralizadas com o próprio meio de cultura. Após a dissociação em *single cell*, as células foram lavadas duas vezes com dPBS. Uma vez que as células estavam sem a presença do agente dissociador, essas foram contadas no TC20 (BioRad) para posterior fixação utilizando o Buffer BD *Cytofix Fixation* por 20 minutos à RT, conforme indicação do fabricante. Após fixadas, as células foram

permeabilizadas por 10 minutos à RT, utilizando o Buffer BD Perm/Wash. A análise da expressão dos marcadores: Oct3/4, Nanog e Sox2 foi feita utilizando os anticorpos presentes no kit BD Stemflow (BD Bioscience cat:#560589), seguindo as especificações do fabricante. As amostras foram analisadas utilizando o equipamento BD Accuri™ C6 Cytometer (BD Biosciences).

4.6 IMUNOFLUORESCÊNCIA - PLURIPOTÊNCIA:

Células foram plaqueadas em Geltrex e E8 na densidade de 10^5 células/ml em poços de 4 *well* sobre lâminas de vidro apropriados para imunofluorescência/imunocitoquímica (BD Bioscience, cat # 354104). Quando as colônias atingiram o tamanho adequado (quando uma colônia cobre o campo de luz no aumento de 10x do microscópio) as células foram lavadas duas vezes em PBS e fixadas com paraformaldeido – sacarose 4% por 20 minutos RT. Uma vez fixadas, as células foram permeabilizadas em Triton X_100 0,1% por 30 minutos e bloqueadas em PBS + 5%BSA por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida as células foram lavadas e incubadas sob agitação com anticorpos primários de interesse (Tabela 1) por cerca de 16 horas a 4ºC. No dia seguinte, após 3 lavagens as células foram incubadas com anticorpos secundários (Alexa488 cat# A11020 – diluição 1:500 ; Alexa594 cat# A11055 – diluição 1:500) marcados por 1 hora a temperatura ambiente. Após 2 lavagens em PBS, as células foram incubadas com HOECHST por 5 minutos, lavadas em PBS e analisadas no microscópio de fluorescência Axio ImageD2 Zeiss.

Tabela 1. Anticorpos utilizados no ensaio de imunofluorescência para hiPSC indiferenciada.

Anticorpo	Diluição	Localização	Catálogo
Nanog	1:25	Nuclear	RD #AF1997
Oct 4	1:100	Nuclear	#sc-5279
SSEA-4	1:100	Citoplasmático	Stemgent #09-0006
TRA-1-60	1:25	Citoplasmático	Stemgent #09-0010
HOECHST	1:1000	Núcleo	Life #H3570

4.7 ANÁLISE DA INTEGRAÇÃO DO VETOR PLASMIDIAL:

A ausência da integração do DNA dos vetores epissomais (MBX, MOS e MMK) ao gDNA das hiPSCS geradas foi confirmada por PCR como descrito por Chou *et al*., 2011. O gDNA foi coletado DNA das linhagens entre a 10ª e 12ª passagem e extraído utilizando o kit QIamp DNA Mini Kit (Qiagen - cat # 51306) segundo instruções do fabricante. A quantificação do DNA foi realizada empregando-se espectofotometria (NanoDrop, NanoDrop Technologies). Primers para o gene Epstein–Barr nuclear antigen 1 (*EBNA1*) do vetor pCEP4 (usado como *backbone* destes vetores) foram usados para amplificação do gene nas amostras de gDNA das hiPSCS e dos vetores utilizados para a reprogramação (MBX, MOS e MMK - controles positivos) através de PCR convencional. As reações em volume total de 21,6 µl, foram feitas sob as seguintes concentrações de reagentes: 2,5µl de Buffer 10X; 0,9µl de $MgCl_2$ (50mM); 0,6µl de dNTPs (5mM); 0,3µl da enzima Taq Polimerase (5U/µl); 0,5µl de cada iniciador (*Foward:* TTTAATACGATTGAGGGCGTCT *Reverse:* GGTTTTGAAGGATGCGATTAAG - 244pb); 1µl de DNA molde (50ng); H_20 milli-Q autoclavada q.s.p 21,6µl. Após a amplificação do gene *EBNA1* os produtos de PCR foram fracionados por eletroforese em gel de agarose 3% em TAE 1X corado com brometo de etídio.

4.8 INTEGRIDADE CROMOSSÔMICA

Para analisar a integridade cromossômica foi coletado DNA das linhagens e extraído utilizando o kit QIamp DNA Mini Kit (Qiagen - cat # 51306) segundo instruções do fabricante. Utilizamos o kit hPSC Genetic Analysis Kit (STEMCELL cat #07550) de PCR em tempo real, seguindo recomendações do fabricante. Este kit conta com um conjunto de 9 primers capazes de dectar a maioria das anormalidades cariotípicas relatadas em células troco embrionárias e hiPSC. A corrida das amostras foi realizada no equipamento QuantStudio™ Flex (Thermo Fisher Scientific) e a análise através do modelo disponível em www.stemcell.com/geneticanalysisapp.

4.9 ANÁLISE DE IDENTIDADE CELULAR POR STR

Para confirmar a identidade das hiPSCs geradas e garantir que não ocorreu contaminação ou troca de amostras durante os procedimentos de reprogramação e cultivo, as linhagens geradas e suas respectivas MNCs de origem foram analisadas através de genotipagem de microssatélites por repetições curtas em tandem (STR - *Short Tandem Repeats)*. O DNA foi extraído utilizando o kit QIamp DNA Mini Kit (Qiagen - cat # 51306) segundo instruções do fabricante. A quantificação do DNA foi realizada empregando-se espectofotometria (NanoDrop, NanoDrop Technologies). A reação de amplificação por STR foi feita utilizando o kit AmpFlSTR® Identifiler® Plus PCR Amplification (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Foster City, Califórnia, EUA), seguindo as especificações do fabricante. Dezesseis STR loci (D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, AMEL, D5S818, FGA) foram amplificados e os fragmentos resultantes foram analisados com o software GeneMapper®(Applied Biosystems).

4.10 FORMAÇÃO DE CORPOS EMBRIÓIDES

Para demonstrar a diferenciação espontânea das hiPSC *in vitro* nos 3 folhetos germinativos (endoderma, mesoderma e ectoderma), as culturas de iPSC cresceram até a confluência de 70-80% então as colônias foram fragmentadas com auxílio de um tip de 200 µl (fazendo a forma de jogo da velha), tratadas com 2 mg/ml de Dispase II (Thermo Fisher Scientific cat. nº 17105) e incubadas durante 5 minutos a 37ºC. Os fragmentos foram lavados 2x com meio de cultivo basal (DMEM F12, Thermo Fisher Scientific), centrifugados 160 x *g* (860 rpm) durante 2 minutos (RT) e transferidos para placas de 6 poços previamente tratadas com agarose 1% para o cultivo em suspensão com o meio de cultura Essential E8. Após 5 dias os EBs foram transferidos para uma placas de 6 poços tratadas com gelatina 0,1% (StemCell Technologies) e cultivadas por mais 16 dias (total de 21 dias) com o meio de diferenciação (DMEM, 20% FBS ESQ, 2 mM L-glutamax, MEM-NEAA 2 mM, 0.1 mM β-mercaptoetanol, 1% HEPES, 1% Piruvato de Sódio. 1% penicilina-estreptomicina) (todos reagentes da Thermo Fisher Scientific)(Tofoli *et al*., 2016). No 21º dia os RNAs das culturas

de hiPSC diferenciadas foram coletados e extraídos conforme descrito no tópico 4.14.

4.11 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DOS EBs POR qRT-PCR (SCORECARD)

Um µg de RNA foi usado na reação com a transcriptase reversa usando o kit High Capacity cDNA Kit (Thermo Fisher Scientific) para a síntese do cDNA (*template*) e posteriormente transferido para placas TaqMan® hPSC Scorecard™ kit 384 *wells* (cat nº A15872 - Thermo Fisher Scientific) seguindo as especificações do fabricante. A corrida das amostras foi realizada no equipamento QuantStudio™ Flex (Thermo Fisher Scientific) e o potencial de pluripotência e de diferenciação nos 3 folhetos germinativos foi analisado com o programa TaqMan® hPSC Scorecard Analysis Software (Tofoli *et al*., 2016).

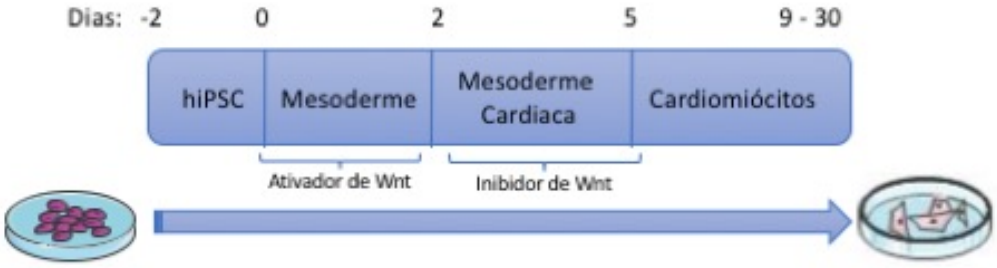
4.12 DIFERENCIAÇÃO CARDIOMIOCÍTICA

A diferenciação cardiomiocítica de hiPSCs foi feita utilizando uma combinação dos protocolos de LIAN et al., 2013 e BURRIDGE et al., 2014. As hiPSCs foram individualizadas com TrypLE™ e plaqueadas por 3-5 passagens antes do início do protocolo para adaptação das células à passagem *single cell.* Brevemente, as células foram então individualizadas e plaqueadas na matriz Geltrex® a uma densidade aproximada de $1,2x10^5$células/cm² em meio E8 com 25% mTeSR™ (STEMCELL Technologies) suplementado com 5 µM do inibidor de ROCK Y-27632. Dois dias depois do plaqueamento (Dia 0), caso as células estivessem 100% confluentes e compactadas, ocorreu a troca para o primeiro meio de diferenciação cardiomiocítica (RPMI/B27$^-$suplementado com inibidor de GSK-3β). O meio RPMI/B27$^-$é constituído de meio RPMI 1640 (Thermo Fischer Scientific) suplementado com B27 sem insulina 1X (B-27® Supplement 50X, minus insulin - Thermo Fischer Scientific). Nos dias subsequentes até o dia 4, foram utilizados os meios RPMI/B27$^-$ suplementado com BMP4 (R&D Systems) e com um inibidor de GSK-3β e RPMI/B27$^+$ (RPMI suplementado com B27 com insulina 1X) suplementado com inibidores da via de *Wnt*. Após o 5º dia, a troca aconteceu com meio CDM3 (Burridge et al., 2014), até o dia 15, quando foi realizada a passagem. Os cardiomiócitos foram plaqueados e cultivados por

mais 15 dias adicionais para maturação (em meio CDM3) completando um total de 30 dias de diferenciação (Figura 4).

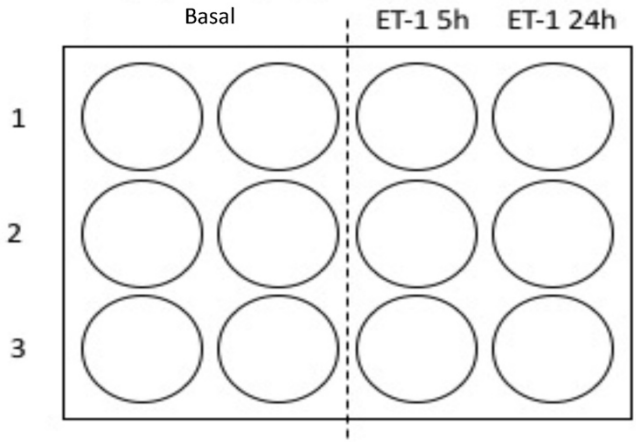
No 30º dia de diferenciação, estimulamos as células com 0.1uM/ml de Endotelina-1 (Sigma), durante 5 e 24 horas, para posterior coleta de RNA (conforme esquema demonstrado no esquema da Figura 5).

Figura 4. Esquema representando as etapas do protocolo de diferenciação cardíaca a partir de hiPSC.



Esquema da diferenciação cardiomiocítica demonstrando as etapas requeridas durante os 30 dias de cultivo das células. Iniciando com 2 dias de cultivo das hiPSC seguido da indução de diferenciação em mesoderme e mesoderme cardíaca. Ao final da diferenciação da mesoderme cardíaca (entre os dias 7 e 9) é possível visualizar as primeiras contrações espontâneas. A partir do 15º dia, onde ocorre a passagem dos cardiomiócitos fetais, inicia-se o processo de maturação. Deste ponto em diante, as contrações diminuem em frequência e já é possível visualizar morfologia celular mais próxima ao esperado para cardiomiócitos maduros.

Figura 5. Esquema da placa usada para diferenciação cardiomiocítica.



Desenho experimental das placas de diferenciação cardiomiocítica sem estímulo (controle - basal) e estimuladas com ET-1 (0.1uM) por 5 e 24 horas para posterior coleta de RNA.

4.13 CARACTERIZAÇÃO DOS CARDIOMIÓCITOS

4.13.1 CITOMETRIA DE FLUXO – TROPONINA T

Para os experimentos de citometria de fluxo, os cardiomiócitos foram individualizados com tripsina-EDTA 0,25%, centrifugados e ressuspendidos em meio de cultura. A fixação aconteceu utilizando-se a solução BD Cytofix™ (BD Biosciences) por 20 minutos à temperatura ambiente (TA), e o bloqueio foi feito em solução de PBS- BSA 3% por 30 minutos a TA. Após, as células foram incubadas por uma hora à temperatura ambiente com o anticorpo PE Mouse Anti-Cardiac Troponin T(BD Biosciences -Cat #564767). Decorrido o tempo de incubação, as amostras foram lavadas e a análise da expressão da proteína de interesse foi feita utilizando o equipamento BD Accuri™ C6 Cytometer (BD Biosciences).

4.13.2 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Células foram lavadas duas vezes em PBS e fixadas com paraformaldeido - sacarose 4% por 20 minutos RT. Uma vez fixadas, as células foram permeabilizadas em Triton X_100 0,1% por 15 minutos e bloqueadas em PBS + 4%BSA por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida as células foram lavadas e incubadas com anticorpo primário de interesse (tabela 2) *overnight* a 4ºC. No dia seguinte, após 3 lavagens com Tween -20 0,1%, as células foram incubadas com anticorpos secundários marcados por 1 hora a temperatura ambiente. Após 3 lavagens com Tween -20 0,1%, as células foram incubadas com HOECHST por 5 minutos, lavadas em PBS e analisadas ao microscópio de fluorescência.

Tabela 2. Anticorpos utilizados no ensaio de imunofluoresc6encia para cardiomiócitos

Anticorpo	Diluição	Localização	Catálogo
Anti -∝- actinin	1:500	Citoplasmático	Sigma #A7732
HOECHST	1:1000	Núcleo	Life #H3570

4.14 EXTRAÇÃO DE RNA

O RNA total das culturas de células foi extraído utilizando-se o Reagente TRIzol® (Life Technologies) Brevemente, as células plaqueadas em poços de 12

well (80-100% confluentes) foram lisadas com 1 mL de TRIzol® e congeladas em freezer -80˚C. Após, foram incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos. Foram adicionados 200 µl de clorofórmio a cada uma das amostras, que, após incubação de três minutos, foram centrifugadas a 12.000g por 15 minutos (4ºC). A fase incolor observada após a centrifugação foi transferida para tubos estéreis e, em cada um destes, foi adicionado 1 volume de etanol 70% preparado com água tratada com o inibidor de RNAse, dietilpirocarbonato (DEPC) para precipitação do RNA.

Após, seguimos com aproximadamente 3 lavagens com etanol 70% até a eluição do RNA em 30µl de água DEPC. A quantificação do RNA foi realizada empregando-se espectofotometria (NanoDrop, NanoDrop Technologies) no comprimento de onda 260nm. A estimativa de pureza do RNA obtido foi feita pela determinação da razão entre a absorbância de 260nm e 280nm (que mede a contaminação da amostra com proteínas) e da razão 260/230 para estimativas da quantidade de sal nas amostras. Em ambos os casos o RNA era considerado de boa qualidade quando a razão era superior a 1,8.

4.15 SÍNTESE DE cDNA

Para cada amostra, 1 µg do RNA total extraído foi utilizado para a síntese de DNA complementar (cDNA) segundo as instruções do kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Life Technologies).

4.16 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA

Para controle da qualidade do cDNA sintetizado, foram feitas amplificações por PCR convencional do gene constitutivo *GAPDH* e o produto amplificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose. As reações, em volume total de 20µl, foram feitas sob as seguintes concentrações de reagentes: 4µl de 5X Buffer GC; 0.4µl dNTP (10uM); 0.2µl da enzima *Phusion Polymerase*; 1µl de cada iniciador (*Foward:* GCCTCCCGCTTCGCTCTCTG *Reverse:* CGTTGAACTCCGACCTTCACCTTCC); 2µl de cDNA molde ; H20 tratada com DEEPC q.s.p 20µl. Os paramêtros estabelecidos para as reações de PCR foram: 98ºC/30 minutos - 1 ciclo; 98ºC/10 minutos, 72ºC/ 30minuto - 40 ciclos; 72ºC/ 5

minutos - 1 ciclo; 10ºC/ ∞. O produto amplificado foi fracionado por eletroforese em gel de agarose 2% em TAE 1x corado com brometo de etídio.

4.17 qRT-PCRS ESPECÍFICAS PARA OS GENES DE INTERESSE E CÁLCULO DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL

As reações para os genes *NOX1*, *NOX2*, *NOX4*, *NOX5*, *HPRT* foram realizadas em volume final de 10 µl, utilizando-se 2 µl de cDNA (5 ng/µl), 0,5 µl dos ensaios de expressão gênica TaqMan Hs01071088_m1, Hs00166163_m1, Hs01379108_m1, Hs00225846_m1, Hs02800695_m1 respectivamente (Thermo Fischer Scientific), 5 µl de 2X TaqMan Gene Expression Master Mix(Thermo Fischer Scientific) e 2,5 µl de H_2O DEPC. As sequências de *primers* Syber utilizados para análise nas hiPSC indiferenciadas encontra-se no APÊNDICE A. O termociclador utilizado foi o Applied Biosystems Step One Plus™ Real Time PCR System (Life Technologies).

Os valores de C_T obtidos pelo software foram usados para o cálculo da diferença de expressão gênica entre as amostras a serem comparadas. Todas as reações foram realizadas em duplicatas e foram considerados aceitáveis resultados cujas diferenças entre os C_Ts das réplicas foram menores que 0,5. A diferença entre os valores de C_T de amostras diferentes obtidos para o gene de interesse após normalização pelos C_Ts de um gene de expressão estável (no nosso caso, HPRT) é chamada ΔC_T e reflete sua expressão diferencial. O cálculo da expressão diferencial relativa (fold-change) foi feito utilizando-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta C_T}$, em que $\Delta\Delta C_T$ foi calculado como: ΔC_T da amostra de interesse - ΔC_T da amostra controle (CM derivado da hiPSC 16, amostra controle externa aos grupos considerados neste trabalho).

4.18 QUANTIFICAÇÃO PROTEICA POR WESTERN BLOT – SDS PAGE

Immunoblot foi utilizado para a avaliação dos níveis de proteína. As amostras foram lisadas em tampão de radioimunoprecipitação (RIPA) (50 mM Tris, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,1% SDS) suplementado com 1 mM fluoreto de fenilmetilsulfonilo, 1 µg / ml de pepstatina A, 1 µg / ml de leupeptina, 1 µg / ml de aprotinina (Sigma-Aldrich), 10 mM de fluorato de sódio

(AnalaR Normapur; VWR International, Leuven, Bélgica) e 1 mM de ortovanadato de sódio (Alfa Aesar, Ward Hill, MA). As concentrações de proteína foram determinadas usando o kit de ensaio de proteína DC (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Quantidades iguais de proteína foram separadas por SDS-PAGE a 10% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad Laboratories). A ligação inespecífica foi bloqueada incubando 1 hora com 5% de leite desnatado em TBS. As membranas foram incubadas durante a noite a 4°C em agitação constante com anticorpos primários específicos para as isoformas NOX e α-tubulina como normalizador (tabela 3). Como anticorpos secundários, utilizou-se IgG anti-coelho fluorescente (1:5000) e IgG anti-camundongo (1: 5000). A expressão proteica foi visualizada e quantificada utilizando o sistema de leitura fluorescente e software Licor.

Tabela 3. Anticorpos utilizados no ensaio de Imunoblotting

Anticorpo	Diluição	Tamanho
NOX 1	1:1000	75 kDa
NOX 2	1:1000	60 kDa
NOX 4	1:1000	70 kDa
NOX 5	1:1000	75 kDa
∝- tubulina	1:1000	50 kDa

Abreviação: kDa – kilodaltons

4.19 GERAÇÃO DE ROS DEPENDENTE DE NADPH – OXIDASE PELO ENSAIO DE LUCIGENINA

As células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato e homogeneizadas em tampão de lise. Ambos foram transferidas para microtubos. O ensaio de quimioluminescência derivado da lucigenina foi utilizado para determinar a atividade da NADPH oxidase. A reação começa pela adição de NADPH (0,1 mM) à suspensão contendo a amostra (50 µl), lucigenina (5 µM) e ensaio de tampão fosfato (KH2PO4 50 mM, EGTA 1 mM, sacarose 150 mM, pH 7,4), 250 µl de volume final. A luminescência foi medida a cada 1,8 segundos por 3 minutos em um luminômetro (Lumistar Galaxy; BMG Labtechnologies, Ortenberg, Alemanha). O tampão utilizado foi considerado como branco e foi subtraído de cada leitura.

4.20 ESTATÍSTICA

Dados de PCR quantitativo em tempo real, *Immunoblotting* e Lucigenina foram expressos como média +/- desvio padrão de pelo menos 3 replicas independentes. O software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, USA) foi usado para análise estatística. Dados foram analisados por *Student's T-Test* (quando apenas 2 grupos) ou Análise de Variância (ANOVA) (se 3 ou mais grupos) não paramétrico, seguido de analises por significância estatística, pelo teste de Kruskal-Wallis e teste de múltiplas comparações de Dunns. Valores de P menores que 0.05(*), 0.01 (**), 0.001 (***) ou 0.0001 (****) foram considerados estatisticamente significante.

Dados de PCR quantitativo foram calculados em relação a mesma amostra referência (hiPSC-CM 16), que é uma linhagem controle que não faz parte do grupo experimental deste trabalho, presente no banco de células do nosso laboratório.

Dados de Lucigenina foram calculados pela diferença entre os valores basais e após adição de NADPH, normalizados pela quantidade total de proteína de cada amostra. Os resultados foram expressos em porcentagem em relação ao controle.

Dados de *Immunoblot* foram calculados utilizando o software Licor e expressos em unidades arbitrárias.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Parte I –GERAÇÃO DAS LINHAGENS DE hiPSC

5.1 SELEÇÃO DOS PACIENTES

A filtragem foi realizada no banco de dados do ELSA Brasil, na busca dos pacientes com as características restritas para este trabalho. Dentre as 1800 amostras de MNC congeladas em nosso laboratório (TOFOLI et al., 2016), identificamos e selecionamos um número amostral de 3 pacientes por grupo de

normotensos, hipertensos responsivos e hipertensos resistentes, sendo os hipertensos resistentes aqueles que ingeriam 3 ou mais medicamentos anti-hipertensivos (LOTUFO et al., 2015).Foram selecionados indivíduos homens, acima de 50 anos, com IMC menor que 35 e não diabéticos, com intuito de remover vieses experimentais que pudessem ser relacionados a: 1) sexo – para eliminar grandes alterações vinculadas ao ciclo hormonal ocorrido em mulheres; 2) idade – para considerar o aparecimento da doença na sua forma tardia; 3) IMC – para obtermos indivíduos com biotipo físico semelhante; 4) não diabéticos – para desvincularmos à hipertensão como causa secundária desta doença endócrina. Além destas, para os hipertensos também levamos em consideração os medicamentos mais utilizados clinicamente (VONGPATANASIN, 2014): diuréticos, bloqueadores do receptor de angiotensina II, inibidores de ECA, bloqueador de canais de cálcio e beta bloqueadores (Tabela 4).

Tabela 4. Características clínicas dos pacientes ELSA- Brasil.

Características									Tratamento					
hiPS	Classificação	Sexo	Idade	IMC	Diabetico	PAS	PAD	Qtd	Diuretico	Bloq. de receptor Ang II	iECA	Bloq. de Canal de Ca	Beta bloq	Outros
55	Resistente	M	53	27	Não	189	92	3	Sim	-	-	Sim	Sim	-
56	Resistente	M	65	24	Não	191	96	3	-	-	-	Sim	Sim	Sim
59	Resistente	M	70	30	Não	141	85	3	Sim	-	Sim	Sim	-	-
60	Responsivo	M	66	25	Não	124	70	1	Sim	-	-	-	-	-
28	Responsivo	M	53	27	Não	110	69	2	Sim	-	Sim	-	-	-
57	Responsivo	M	68	31	Não	131	82	1	Sim	-	-	-	-	-
58	Normotenso	M	63	24	Não	139	86	0	-	-	-	-	-	-
61	Normotenso	M	52	28	Não	126	81	0	-	-	-	-	-	-
62	Normotenso	M	74	32	Não	128	71	0	-	-	-	-	-	-

Abreviações: M- masculino; IMC – Índice de Massa Corpórea; PAS – Pressão Arterial Sistólica); PAD – Pressão Arterial Diastólica; Qtd- quantidade; Bloq – bloqueadores; Ca – Cálcio; iECA – inibidores de ECA.

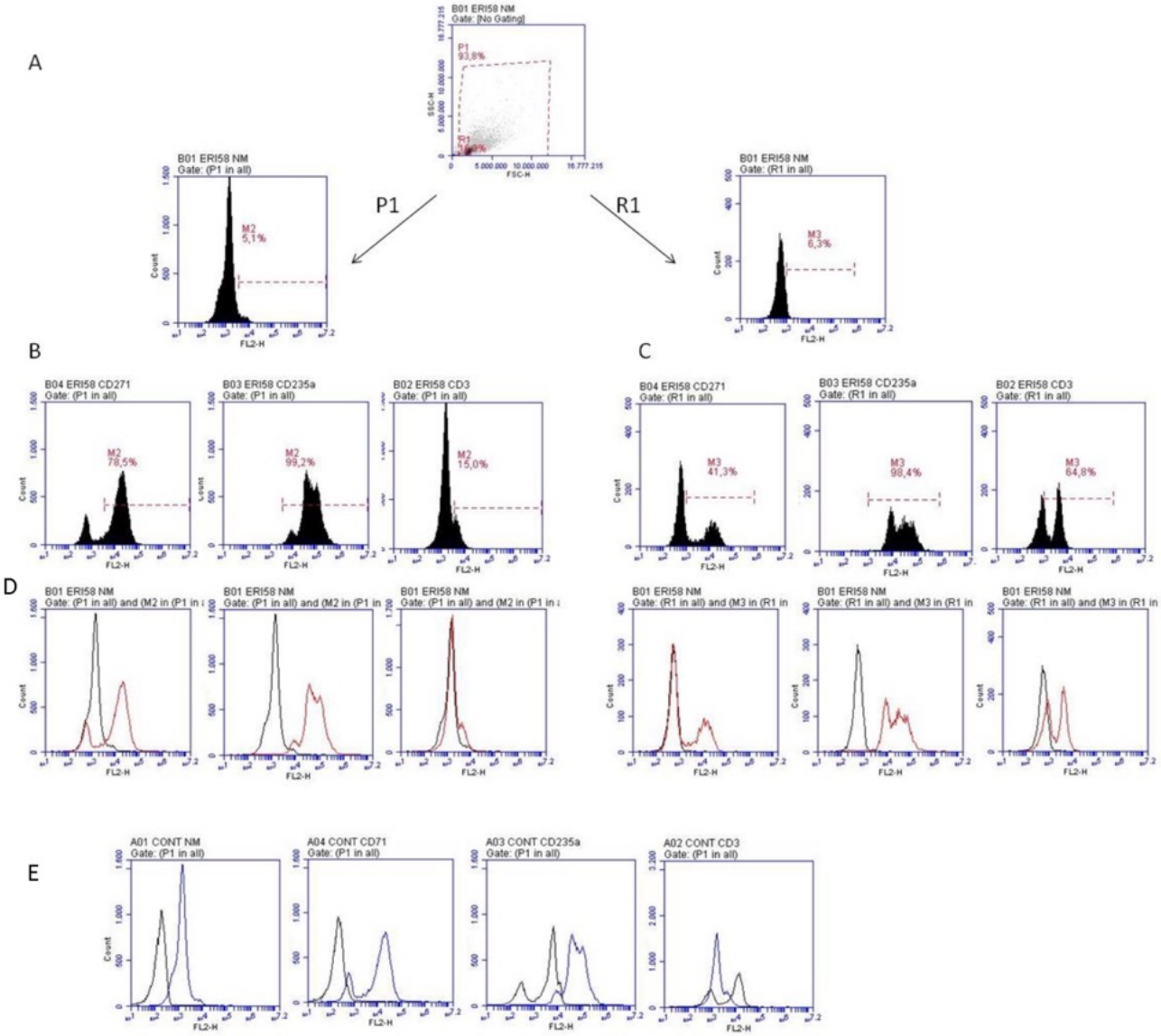
5.2 GERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE hiPSC

Em nosso laboratório previamente já haviam sido reprogramadas células de pacientes do ELSA-Brasil, sendo que destes apenas 1 se encaixava nas características requeridas para este projeto. Portanto, foi necessário reprogramar mais 8 amostras do banco.

As MNCs foram descongeladas e cultivadas por 12 dias para expansão de eritroblastos. Avaliamos a identidade das células pré e pós-cultivo por citometria

de fluxo utilizando anticorpos contra CD71(marcador de eritrócito), CD3 (marcador de linfócito) e CD235a (marcador de eritrócito) (Figura 6).

Figura 6. Citometria de fluxo após cultivo e expansão de eritroblastos.



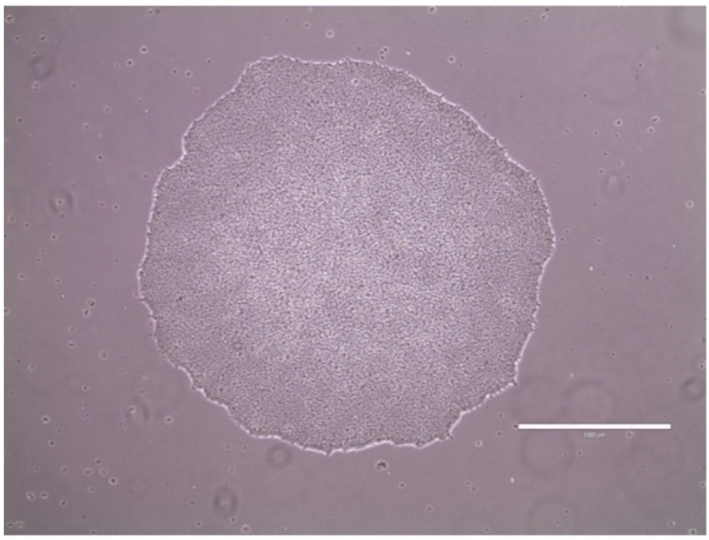
Foram utilizados anticorpos para eritroblastos (CD71 e CD235a) e linfócitos (CD3). **A.** Dotplot de FSC vs SSC mostrando o tamanho e granulosidades das células. P1: gate delimitando toda população celular exceto *debris*; R1: gate delimitando a população que foi identificada com padrão de tamanho e granulosidade e que, poderiam não ser eritroblastos e sim linfócitos remanescentes na cultura. **B.** marcação positiva pra CD71 e CD235a; baixa marcação de linfócitos. **C.** Alta marcação de CD3. D: sobreposição de gráficos comparando uma linhagem controle MNC (preto) com a linhagem de Eritroblasto 58 (vermelho). **E.** Sobreposição dos histogramas para os eventos de P1 em relação aos marcadores CD71, CD235a e CD3, no dia do descongelamento (preto) vs após 12 dias de expansão de eritroblastos (azul)

Obtivemos marcação positiva de mais de 70% para os dois anticorpos de eritroblastos (CD235a e CD71) e baixa marcação de linfócitos –15% (CD3)

(figura 6B). Sendo as amostras de eritroblastos proveniente de uma população de MNCs, é esperado que ainda tenham outros tipos celulares remanescentes na cultura, ainda que em menores quantidades. Dentro da população geral (*gate* P1) apenas 15% das células expressam CD3 o marcador de linfócitos, mas dentro do *gate* R1 observa-se como 60% das células com marcação positiva para linfócito T (CD3). Os gráficos na Figura 6-D representam a sobreposição dos histogramas de autofluorescência basal (A) com os das respectivas marcações (B e C). Em (E) é mostrada a sobreposição dos histogramas para os eventos de P1 em relação aos marcadores CD71, CD235a e CD3, no dia do descongelamento (MNCs) (preto) vs após 12 dias de expansão de eritroblastos (azul), como pode ser observado os 12 dias de cultivo em meio de expansão favoreceu o crescimento de eritroblastos.

Nós nos baseamos na estratégia descrita por CHOU et al., 2011para a geração de hiPSCs com vetor epissomal com algumas modificações (TOFOLI et al., 2016). Os eritroblastos foram transfectados com 3 plasmídeos (MBX; MOS; MMK - Addgene®) contendo um total de 4 fatores de reprogramação (*Oct4, Sox2, Myc e KLF4*) e 1 inibidor de apoptose (BCL2). As células foram transferidas para placas com MEFs (do inglês, *Mouse EmbrionaryFibroblast* - fibroblastos fetais murinos) e/ou Geltrex, e, após 12 dias de cultura em meio E8, obtivemos colônias com morfologia esperada para Célula Tronco pluripotente (Figura 7).

Figura 7. Morfologia de colônias de hiPSC.



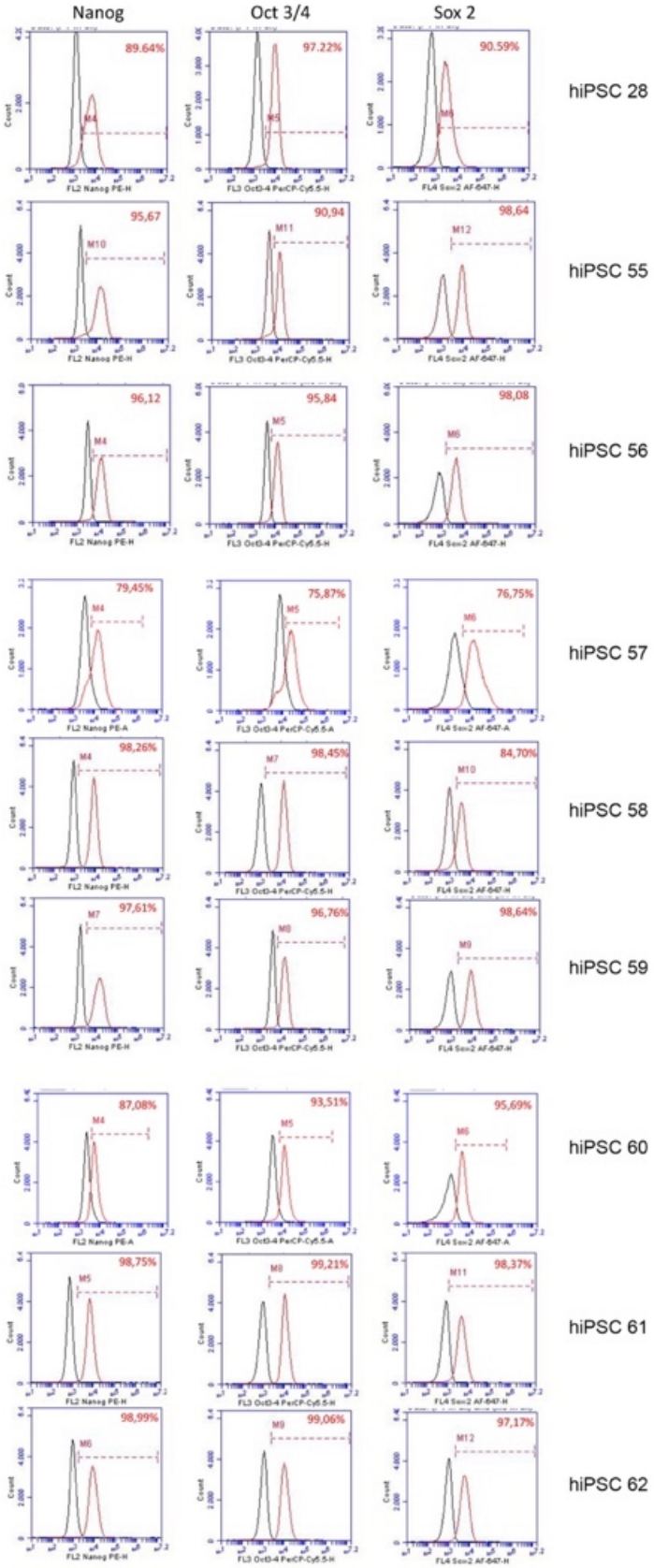
Microscopia de luz transmitida de uma colônia da hiPSC 56, na terceira passagem após a nucleoporação, foto representativa das colônias obtidas na reprogramação dos 8 hipertensos

pertencentes ao ELSA-Brasil, reprogramadas para este projeto. Imagem feita antes do congelamento em um aumento de 40x da lente objetiva.

As colônias foram combinadas em um *pool*, expandidas e caracterizadas quanto à expressão de marcadores de pluripotência por citometria de fluxo (Figura 8) e imunofluorescência (Figura 9), teste de micoplasma (tabela 5), não integração do vetor epissomal (Figura 10), capacidade de formação de Corpos Embrióides (Figura 11 e 12), integridade cromossômica (tabela 6) e análise de controle de qualidade através da metodologia de identidade por *fingerprint* de STR (*Short Tandem Repeat*) (Figura 13).

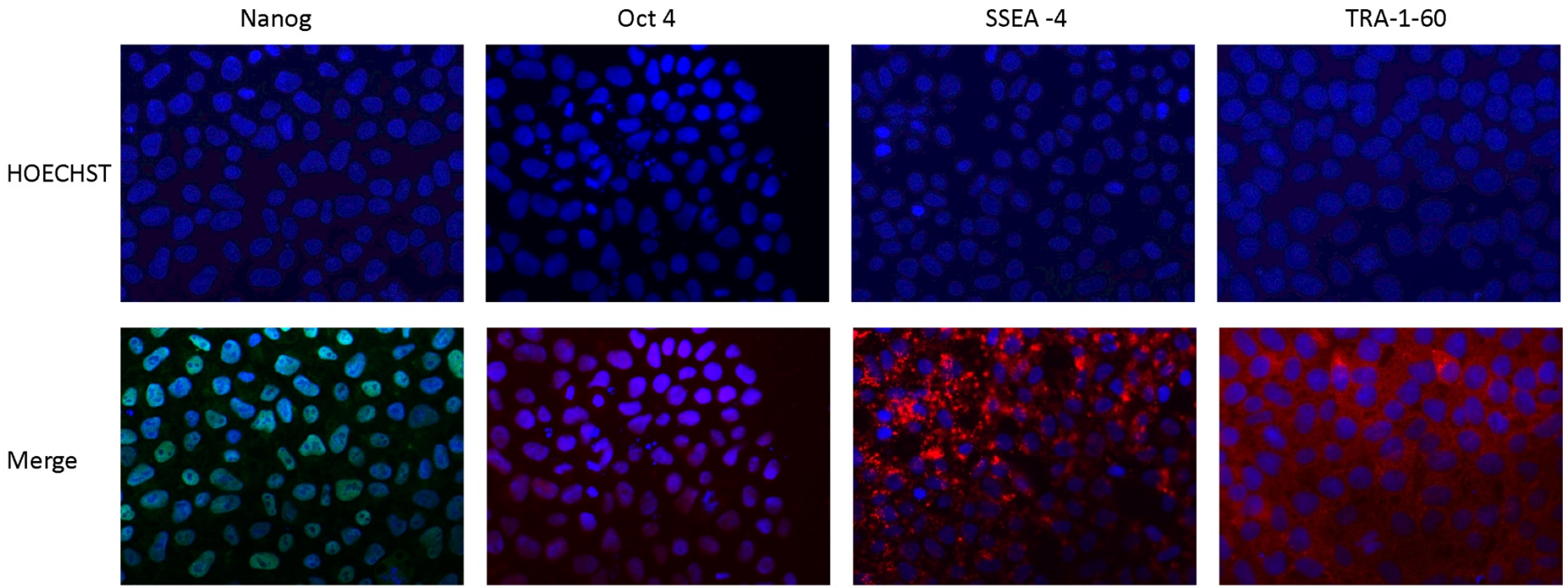
Na análise da expressão de marcadores de pluripotência por Citometria de Fluxo obtivemos mais de 80% de marcação para Nanog, Oct3-4 e Sox2, conforme demonstrado nos histogramas referente na figura 8. Esta é uma análise quantitativa, sendo assim, para complementar realizamos também análise de marcadores de pluripotência por imunofluorescência (Figura 9). Esta se refere a avaliação da expressão destes marcadores em relação à localização celular e, desta forma, observamos a expressão nuclear de Nanog e Oct4 e a expressão citoplasmática de SSEA-4 e TRA-1-60, conforme esperado. As técnicas se complementam e certificam a eficiência da reprogramação destas linhagens.

Figura 8.Caracterização das hiPSC por Citometria de Fluxo.



Citometriade fluxo das 9 amostras reprogramadas, usando o Kit de Pluripotência(#BD-560589) para os anticorpos: Nanog; Oct3-4; Sox2. Em vermelho, gráfico mostrando a população celular que expressa os marcadores em relação ao isotipo controle do próprio kit (gráfico preto).

Figura 9. Caracterização das hiPSC por Imunofluorescência.



Imunofluorescência da hiPSC 62, representativa das amostras reprogramadas, usando o os anticorpos Nanog (nuclear – em verde), Oct4 (nuclear – em vermelho), SSEA-4 (citoplasmático – em vermelho) e TRA-1-60 (citoplasmático – em vermelho).

O teste para avaliar contaminação por micoplasma foi negativo (razão com valores <1), confirmando que todas as linhagens utilizadas no estudo estavam livres deste contaminante.

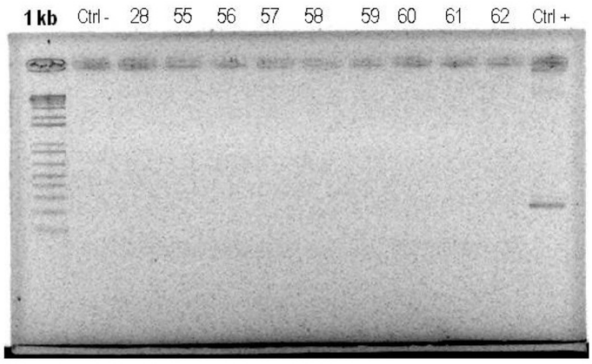
Tabela 5. Resultados do teste de contaminação por micoplasma.

Amostra	A	B	Ratio
Ctrl +	4,87	2166,44	444,3
Ctrl -	15,79	1,009	0,06
iPS 28	26,69	5,59	0,2
iPS 55	23,4	10,3	0,44
iPS 56	22,7	8,19	0,36
iPS 57	5,12	1,29	0,25
iPS 58	51,6	9,8	0,19
iPS 59	15,9	3,89	0,24
iPS 60	26,03	6,3	0,24
iPS 61	28,6	7,38	0,26
iPS 62	18,8	6,13	0,33

A e B: absorbâncias lidas através do Luminômetro GloMax (Promega) conforme recomendações do Kit Lonza MycoAlert #LT07-710.

Uma questão importante de ser avaliada durante a geração de hiPSC é a não integração no genoma dos vetores com os genes de reprogramação nuclear, utilizados durante a nucleoporação dos eritroblastos. Para isso, utilizamos a técnica de PCR convencional com o *primer* EBNA1 específico para o *backbone* dos vetores utilizados, MBX, MOS e MMK. Foi extraído DNA das linhagens entre a 10ª e 12ª passagem, e a partir destas amostras comprovamos que não havia indícios da integração dos plasmídeos, conforme demonstrado na figura 10.

Figura 10. PCR para avaliação da integração dos vetores de reprogramação.



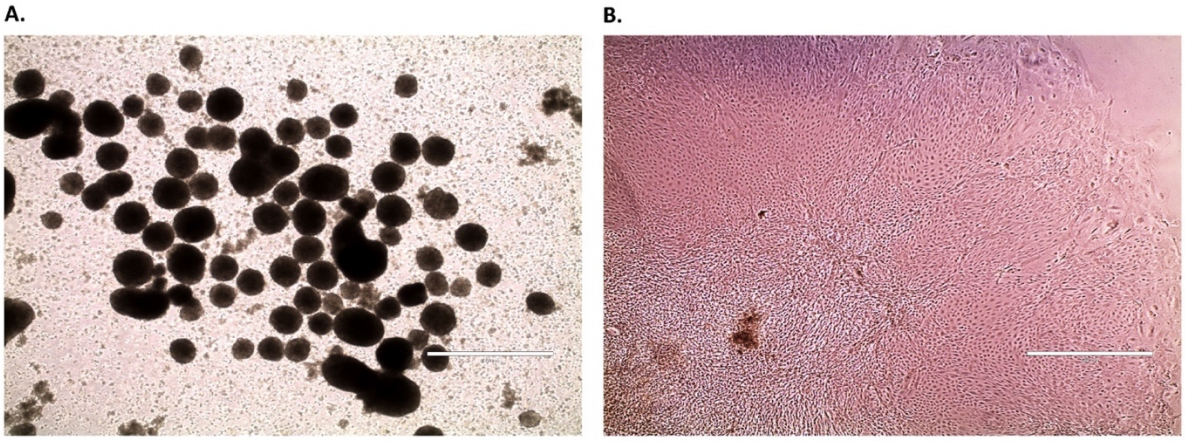
PCR convencional para a detecção de fragmentos dos plasmídeos usados durante a nucleoporação. Para todas as linhagens foi utilizado 50ng de DNA na reação. O produto

amplificado foi corado durante 30 minutos em Brometo de Etídeo e visualizado em Gel de Agarose 3%. Como controle positivo da reação foi utilizado o plasmídeo MBX; como controle negativo foi utilizada a mesma H_2O Milli-Q da reação de PCR.

Além da expressão dos marcadores outra análise importante para atestar a pluripotência se refere a capacidade de diferenciação das hiPSC em células derivadas dos 3 folhetos embrionários (Ectoderma, Mesoderma e Endoderma).

Na figura 11, é possível notar a formação espontânea de estruturas embrióides (Figura 11A), assim como também é possível observar após 15 dias de cultivo a diferenciação espontânea em diferentes tipos celulares (Figura 11B). Esta análise morfológica se completa com a avaliação da expressão gênica de genes de auto-renovação, que é uma característica de células pluripotentes e genes importantes para manutenção dos três folhetos embrionários por PCR quantitativo em tempo real (Figura 12). No 15º dia o RNA total dos corpos embrióides é extraído, reversamente transcrito e utilizado num painel de expressão (*Scorecard* – item 4.11 de Material e Métodos) de 96 genes representativos dos 3 folhetos embrionários e genes de pluripotência. O intuito deste teste é verificar se as linhagens são capazes de se diferenciar nas células representativas dos 3 folhetos e ainda, se possuem tendência a se diferenciarem em algum tipo celular específico. Na Figura 12 observa-se um gráfico de expressão gênica de todas as linhagens utilizadas onde as cores representam a razão de expressão do gene indicado em relação a um controle referência indiferenciado.

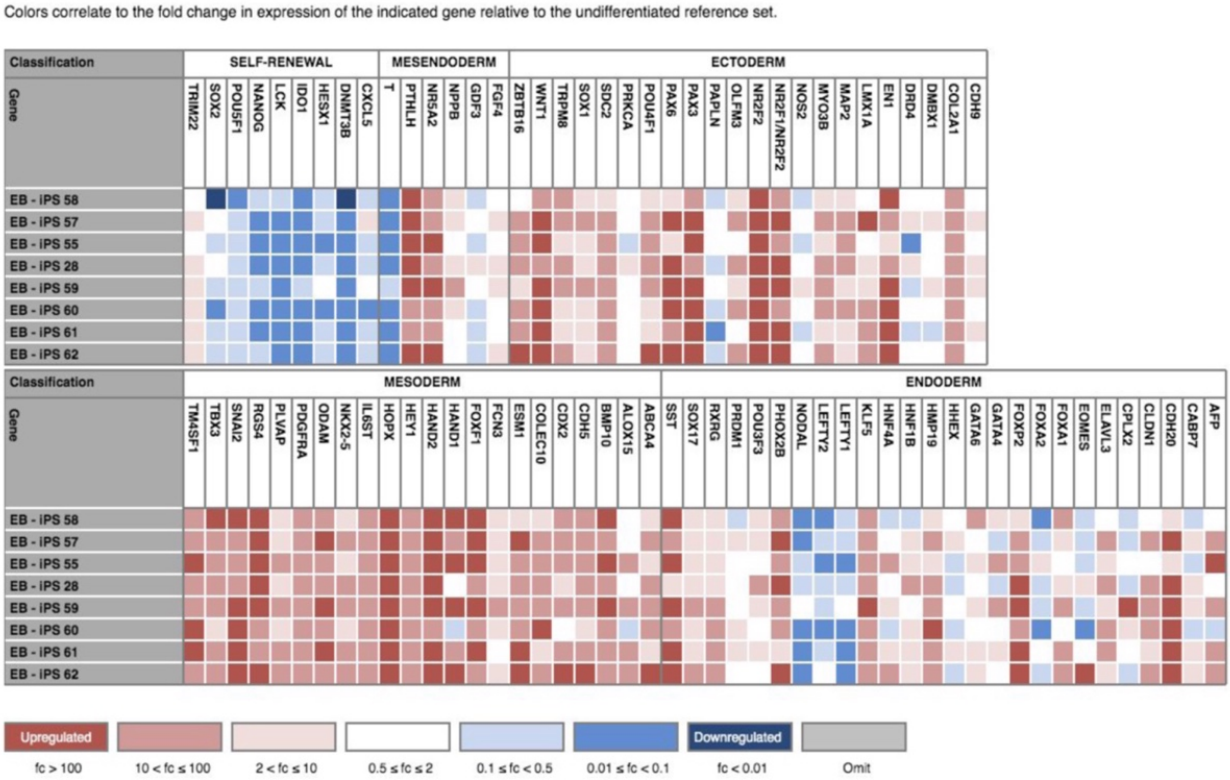
Figura 11. Diferenciação de corpos embrióides.



Ensaio para a formação de corpos embrióides para avaliação da capacidade de diferenciação espontânea nos três folhetos germinativos (Ectoderme, Mesoderme e Endoderme). **A.** formação

de corpos embrióides em suspensão, referentes a hiPSC 58. **B.** Diferenciação espontânea durante 15 dias após adesão em Gelatina 0.1% dos corpos embrióides da figura A.

Figura 12. ScoreCard para avaliar a expressão de marcadores de diferenciação.



Painel "*TaqMan hPSC Scorecard Panel 384w"* com 96 genes associados com os 3 diferentes folhetos embrionários, assim como a capacidade de auto-renovação. Expressão quantificada através de PCR quantitativo em tempo real e analisada pelo *hPSC ScoreCard Analysis Software*, disponível em www.lifetechnologies.com/scorecarddata

Seguindo com a caracterização destas linhagens, um ponto importante a se considerar é a integridade cromossômica de linhagens celulares cultivadas *in vitro.* Sabe-se que o cultivo de linhagens a longo prazo pode gerar espontaneamente aberrações cromossômicas indesejáveis (TURINETTO; ORLANDO; GIACHINO, 2017). Tratando-se de um trabalho que leva em consideração o perfil genético dos pacientes utilizados, é de extrema importância garantir que estas células foram capazes de se manterem íntegras em relação ao seu perfil cromossômico. Para isto, analisamos através do Kit hPSC Genetic Analysis as principais anomalias cromossômicas encontradas em hiPSC e detectamos que todas as linhagens utilizadas neste trabalho apresentavam perfil considerado normal (Tabela 6).

Tabela 6. Integridade cromossômica por qRT-PCR.

Sample	Sex	Status
28	Male	Normal (Sex Difference)
55	Male	Normal (Sex Difference)
56	Male	Normal (Sex Difference)
57	Male	Normal (Sex Difference)
58	Male	Normal (Sex Difference)
59	Male	Normal (Sex Difference)
60	Male	Normal (Sex Difference)
61	Male	Normal (Sex Difference)
62	Male	Normal (Sex Difference)

Análise obtida pelo site: www.stemcell.com/geneticanalysisapp

Além destas metodologias de caracterização mencionadas anteriormente, um fator importante para laboratórios que utilizam linhagens celulares é a comprovação da identidade celular dessas linhagens, baseado em assinaturas genéticas. O *International Cell Line Authentication Committee* (ICLAC) validou diferentes metodologias para garantir a autenticidade dos dados baseados em estudos que utilizassem quaisquer linhagens celulares. Uma destas foi análise de perfil por microssatélite. Em nosso laboratório nós padronizamos a identidade de nossas linhagens hiPSC utilizando análise por *Short-Tandem Repeat* (SARAFIAN et al., 2018).

Sendo assim, comparamos o DNA de cada hiPSC gerada com o DNA extraído das MNCs do respectivo paciente. Para todas as linhagens referentes a este estudo comprovamos que não houve troca ou contaminação cruzada entre linhagens, conforme exemplificado na figura 13.

Figura 13. Análise de identidade por STR.

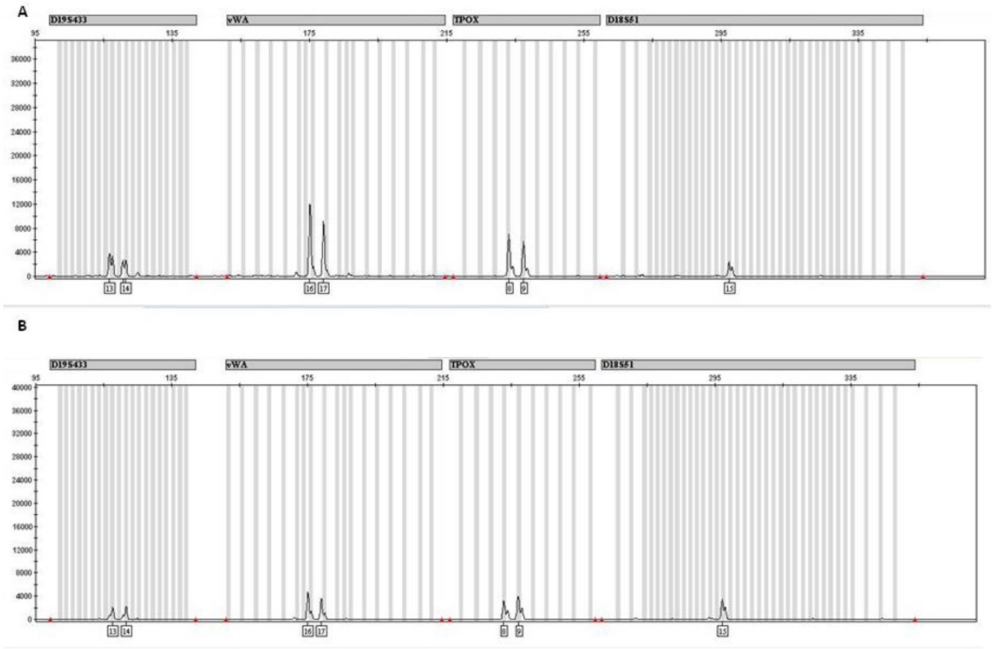


Figura demonstrando a comparação do padrão de STR encontrado na hiPSC 60 (**A**) com o padrão observado na sua respectiva MNC (**B**). Na imagem foi demonstrado 4 marcadores (D19S433 ; vWA; TPOX; D18S51) dos 16 presentes no Kit (Thermo-Fisher #A26182); Cada pico no histograma demonstra a quantidade de repetições do microssatélite em cada alelo da amostra. O genótipo completo de todas as linhagens encontra-se no APÊNDICE B.

5.3 FENOTIPAGEM PARA ESTUDO DA HIPERTENSÃO

Um grande desafio no uso de hiPSCs para modelagem de doenças *in vitro* é a identificação de fenótipos celulares associados à doença. Assim, avaliamos a expressão de genes relacionados à hipertensão nas hiPSCs

Sabe-se que o estresse oxidativo pode levar ao remodelamento do miocárdio não adaptativo e insuficiência cardíaca, alterando funções como contratilidade dos cardiomiócitos e modificando importantes proteínas da maquinaria de excitação e contração, incluindo os canais de cálcio tipo L, canais de sódio, canais de potássio e translocadores sódio-cálcio (VAN DER POL et al., 2019). Baseado nessas informações, foram selecionados 20 genes que fazem parte de importantes processos moleculares e que já são bem caracterizados por estarem alterados dentro de um cenário hipertenso como transporte de íons, inflamação, progressão do ciclo celular, sistema antioxidante, entre outros (Tabela 7).

Analisando uma linhagem de cada grupo, observamos que os genes relacionados com a patologia, como transportadores de Cálcio (*TRPM2, CACNA1A*), antioxidantes (*CAT*,*SOD1, SOD2, PrDx, GPx1*), receptores de endotelina – importante via de ativação de estresse oxidativo - (*ETA, ETB*), alteração no ciclo celular (*P53, P21, P27*), resposta inflamatória (*TNF-a, VWF*), resposta imune (*TLR3, TLR4*) e proteínas do citoesqueleto (*ACTA1*, *VIM*) mostraram uma maior expressão nas hiPSC dos hipertensos em relação ao normotenso, apesar de não significativo (Figura 14). Em contraste, genes relacionados com o transporte de magnésio (*MAGT1, TRPM7*), que não possuem ação direta importante no microambiente celular hipertenso, não apresentaram a mesma tendência dos mencionados anteriormente. Isso sugere que hiPSCs de hipertensos expressam de maneira diferente genes relacionados a processos moleculares importantes para manutenção da hipertensão, enquanto outros genes não relacionados com a doença são expressos de forma semelhante em células derivadas de indivíduos hipertensos e normotensos (Figura 15).

Tabela 7. Genes selecionados para fenotipagem relacionada à hipertensão.

Gene		Categoria	Função relevante para a hipertensão	Referência NCBI
Sigla	Nome			Gene ID
CACNA1A	Calcium voltage-gated channel subunit alpha-1	Transportadores de Cálcio	Contração de fibras musculares.	773
TRPM2	Transient Receptor Potential cation channel subfamily M member 2		Proteína codificada é ativada por estresse oxidativo.	7226
TNF-∝	Tumor Necrosis Factor	Resposta Inflamatória	Proliferação, diferenciação e apoptose celular, metabolismo lipídico e coagulação.	7124
VWF	Von Willebrand Factor		Adesão de plaquetas a locais de lesão vascular e no transporte de várias proteínas no sangue.	7450
TLR3	Toll like receptor 3	Resposta Imune	Fundamental no reconhecimento de patógenos e na ativação da imunidade inata; Induz a ativação do NF-kappa-β.	7098
TLR4	Toll like receptor 4		Reconhecimento de patógenos e na ativação da imunidade inata; Eventos de transdução de sinal induzidos por lipopolissacarídeos (LPS).	7099
P21	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A	Alteração no ciclo celular	Regulador da progressão do ciclo celular em G1; Papel regulador na replicação do DNA e reparo do dano ao DNA.	1026
P53	Tumor Protein		Proteína que responde à estresse induzindo parada do ciclo celular, apoptose, senescência, reparo de DNA ou mudanças no metabolismo.	7157
P27	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1B		Controle da diferenciação e divisão celular	1027

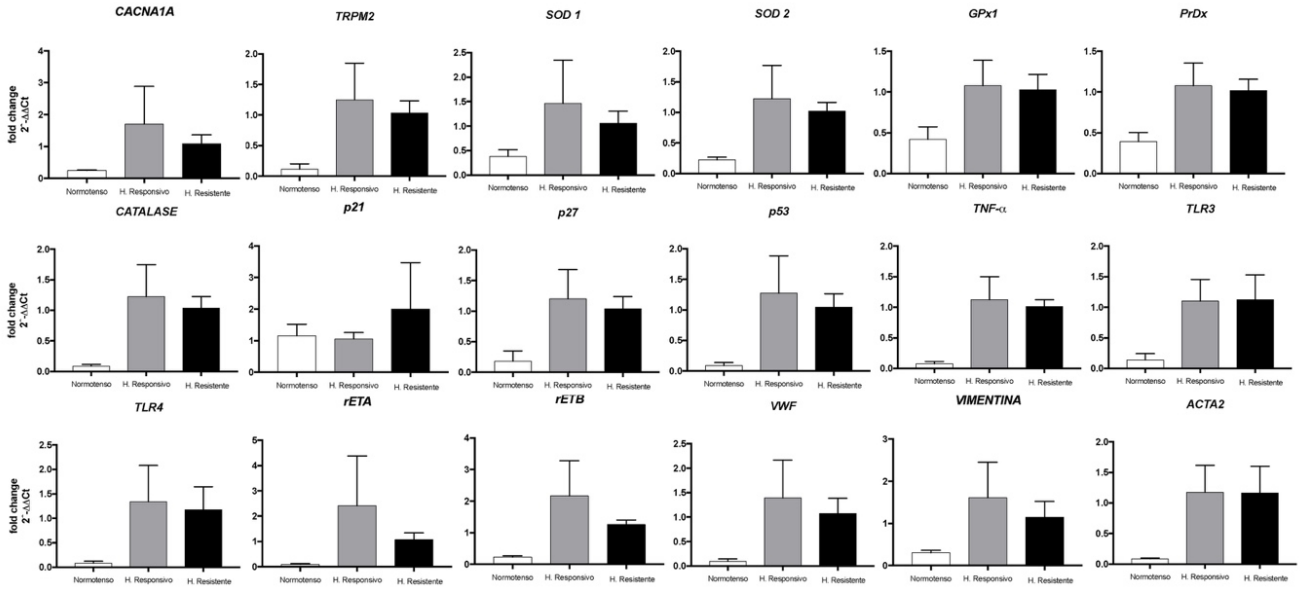
Continua:

Continuação:

Gene		Categoria	Função relevante para a hipertensão	Referência NCBI
Sigla	Nome			Gene ID
ACTA1	Actin Alpha 1	Citoesqueleto	Papel na motilidade, estrutura e integridade das células; Principal constituinte do aparato contrátil.	58
VIM	Vimentin		Manter a forma e a integridade celular do citoplasma; estabilizar as interações do citoesqueleto; organizador de proteínas para fixação, migração e sinalização celular.	7431
CAT	Catalase	Anti-oxidantes	Enzima chave na defesa dos corpos contra o estresse oxidativo	847
SOD1	Superoxide Dismutase 1		Enzima que degrada radicais superóxido	6647
SOD2	Superoxide Dismutase 2		Enzima que se liga a subprodutos de superóxido da fosforilação oxidativa e os converte em H2O2 e oxigênio diatômico.	6648
GPX1	Glutathione Peroxidase 1		Catalisa a redução de hidroperóxidos orgânicos e H2O2 pela glutationa.	2876
PRDX1	Peroxiredoxin 1		Reduz o H2O2 e hidroperóxidos de alquila	5052
ETA	Endothelin Receptor Type A	Indução de Estresse Oxidativo	Receptores para Endotelina-1 (papel na vasoconstrição potente e de longa duração)	1909
ETB	Endothelin Receptor Type B			1910
MAGT1	Magnesium Transporter 1	Transportadores de Magnésio	Proteína transportadora de cátion de magnésio	84061
TRPM7	Transient Receptor Potential cation channel subfamily M member 7		Receptores de canais iônicos; Regular a homeostase dos íons de magnésio;	54822

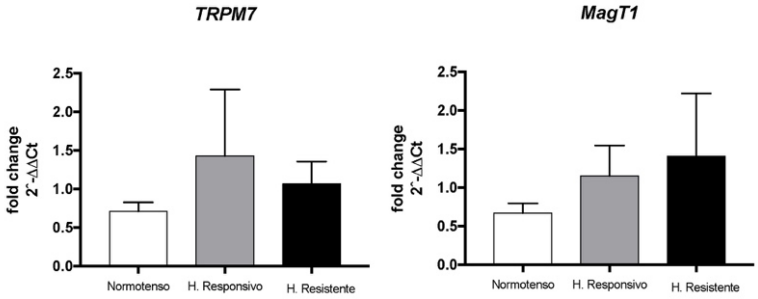
Abreviações: H_2O_2 – Peróxido de hidrogênio; NCBI – *National Center for Biotechnology Information.*

Figura 14. Expressão relativa por qRT-PCR de genes relacionados com a Hipertensão em hiPSC.



Expressão relativa por qRT-PCR quantitativo em tempo real para genes relacionados com a manutenção da patologia. Gráfico branco: normotenso; gráfico cinza: Hipertenso Responsivo; gráfico preto: Hipertenso Resistente. A razão de expressão foi calculada através do método ΔΔCt;). N=1/ grupo, triplicatas experimentais

Figura 15. Expressão relativa por qRT-PCR de genes relacionados com o transporte de Magnésio em hiPSC

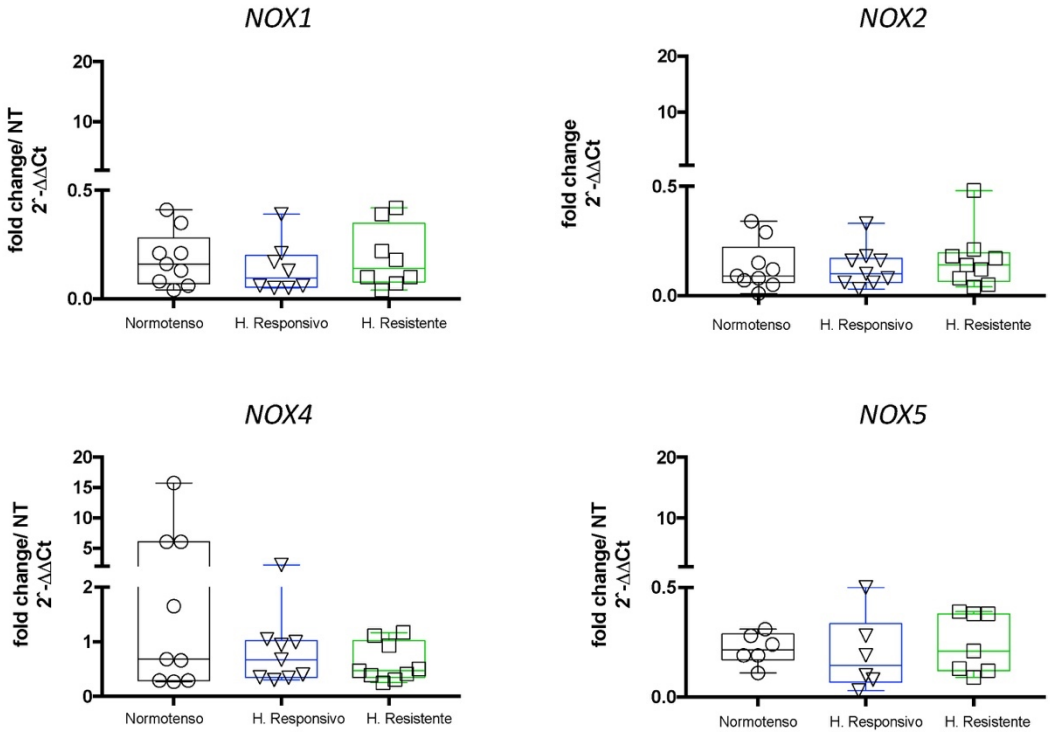


Expressão relativa por qRT-PCR quantitativo em tempo real para genes relacionados com o transporte de magnésio, TRPM7 e MagT1, que não estão relacionados com a Hipertensão. Gráfico branco: normotenso; gráfico cinza: Hipertenso Responsivo; gráfico preto: Hipertenso Resistente. A razão de expressão foi calculada através do método ΔΔCt;). N=1/ grupo, triplicatas experimentais.

Seguindo com esta estratégia, avaliamos nas hiPSCs a expressão gênica e proteica (Figuras 16 e 17, respectivamente) das NOXes, foco deste trabalho. Não houve diferença significativa entre as células derivadas de indivíduos normotensos e hipertensos. Esse padrão pode ter relação com o fato de que essas enzimas possuem atividade vinculada à função de tipos celulares diferenciados específicos e não se sabe ao certo o papel que as NOXes

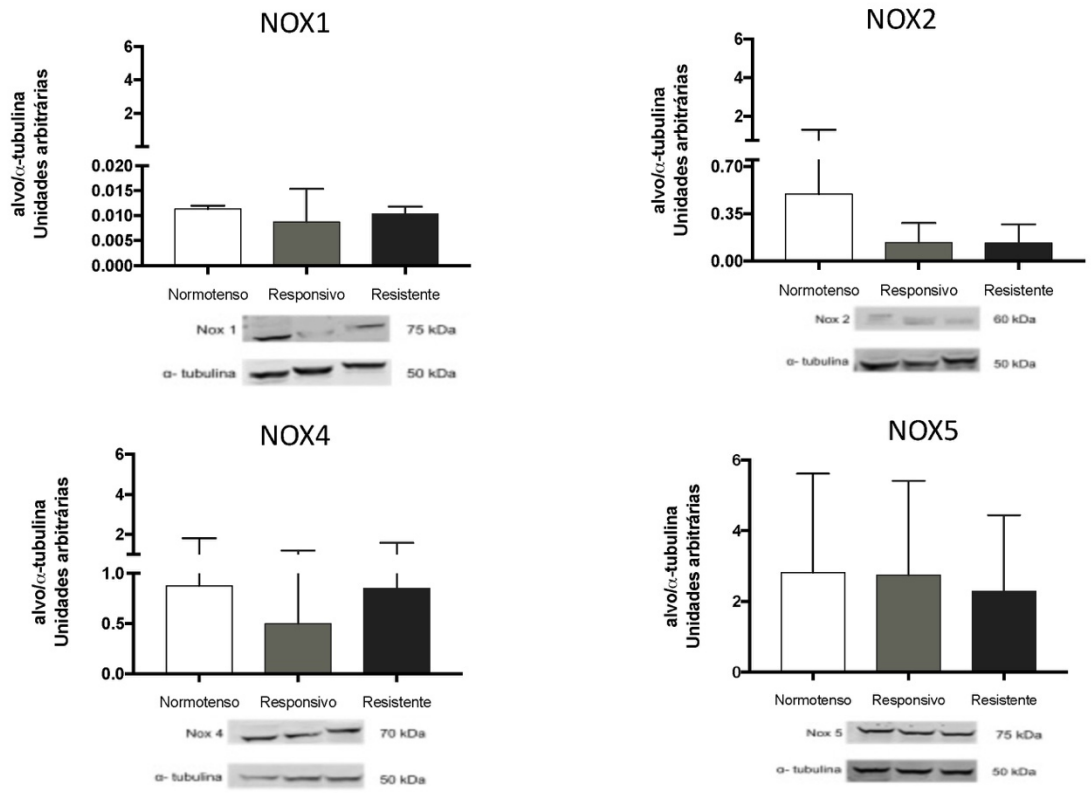
desempenham no início do desenvolvimento embrionário, condição em que as hiPSC se encontram.

Figura 16. Expressão dos genes das *NOXes* em hiPSC.



Expressão relativa por qRT-PCR quantitativo em tempo real para os genes das *NOX1,2,4* e *5* nas hiPSCs. A razão de expressão foi calculada foi calculado através do método ΔΔCt; triplicatas amostrais e experimentais para cada grupo (normotensos, hipertensos responsivos e resistentes). N=3/ grupo, triplicatas experimentais

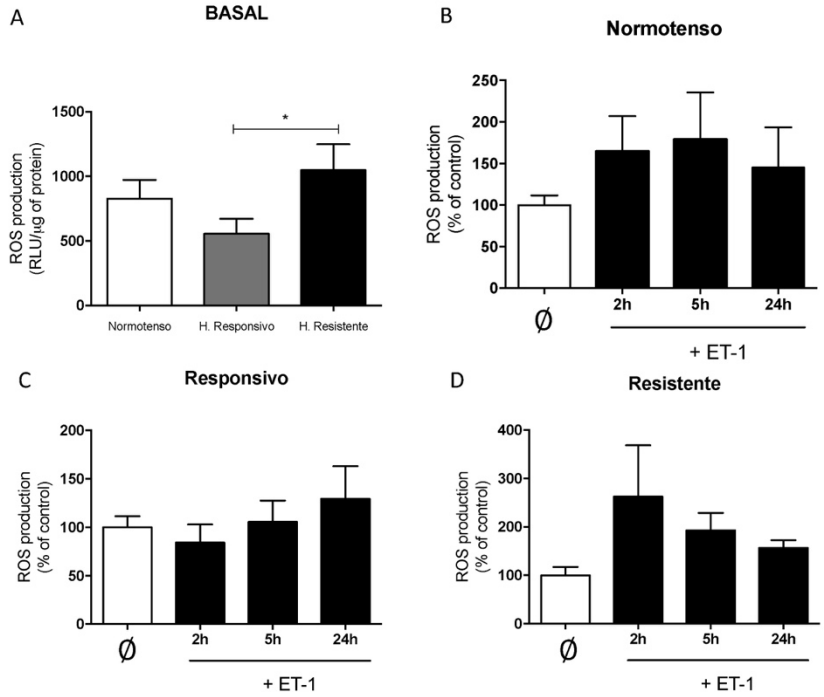
Figura 17. Expressão proteica das NOXes em hiPSC.



Quantificação proteica das NOXes nas hiPSC indiferenciadas. Valores medidos através do software *Licor Values*, normalizados por α-tubulina. Valores plotados em unidades arbitrárias. N=1/ grupo, triplicatas experimentais

Além deste, nestas mesmas linhagens, realizamos a quantificação de ROS derivado de NADPH, através do ensaio de lucigenina (Figura 18). A lucigenina é uma sonda quimioluminescente utilizada para indicar a presença de radicais superóxidos gerados endógenamente nas células. Essa abordagem pode ser usada para investigar a geração natural dessas espécies, bem como o funcionamento natural das enzimas responsáveis pelas vias desses radicais. Além de indicar a presença de radicais nas células, a lucigenina mostra interação com as enzimas oxidorredutase ativas, como as NOXes.

Figura 18. Quantificação da produção de ROS dependente de NADPH-oxidase pelo ensaio de Lucigenina.



Quantificação da produção de ROS na ausência e presença de estímulos longos com ET-1(10uM) por 2h, 5h e 24h. **A.** Nível basal de produção de ROS durante 24 horas; **B.** Produção de ROS na amostra de normotenso. **C.** Produção de ROS na amostra de hipertenso responsivo. **D.** Produção de ROS na amostra de hipertenso resistente. N=1/ grupo, triplicatas experimentais.

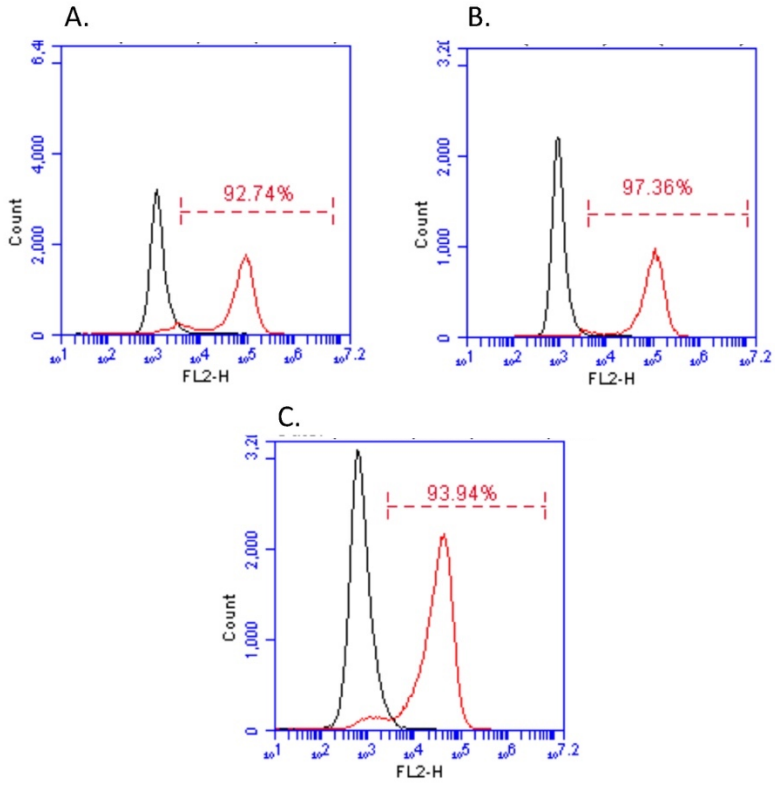
O interessante neste resultado, foi observar que ainda em condições basais, isto é, na ausência de estímulos, a amostra de Hipertenso Resistente (HResist) produz significativamente mais ROS do que a de Hipertenso Responsivo (HRespons) (Figura 18-A), o que nos leva a pensar que mesmo antes de qualquer diferenciação celular, as células desses indivíduos já possuem níveis de ROS que os diferenciam dos outros grupos. Outro ponto importante de se notar é que, ao estimularmos essas células com ET-1 por 2, 5 e 24h, essas demonstraram uma dinâmica de resposta distinta umas das outras. No Normotenso há uma tendência a uma resposta rápida nas primeiras 5h, com aumento gradativo, tendendo a diminuir novamente em 24h (Figura 18-B), o esperado para o ciclo de geração de ROS em condições não patológicas (DRÖGE, 2002). No entanto, quando comparamos o HRespons e HResist, pode-se notar que esses apresentaram respostas distintas em relação ao estímulo. O HResist parece ter uma resposta maior e mais rápida para a geração de ROS,

enquanto que o HRespons apresenta um aumento gradativo em relação ao tempo (Figura 18-C e D). Este resultado é curioso, principalmente se lembrarmos que esses dois grupos já se mostravam significativamente diferentes mesmo na ausência de estímulo. Juntamente com os resultados referentes à expressão gênica e proteica discutidos anteriormente, ainda que esses experimentos futuramente necessitem serem repetidos com maior número amostral, os resultados são indicativo de que possivelmente essa biblioteca de linhagens geradas a partir de pacientes hipertensos e normotensos pode ser capaz de reproduzir fenótipos esperados para a doença, e sendo assim, se tornam uma potente ferramenta para estudos *in vitro,* especialmente voltados para o papel do estresse oxidativo no microambiente hipertenso.

5.4 DIFERENCIAÇÃO DE hiPSCs EM CARDIOMIÓCITOS:

Diante dos resultados discutidos no item anterior, as 9 linhagens de hiPSC foram diferenciadas em cardiomiócitos. A eficiência destas diferenciações foi quantificada através da análise da expressão do marcador Troponina-T cardíaca por citometria de fluxo (Figura 19). A Troponina-T cardíaca é considerada um marcador, específico para identificação de cardiomiócitos, pois, é uma proteína que juntamente com outras 2 proteínas (Troponina -I e Troponin C) faz parte da maquinaria responsável pelo processo de contração do músculo cardíaco (PARMACEK; SOLARO, 2004). Para todas as linhagens obtivemos mais de 80% de eficiência de diferenciação cardiomiocítica. Além disto, todos os CM apresentaram contrações rítmicas características dessas células (dados não mostrados).

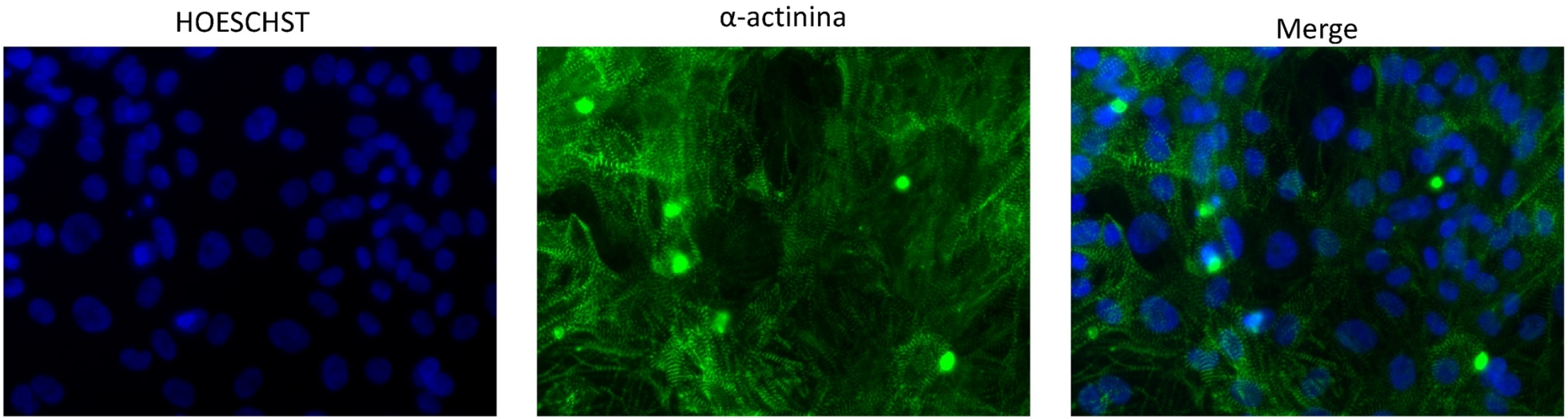
Figura 19. Citometria de fluxo para análise da eficiência da diferenciação cardiomiocítica.



Os painéis de citometria de fluxo mostram expressão de um marcador de cardiomiócitos, cTroponin-T, após indução cardiogênica. O valor indica a porcentagem da população que expressa o marcador (gráfico vermelho) em relação ao seu controle não marcado, em preto. Nesta figura consta 3 linhagens diferentes, representativas dos 3 grupos de pacientes utilizados neste estudo. **A**.hiPS-CM 56 (Hipertenso Resistente) - 92,74% ;**B**.hiPS-CM 60 (Hipertenso Responsivo) – 97,36%; **C.**hiPSC-CM 62 (Normotenso) - 93,94%.

Para complementar a caracterização dos cardiomiócitos derivados de hiPSC, realizamos também imunofluorescência (Figura 20), com anticorpo contra ∝- actinina, uma proteína sarcomérica, estrutura importante para a atividade de contração dos cardiomiócitos (PARMACEK; SOLARO, 2004). É possível observar sarcômeros com padrão regular das bandas de ∝- actinina, distribuídas paralelamente.

Figura 20.Caracterização dos hiPSC-CM por Imunofluorescência.



Imunocitoquímica do hiPS-CM 56, representativo das amostras diferenciadas, usando o os anticorpos anti-∝ actinina (citoplasmática– em verde) e HOECHST (nuclear – em azul).

Diante disto, seguimos com a avaliação das diferenças relacionadas à expressão gênica das *NOXes* em cardiomiócitos derivados de hiPSC nestes 3 grupos de pacientes para desta maneira, validar essas células como potencial modelo para estudos mais aprofundados do papel do estresse oxidativo em manifestações cardíacas da hipertensão.

Parte II – ANÁLISE DE ESTRESSE OXIDATIVO

Uma vez demonstrada a alta eficiência na diferenciação cardiomiocítica nestas linhagens, iniciamos os primeiros testes de estimulação destas células com Endotelina-1 (ET-1). A ET-1 é um peptídeo vasoconstritor bem caracterizado que quando em concentrações superiores aos níveis fisiológicos pode causar alterações que já foram associadas com diversas doenças cardiovasculares, causando danos inclusive no coração durante a hipertensão (BRÁS-SILVA; LEITE-MOREIRA F, 2008). Diante disso, na tentativa de mimetizar o ambiente patológico nas células, estimulamos os cardiomiócitos no 30º dia de diferenciação, durante 5 e 24 horas com 0.1uM de ET-1 e coletamos o RNA para análise de expressão das *NOXes*.

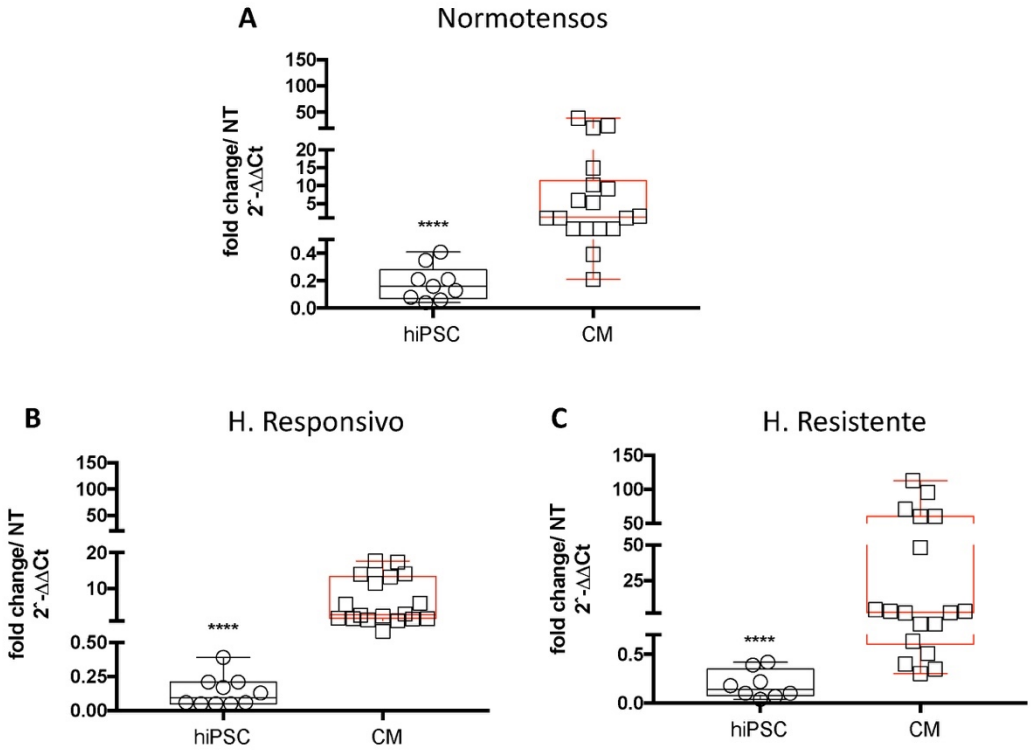
5.5 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DE CARDIOMIÓCITOS DERIVADOS DE hiPSC

Para a análise de expressão gênica das *NOXes* nos cardiomiócitos diferenciados a partir das hiPSC (CM), após 30 dias de diferenciação, coletamos RNAs, conforme esquema representado na figura 5 (Item 4.12), para todas as linhagens deste trabalho. A coleta das triplicatas para as 3 condições (CM sem estímulo e CM estimulado com ET-1 por 5 e 24 horas) se deu separadamente para considerarmos o viés existente entre poços.

Ao observarmos a expressão basal das *NOXes* na ausência de estímulo nos CM, o primeiro ponto interessante de se notar é que houve um significativo aumento de expressão entre os cardiomiócitos em relação às suas respectivas hiPSCs indiferenciadas (Figuras 21, 22, 23 e 24). Este resultado era esperado visto que cardiomiócitos são células que expressam as *NOXes,* corroborando também com o resultado das hiPSC discutido na seção anterior (Figura 16). A

única exceção encontrada foi a *NOX4*, que mostrou um padrão de expressão diferente em cada grupo, e só foi significativamente diferente entre cardiomiócitos e hiPSC nos HRespons, onde a sua expressão nos cardiomiócitos é muito elevada quando comparada à expressão do HResist e do Normotenso (Figura 23). Este resultado chama atenção, pois, a NOX4 pode executar uma atividade protetora, sendo a única NOX presente no sistema cardiovascular que produz peróxido de hidrogênio ao invés de ânion superóxido, o que faz com que a biodisponibilidade de NO seja preservada. Este é um ponto importante a se considerar visto que, na literatura já é bem descrito que a redução da atividade de NO causada por estresse oxidativo é um dos principais mecanismos nos processos relacionados com disfunções cardiovasculares (GOLÇALVES DIAS; NEGRÃO; KRIEGER, 2011). Sendo assim, a expressão aumentada de NOX4 poderia sugerir uma atividade elevada no HRespons, o que poderia ser resultado de uma resposta adaptativa pelo fato de que estes indivíduos conseguem controlar a pressão com o uso de medicamentos.

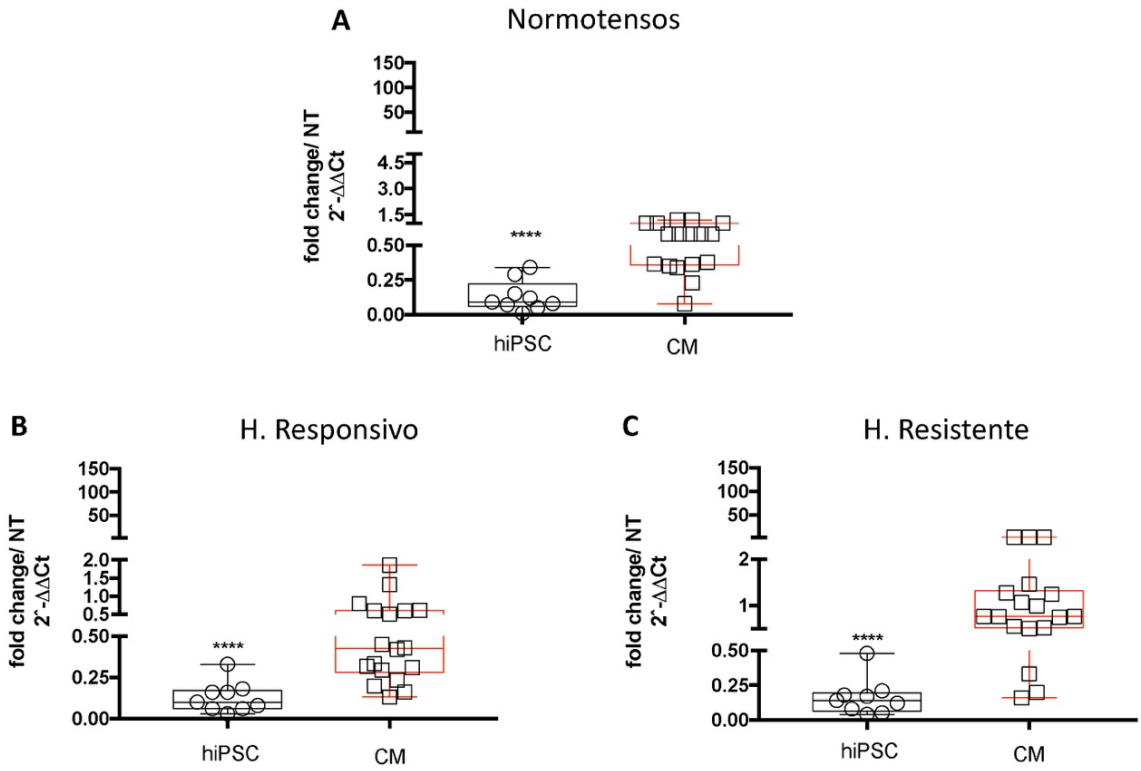
Figura 21. Expressão de *NOX1* em hiPSC e cardiomiócitos.



Expressão de mRNA para *NOX1* (gene alvo/ gene endógeno - HPRT) em condição basal nas hiPSC indiferenciadas vs CM. Foi calculado através do método ΔΔCt **A.** Amostras de

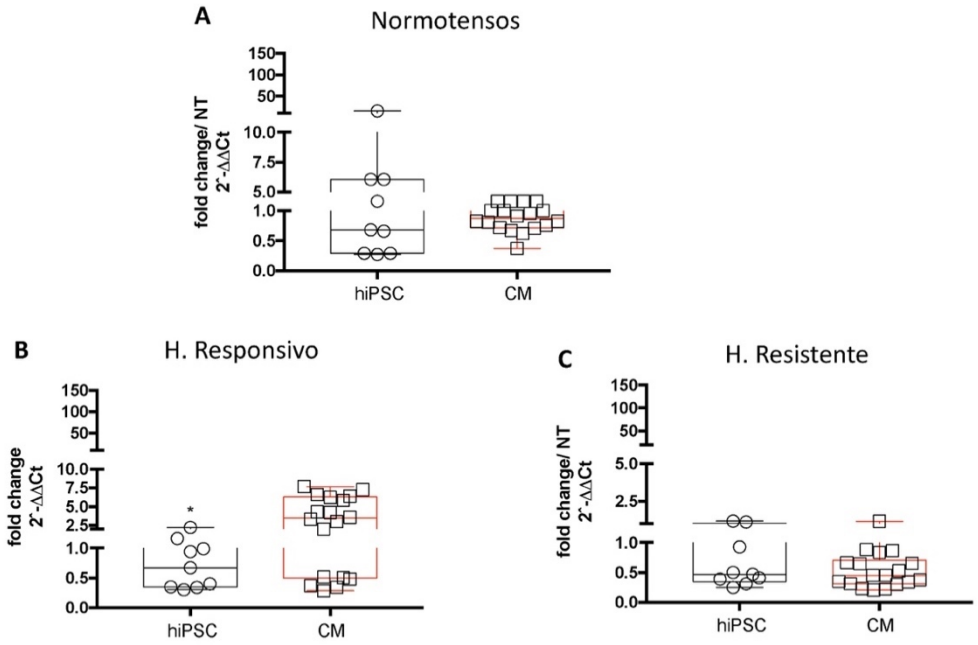
Normotensos; **B.** Amostras Hipertensos Responsivos; **C.** Amostras Hipertensos Resistentes; N=3/grupo – triplicata experimental

Figura 22. Expressão de *NOX2* em hiPSC e cardiomiócitos.



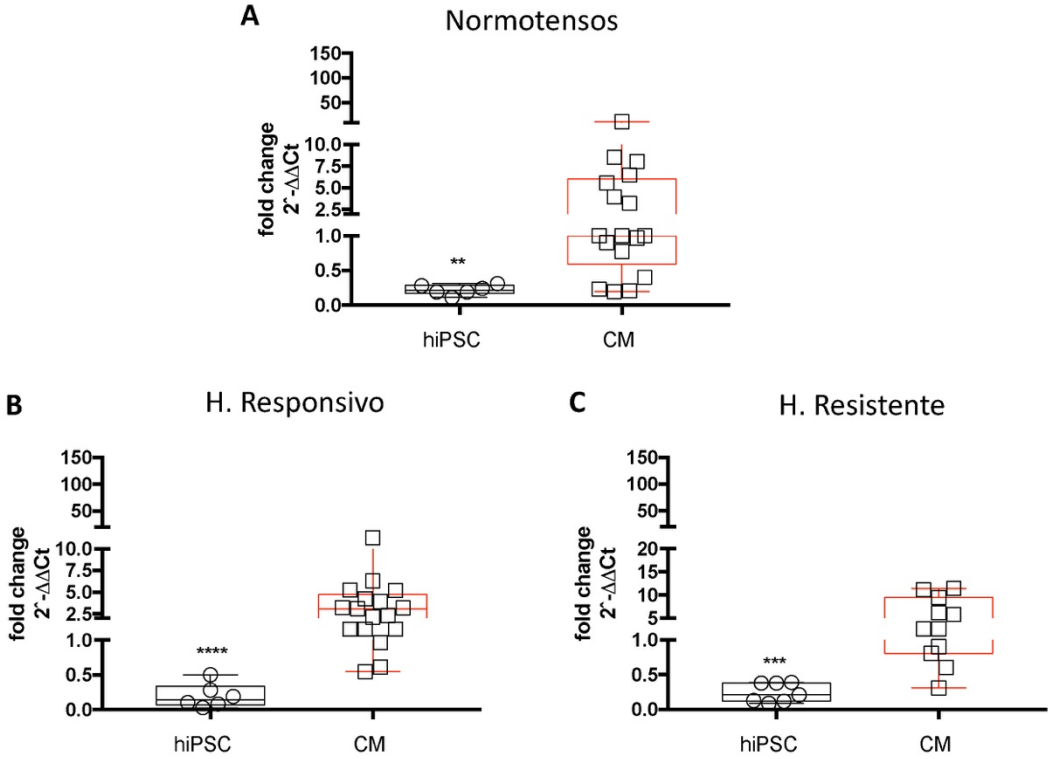
Expressão de mRNA para *NOX2* (gene alvo/ gene endógeno - HPRT) em condição basal nas hiPSC indiferenciadas vs CM. Foi calculado através do método ΔΔCt **A.** Amostras de Normotensos; **B.** Amostras Hipertensos Responsivos; **C.** Amostras Hipertensos Resistentes; N=3/grupo – triplicata experimental

Figura 23. Expressão de *NOX4* em hiPSC e cardiomiócitos.



Expressão de mRNA para *NOX4* (gene alvo/ gene endógeno - HPRT) em condição basal nas hiPSC indiferenciadas vs CM. Foi calculado através do método ΔΔCt **A.** Amostras de Normotensos; **B.** Amostras Hipertensos Responsivos; **C.** Amostras Hipertensos Resistentes; N=3/grupo – triplicata experimental

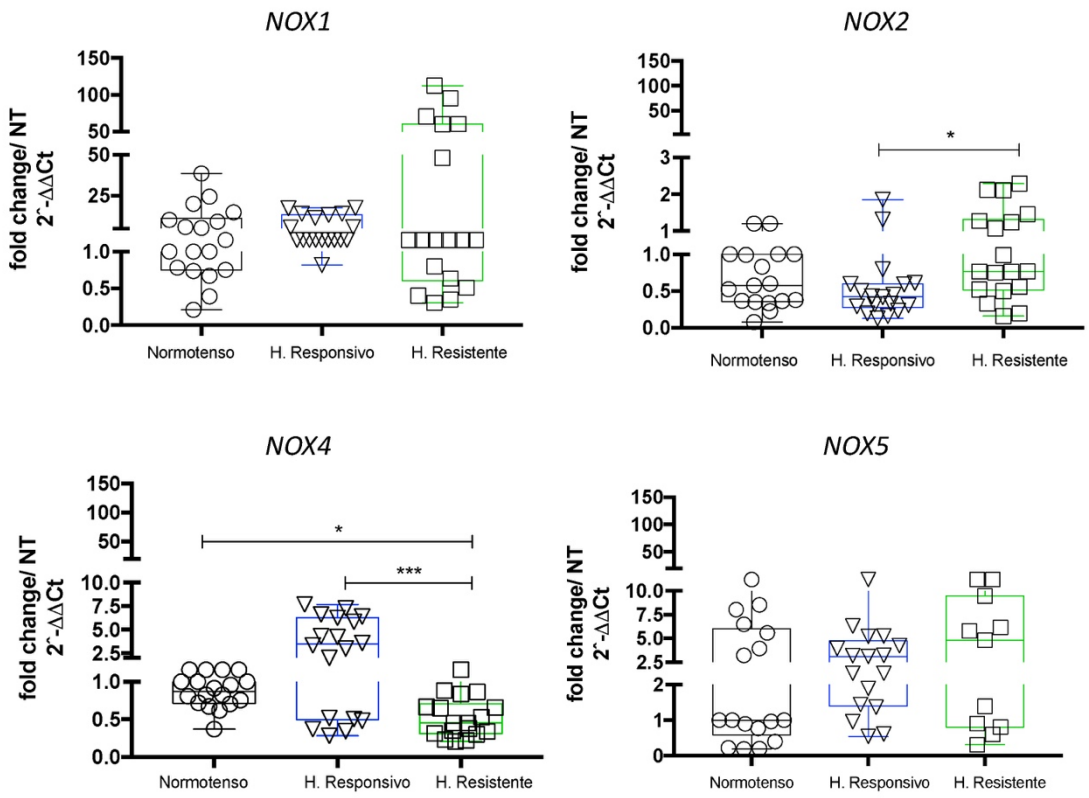
Figura 24. Expressão de *NOX5* em hiPSC e cardiomiócitos.



Expressão de mRNA para *NOX5* (gene alvo/ gene endógeno - HPRT) em condição basal nas hiPSC indiferenciadas vs CM. Foi calculado através do método ΔΔCt **A.** Amostras de Normotensos; **B.** Amostras Hipertensos Responsivos; **C.** Amostras Hipertensos Resistentes; N=3/grupo – triplicata experimental

Após avaliar que os CM derivados de hiPSC eram capazes de expressar as *NOXes*, comparamos a expressão entre os 3 grupos para cada NOX, em condição basal. Nesse ponto é curioso notar que apesar de não ter diferença estatística, o HResist possui uma tendência a expressar mais *NOX1* e *NOX2* em condições basais do que os Normotensos e HRespons (Figura 25). Na literatura, é descrito que essas duas NOXes possuem sua expressão aumentada em patologias cardíacas, tendo função deletéria, enquanto que a *NOX4* já é sabido ter função protetora no coração, e interessantemente esta foi a única na qual o HResist apresentou expressão significativamente menor em relação aos outros dois grupos. A *NOX5* não apresentou nenhuma tendência à diferenças entre os grupos. Esta é a única isoforma no sistema cardiovascular dependente de Cálcio para sua atividade, e sendo assim, sua resposta é muito mais sensível a outras condições fisiológicas do que as NOX1, 2 e 4, podendo ter função tanto deletéria quanto protetora, dependendo do contexto, mas ainda não sabe-se ao certo a exata função da NOX5 em cardiomiócitos.

Figura 25. Expressão das *NOXes* em CM dos diferentes grupos.



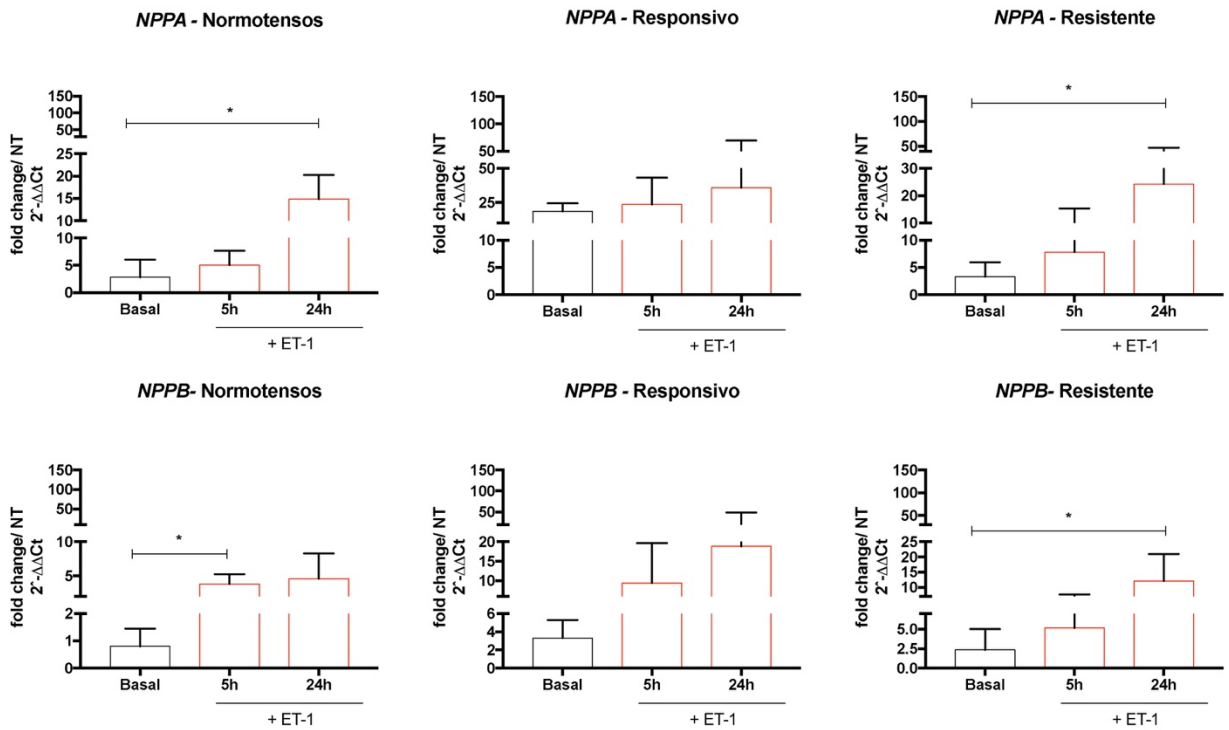
Expressão de mRNA para *NOXes 1, 2, 4 e 5* (gene alvo/ gene endógeno - *HPRT*) em condição basal nos CM. Foi calculado através do método ΔΔCt **A.** *NOX 1;* **B.** *NOX 2*; **C.** *NOX 4;* **D.** *NOX 5;* N=3/grupo – triplicata experimental

Após os estímulos com a ET-1 (0.1μM), em diferentes tempos, não foi possível observar nenhum aumento de expressão das *NOXes* em relação ao basal em nenhum dos grupos (APÊNDICES C, D, E e F) e isso levantou duas hipóteses: **1)** ET-1 usada não foi suficiente para ativação molecular das NOXes **2)** As células não foram capazes de responder fisiologicamente ao estímulo.

A ET-1 é muito utilizada para induzir hipertrofia em cardiomiócitos, mas pouco se tem na literatura sobre mecanismos de estresse oxidativo induzido por ET-1 em CM. Por este motivo, consideramos estudos que utilizam essa importante molécula para induzir estresse oxidativo em outros tipos celulares do sistema cardiovascular, como endoteliais e células de músculo liso (MONTEZANO et al., 2010) além de recomendação (informação verbal) de que em comparação com outros compostos de indução de estresse oxidativo (exemplo, Angiotensina II), a ET-1 era um peptídeo mais estável e poderia portanto, nos fornecer resultados mais reprodutíveis. Sendo assim, isto nos levou a pensar que, possivelmente, nos cardiomiócitos a via da Endotelina tem ação sinérgica com outra importante via de ativação de estresse oxidativo (como a Angiotensina II), e portanto, para observar uma resposta à esse peptídeo nessas células, precisaríamos: **a.** utilizar o estímulo por mais tempo; **b.** aumentar a concentração de ET-1 utilizada; **c.** ativar outras vias relacionadas com processo de estresse oxidativo intracelular.

Para descartar a possibilidade de que essas células não estivessem respondendo ao estímulo, avaliamos 2 importantes genes que são vinculados à hipertrofia em cardiomiócitos e falha cardíaca (*NPPA* e *NPPB,* respectivamente) (MAN; BARNETT; CHRISTOFFELS, 2018), os quais esperaríamos que estivessem diferencialmente expressos nas amostras estimuladas com ET-1. O que observamos foi que, claramente, todas as amostras nos 3 diferentes grupos responderam ao estímulo (Figura 26). Portanto, o fato de não observarmos aumento de expressão das *NOXes* nos CMs estimulados com Endotelina deve estar mais relacionado com a hipótese de que a via da Endotelina pode não ser a principal fonte de indução de estresse oxidativo nessas células.

Figura 26. Expressão dos genes *NPPA* e *NPPB* em CM.



Expressão de mRNA para avaliar hipertrofia e falha cardíaca nos CM (gene alvo/ gene endógeno - *HPRT*). Foi calculado através do método ΔΔCt. **A.** Gene *NPPA* - marcador de hipertrofia cardíaca **B.** Gene *NPPB* - marcador de falha cardíaca. N=3/grupo – triplicata experimental.

6. CONCLUSÃO

O principal resultado deste trabalho foi o estabelecimento de uma coleção de hiPSCs de indivíduos hipertensos, responsivos e resistentes, e normotensos com características clínicas homogêneas. Apesar da importância da hipertensão, até hoje somente um estudo utilizou hiPSC derivadas de indivíduos hipertensos (BIEL et al., 2015). Este, porém, gerou essas a partir de hipertensos com características variáveis (sexo, idade) e sem informações sobre presença de outras doenças/fatores de risco associadas à hipertensão. Diante disto, nosso banco de hiPSC é de extrema relevância, especialmente para estudos que visam o entendimento de mecanismos moleculares associados à hipertensão.

Nos últimos anos, diversas pesquisas que buscam pelo entendimento de doenças complexas não mendelianas, como Depressão, Parkinson, e Alzheimer utilizam hiPSCs como modelo de estudo. Sendo assim, este banco de hiPSC é promissor, pois, ainda que a hipertensão seja uma doença complexa e multifatorial, nossos resultados mostraram que as hiPSCs parecem manifestar *in vitro* uma pré-disposição genética à doença. A análise de expressão gênica diferencial de tipos celulares derivados das hiPSCs dos hipertensos vs normotensos poderá levar à identificação das vias moleculares envolvidas na doença.

Além disso, mostramos que os cardiomiócitos derivados destas hiPSC são capazes de expressar as *NOXes*. Isto é particularmente importante para a *NOX5*, pois, existe uma enorme limitação de modelo experimental visto que roedores, que são uma potente ferramenta de estudo, não expressam essa isoforma. Assim, estabelecemos os CM derivados das hiPSCs como um modelo *in vitro* para o estudo do papel das NOXes nas manifestações cardíacas da hipertensão.

REFERÊNCIAS

AHLUWALIA, M.; BANGALORE, S. Management of hypertension in 2017: targets and therapies. **CE: Alpana; HCO**, 2017.

ALTENHÖFER, S. et al. Evolution of NADPH Oxidase Inhibitors: Selectivity and Mechanisms for Target Engagement. **Antioxidants & redox signaling**, v. 23, n. 5, p. 406- 427., 2015.

AQUINO, E. M. L. et al. Brazilian Longitudinal Study of Adult health (ELSA-Brasil): Objectives and design. **American Journal of Epidemiology**, v. 175, n. 4, p. 315–324, 2012.

ARMANI, C.; BOTTO, N.; G. ANDREASSI, M. Susceptibility Genes in Hypertension. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 28, p. 2973–2986, 2011.

BAVISHI, C.; BANGALORE, S.; MESSERLI, F. H. Outcomes of Intensive Blood Pressure Lowering in Older Hypertensive Patients. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 69, n. 5, p. 486–493, 2017.

BIEL, N. M. et al. Vascular Smooth Muscle Cells From Hypertensive Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells to Advance Hypertension Pharmacogenomics. **Stem Cells Translational Medicine**, p. sctm.2015-0126, 2015.

BRÁS-SILVA, C.; LEITE-MOREIRA F, A. Efeitos Miocárdicos da Endotelina-1. **Protective Coatings for Turbine Blades**, v. 27, n. January, p. 925–951, 2008.

BURRIDGE, P. W. et al. Chemically defined generation of human cardiomyocytes. **Nature Methods**, 2014.

BURRIDGE, P. W. et al. Human Induced Pluripotent Stem Cell–Derived Cardiomyocytes Recapitulate the Predilection of Breast Cancer Patients to

Doxorubicin–Induced Cardiotoxicity Paul. v. 22, n. 5, p. 547–556, 2016.

CALHOUN, D. A. Refractory and resistant hypertension: Antihypertensive treatment failure versus treatment resistance.**Korean Circulation Journal**, 2016.

CAMERON, A. C.; LANG, N. N.; TOUYZ, R. M. Drug Treatment of Hypertension: Focus on Vascular Health. **Drugs**, v. 76, n. 16, p. 1529–1550, 2016.

CHEN, F. et al. From form to function: The role of Nox4 in the cardiovascular system. **Frontiers in Physiology**, 2012.

CHOU, B. K. et al. Efficient human iPS cell derivation by a non-integrating plasmid from blood cells with unique epigenetic and gene expression signatures. **Cell Research**, v. 21, n. 3, p. 518–529, 2011.

DA SILVA LARA, L. et al. Trypanosoma cruzi infection of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: an in vitro model for drug screening for Chagas disease. **Microbes and Infection**, v. 20, n. 5, p. 312–316, 2018.

DIKALOVA, A. E. et al. Sirt3 Impairment and SOD2 Hyperacetylation in Vascular Oxidative Stress and Hypertension. **Circulation Research**, 2017.

DINH, Q. N. et al. Roles of Inflammation, Oxidative Stress, and Vascular Dysfunction in Hypertension. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–11, 2014.

DRÖGE, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 1, p. 47–95, 2002.

FUKAI, T.; USHIO-FUKAI, M. Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 6, p. 1583–1606, 2011.

FULTON, D. J. R. Nox5 and the Regulation of Cellular Function. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 10, p. 2443–2452, 2009.

GOLÇALVES DIAS, R.; NEGRÃO, C. E.; KRIEGER, M. H. Nitric Oxide And The Cardiovascular System: Cell Activation, Vascular Reactivity And Genetic Variant [Óxido Nítrico E Sistema Cardiovascular: Ativação Celular, Reatividade Vascular E Variante Genética]. **Scopus**, v. 44, p. 68–75, 2011.

HARRISON, D. G. et al. Inflammation, immunity, and hypertension. **Hypertension**, v. 57, n. 2, p. 132–140, 2011.

JHA, J. C. et al. The emerging role of NADPH oxidase NOX5 in vascular disease. **Clinical Science**, 2017.

JIANG, X. et al. Exosomes from pediatric dilated cardiomyopathy patients modulate a pathological response in cardiomyocytes. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 312, n. 4, p. H818–H826, 2017.

KANAAN, G. N.; HARPER, M.-E. Cellular redox dysfunction in the development of cardiovascular diseases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, n. July, p. 0–1, 2017.

KEARNEY, M. T. et al. Global burden of hypertension WorldWide data. **The Lancet,** p. 8–9, 2005.

LIAN, X. et al. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent ste cells by modulating Wnt/beta-catenin signaling under fully defined conditions. **Nature Protocols**, v. 8, n. 1, p. 162–175, 2013.

LOTUFO, P. A. et al. Resistant hypertension: Risk factors, subclinical atherosclerosis, and comorbidities among adults-the brazilian longitudinal study of adult health (ELSA-Brasil). **Journal of Clinical Hypertension**, v. 17, n. 1, p. 74–80, 2015.

MAN, J.; BARNETT, P.; CHRISTOFFELS, V. M. Structure and function of the Nppa–Nppb cluster locus during heart development and disease. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 75, n. 8, p. 1435–1444, 2018.

MEDINE, C. N. et al. Developing High-Fidelity Hepatotoxicity Models From Pluripotent Stem Cells. **Stem Cells Translational Medicine,**p. 505–509, 2013.

MONTEZANO, A. C. et al. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced oxidase 5 (Nox5) regulation by angiotensin II and endothelin-1 is mediated via calcium/calmodulin-dependent, Rac-1-independent pathways in human endothelial cells. **Circulation Research**, v. 106, n. 8, p. 1363–1373, 2010.

MONTEZANO, A. C. et al. Redox signaling, Nox5 and vascular remodeling in hypertension. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 24, n. 5, p. 425–433, 2015.

MONTEZANO, A. C.; TOUYZ, R. M. Reactive Oxygen Species, Vascular Noxs, and Hypertension: Focus on Translational and Clinical Research. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 20, n. 1, p. 164–182, 2014.

MORAWIETZ, H. Cardiovascular protection by Nox4. **Cardiovascular Research**, v. 114, n. 3, p. 353–355, 2018.

MUELLER, N. T. et al. Earlier age at menarche is associated with higher diabetes risk and cardiometabolic disease risk factors in Brazilian adults: Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil). **Cardiovascular Diabetology**, v. 13, n. 1, p. 22, 2014.

NABEEBACCUS, A.; ZHANG, M.; SHAH, A. M. NADPH oxidases and cardiac remodelling. **Heart Failure Reviews**, v. 16, n. 1, p. 5–12, 2011.

PARAVICINI, T. M.; TOUYZ, R. M. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. **Diabetes care**, v. 31 Suppl 2, 2008.

PARMACEK, M. S.; SOLARO, R. J. Biology of the troponin complex in cardiac myocytes. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 47, n. 3, p. 159–176, 2004.

PENDYALA, S.; NATARAJAN, V. Redox regulation of Nox proteins. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 174, n. 3, p. 265–271, 2010.

POUTON, C. W.; HAYNES, J. M. Pharmaceutical applications of embryonic stem cells. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 13 SPEC. ISS., p. 1918–1934, 2005.

POUTON, C. W.; HAYNES, J. M. Pharmaceutical applications of embryonic stem cells. **Advanced Drug Delivery Reviews** v. 6, n. August, p. 605–616, 2007.

RABELO, L. A. et al. Redox unbalance: NADPH oxidase as therapeutic target in blood pressure control**.** **Arq Bras Cardiol**, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20549031>

RAO, M. Scalable human ES culture for therapeutic use: propagation, differentiation, genetic modification and regulatory issues. **Gene Therapy**, v. 15, n. 2, p. 82–88, 2008.

SANTOS, C. X. C. et al. Redox signaling in cardiac myocytes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 50, n. 7, p. 777–793, 2011.

SARAFIAN, R. et al. Monitoring cell line identity in collections of human induced pluripotent stem cells. **Stem Cell Research**, v. 28, 2018.

SHIH, P. B.; CONNOR, D. T. O. Hereditary determinants of human hypertension. **Hypertension**, v. 51, n. 6, p. 1456–1464, 2008.

STAESSEN, J. A. et al. Essential hypertension. **the Lancet •**, v. 361, p. 1629–1670, 2003.

TAKAHASHI, K. et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human

Fibroblasts by Defined Factors. **Cell**, v. 131, n. 5, p. 861–872, 2007.

TIBURCY, M. et al. Defined Engineered Human Myocardium with Advanced Maturation for Applications in Heart Failure Modelling and Repair. **Circulation**, v. 135, n. 19, p. 1832–1847, 2017.

TOFOLI, F. A. et al. Increasing the Genetic Admixture of Available Lines of Human Pluripotent Stem Cells. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–7, 2016.

TOUYZ, R. M.; BRIONES, A. M.; SEDEEK, M. NOX Isoforms. **Molecular intervention**, v. 11, n. 1, p. 27–35, 2011.

TURINETTO, V.; ORLANDO, L.; GIACHINO, C. Induced pluripotent stem cells: Advances in the quest for genetic stability during reprogramming process. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 9, 2017.

TURNER, M. et al. Toward the development of a global induced pluripotent stem cell library. **Cell Stem Cell**, v. 13, n. 4, p. 382–384, 2013.

VAN DER POL, A. et al. Treating oxidative stress in heart failure: past, present and future. **European Journal of Heart Failure**, v. 21, n. 4, p. 425–435, 2019.

VONGPATANASIN, W. Resistant hypertension: A review of diagnosis and management. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 311, n. 21, p. 2216–2224, 2014.

WENZEL, U. et al. Immune mechanisms in arterial hypertension. **Hypertension**, v. 5, n. 4, p. 404–408, 2016.

YAMANAKA, S. Strategies and New Developments in the Generation of Patient-Specific Pluripotent Stem Cells. **Cell Stem Cell**, v. 1, n. 1, p. 39–49, 2007.

ZHANG, M. et al. NADPH Oxidases in Heart Failure: Poachers or Gamekeepers? **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 9, p. 1024–1041, 2012.

ZHAO, Y.; YANG, Y.; LOSCALZO, J. Real-time assessment of the metabolic profile of living cells with genetically encoded NADH sensors. **Methods in Enzymology**, v. 542, p. 349–367, 2014.

APÊNDICES

A. Sequências de *primers* Sybr utilizados

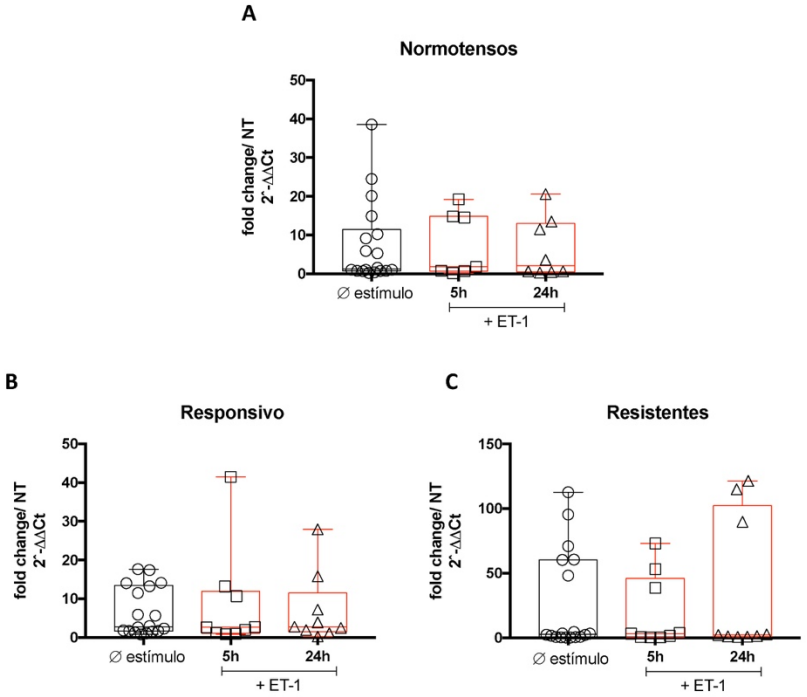
Gene		Sequencia 5'-> 3'
ACTA2	Fw	CCGGGACTAAGACGGGAATC
	Rv	TTGTCACACACCAAGGCAGT
Vimentin	Fw	AGTCCACTGAGTACCGGAGAC
	Rv	CATTTCACGCATCTGGCGTTC
VWF	Fw	TTCCTGAGTGTGTCAACCCAG
	Rv	GGAATTATCGTCGTTCCTGCAA
GPX1	Fw	AGAACGCCAAGAACGAAGAG
	Rv	CGTTCACCTCGCACTTCT
p53	Fw	ACAAGGTTGATGTGACCTGGA
	Rv	TGTAGACTCGTGAATTTCGCC
p21	Fw	GCAGACCAGCATGACAGATTT
	Rv	GGATTAGGGCTTCCTCTTGGA
p27	Fw	AACTCTGGAACGTGCATCTAGC
	Rv	GTGGCTCAGGTGCAACATTG
TLR4	Fw	ATGCCAGGATGATGTCTGCC
	Rv	GGATTTCACACCTCCACGCA
TLR3	Fw	CAAACACAAGCATTCGGAATCTG
	Rv	AAGGAATCGTTACCAACCACATT
SOD 1	Fw	GAAGGTGTGGGGAAGCATTA
	Rv	ACATTGCCCAAGTCTCCAAC
SOD 2	Fw	GGAAGCCATCAAACGTGACT
	Rv	CTGATTTGGACAAGCAGCAA
Catalase	Fw	CGTGCTGAATGAGGAACAGA
	Rv	AGTCAGGGTGGACCTCAGTG
ETA	Fw	GCTCTTTGCTGGTTCCCTCTT
	Rv	GGTCATCAGACTTTTGGACTGG
ETB	Fw	TTGTGTCCTGCCTTGTGTTC
	Rv	GGATGTCAATGACGATGTGC
TRPM 2	Fw	TCCCCGCCGAGTACATACTG
	Rv	GTCTGCTCCGATATGAACTTCTC
TRPM 7	Fw	TGGGAAGGCTGAATATGAGG
	Rv	TCGCTGTCATCCATTGTCAT
MagT1	Fw	GGGATTGCTTTTGGCTGTTA
	Rv	TGGTTCCACATTTGACCAGA

B. Perfil de *fingerprint* por microssatélite - STR

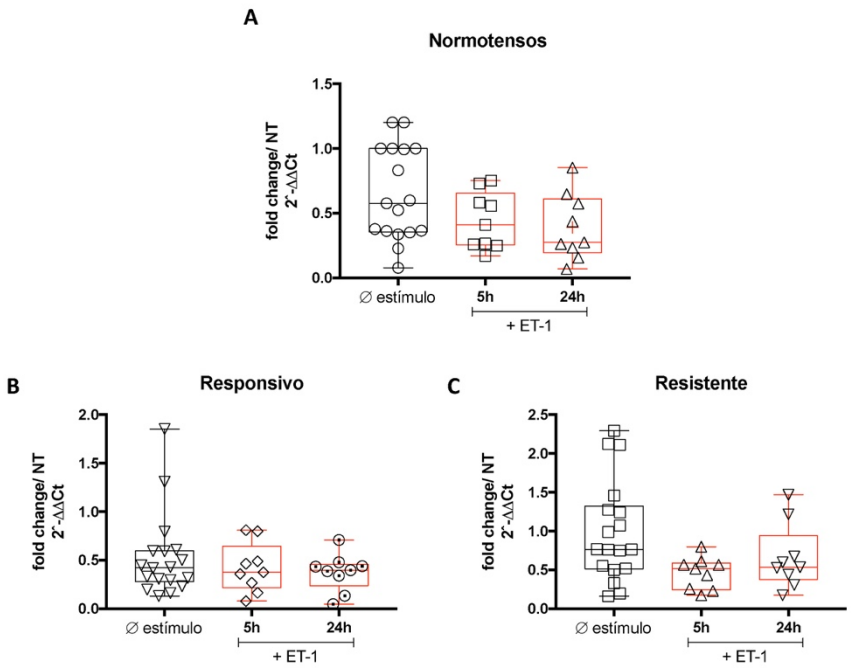
hiPSC	Chromossome 8 D8S1179		Chromosome 21 D21S11		Chromosome 7 D7S820		Chromosome 5 CSF1PO		Chromosome 3 D3S1358		Chromosome 11 TH01		Chromosome 13 D13S317		Chromosome 16 D16S539	
	Allele 1	Allele 2	Allele 1	Allele 2	Allele 1	Allele 2	Allele 1	Allele 2	Allele 1	Allele 2	Allele 1	Allele 2	Allele 1	Allele 2	Allele 1	Allele 2
28	10	13	31.2	32.2	8	10	10	14	15	18	6	9.3	11	12	9	11
55	13	16	29	31.2	10	10	11	12	14	15	7.3	9.3	11	12	11	13
56	14	15	28	28	8	12	11	12	15	16	5.3	6.3	10	11	12	12
57	11	13	31	31	11	12	9	12	15	16	6.3	6.3	8	9	10	12
58	13	14	30	30	10	12	11	12	15	18	6.3	9.3	11	12	9	13
59	12	13	28	30	8	12	10	11	15	17	9.3	9.3	8	13	9	13
60	13	13	32.2	32.2	9	11	10	10	13	15	6.3	9.3	11	12	9	12
61	11	13	30	33.2	10	11	11	12	14	14	6.3	6.3	8	11	9	13
62	11	13	27	32.2	9	9	11	11	15	18	5.3	7.3	8	12	11	11

hiPSC	Chromosome 2 D2S1338		Chromosome 19 D19S433		Chromosome 12 vWA		Chromosome 2 TPOX		Chromosome 18 D18S51		Sex chromosomes AMEL		Chromosome 5 D5S818		Chromosome 4 FGA	
	Allele 1	Allele 2	Allele 1	Allele 2	Allele 1	Allele 2	Allele 1	Allele 2	Allele 1	Allele 2	Allele 1	Allele 2	Allele 1	Allele 2	Allele 1	Allele 2
28	20	20	13	14	17	18	8	8	12	17	x	y	11	12	21	24
55	19	20	12	13	16	17	6	11	15	16	x	y	13	13	22	23
56	17	24	12	14	17	19	7	8	16	17	x	y	11	15	20	22
57	20	25	12	14	17	19	7	8	16	17	x	y	10	13	22	24
58	16	24	14	15	16	17	8	10	12	19	x	y	12	12	21	23
59	19	23	12	13	14	18	8	11	13	15	x	y	12	12	20	22
60	19	24	13	14	16	17	8	9	15	15	x	y	11	12	21.2	24.2
61	21	23	13	14	17	18	8	8	12	22	x	y	10	12	19	22
62	20	20	13	14.2	15	17	8	12	16	18	x	y	12	13	20	21

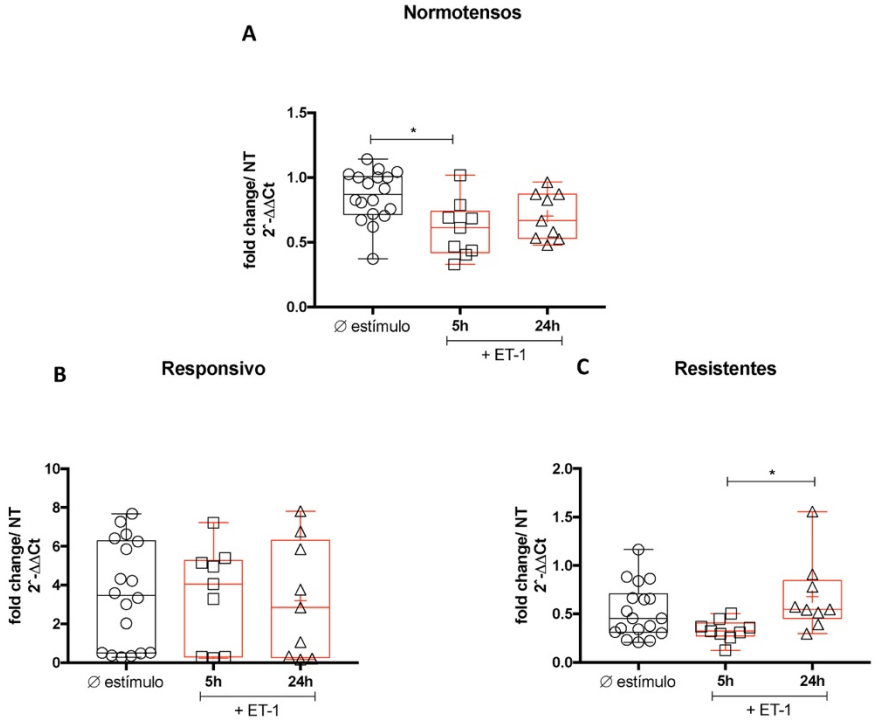
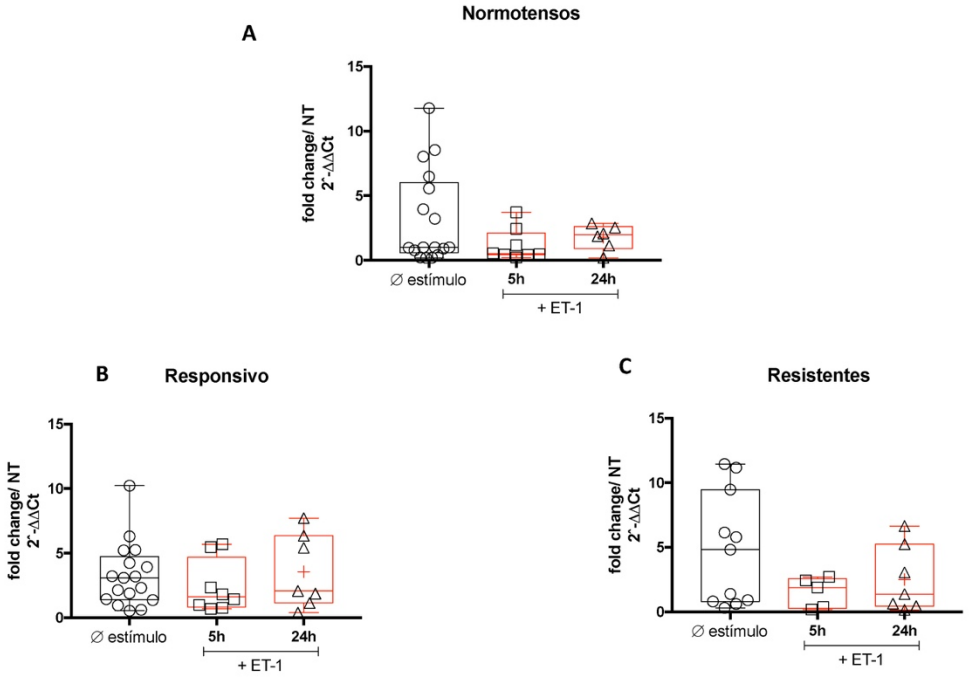
C. Expressão relativa por qRT-PCR para o gene da *NOX1*



D. Expressão relativa por qRT-PCR para o gene da *NOX2*



E. Expressão relativa por qRT-PCR para o gene da *NOX4*



F. Expressão relativa por qRT-PCR para o gene da *NOX5*