

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2006

JOÃO PEDRO SAAR WERNECK DE CASTRO

**Mobilização de células-tronco da
medula óssea é suficiente para a
melhora funcional de corações de ratos
infartados?**

1 volume

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA À
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
VISANDO À OBTENÇÃO DO GRAU DE
DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (Fisiologia)

Orientadores:

Prof. Dr. Antônio Carlos Campos de Carvalho
Profa Dra.Regina Coeli dos Santos Goldenberg

Rio de Janeiro

2006

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

FOLHA DE APROVAÇÃO

João Pedro Saar Werneck de Castro

Mobilização de células-tronco da medula óssea é suficiente para a melhora funcional de corações de ratos infartados?

Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor.

Rio de Janeiro, 22 de maio de 2006.

Prof. Dr. Antônio Carlos Campos de Carvalho – Orientador

Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dra. Regina Coeli dos Santos Goldenberg – Orientadora

Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. José Geraldo Mill – Membro da banca examinadora

Departamento de Ciências Fisiológicas do Centro Biomédico da Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Marcelo Felipe Santiago – Membro da banca examinadora

Laboratório de Neurobiologia Celular e Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dra. Rosália Mendez Otero – Membro da banca examinadora

Laboratório de Neurobiologia Celular e Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Marcelo Marcos Morales - Revisor

Laboratório de Fisiologia Celular e Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dra. Gisele Zapata Sudo – Suplente Externo

Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dra. Masako Oya Masudo – Suplente Interno

Laboratório de Eletrofisiologia Antônio Paes de Carvalho do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro - 2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Werneck-de-Castro, João Pedro Saar

Mobilização de células-tronco da medula óssea é suficiente para a melhora funcional de corações de ratos infartados? – Rio de Janeiro, 2006

ix – 100 fls.

Tese (Doutorado em Fisiologia Cardíaca) – Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho do Centro de Ciências da Saúde, 2006

Orientador: Antônio Carlos Campos de Carvalho.

1. Infarto do miocárdio; 2. G-CSF; 3. célula-tronco; 4. regeneração cardíaca – Teses I. Campos-de-Carvalho, Antônio Carlos (orient.) e Goldenberg, Regina Coeli dos Santos. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho do Centro de Ciências da Saúde. III. Mobilização de células-tronco da medula óssea é suficiente para a melhora funcional de corações de ratos infartados?

RESUMO

Werneck de Castro, João Pedro Saar. Mobilização de células-tronco da medula óssea é suficiente para melhora funcional de corações de ratos infartados?

O fator de estimulação de colônias de granulócitos (G-CSF) promove aumento no número de células-tronco/progenitoras da medula óssea na circulação periférica. A razão deste estudo foi investigar o impacto da administração do G-CSF na função cardíaca no modelo de infarto do miocárdio em rato (IM). Foi administrado G-CSF recombinante humano (Filgrastim®, 50 ou 200µg/kg/dia,sc) ou veículo após o IM. A performance cardíaca foi avaliada por eletro e ecocardiograma, hemodinâmica e teste de exercício em esteira. Ambos os grupos infartados exibiram função cardíaca comprometida quando comparados a ratos falso-operados. Todos os parâmetros de função cardíaca avaliados não foram estatisticamente diferentes entre os grupos G-CSF e veículo em condições de repouso, bem como depois do teste de estresse por exercício em esteira. Não se notou nenhum sinal de regeneração cardíaca e o tamanho do infarto não foi diferente na análise histológica entre os grupos. Estes dados demonstram, claramente, que o tratamento com G-CSF foi incapaz de prevenir um remodelamento cardíaco ou de melhorar a função cardiovascular em ratos em um modelo de infarto do miocárdio, a despeito da comprovada mobilização de células tronco da medula óssea para o sangue periférico.

Palavras Chave: Infarto do miocárdio – G-CSF – células tronco - regeneração cardíaca

ABSTRACT

Werneck de Castro, João Pedro Saar. Is stem-cells mobilization enough to improve heart-function in infarcted heart rats?

Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) increases the number of bone marrow stem/progenitor cells in the peripheral circulation. The aim of this study was to investigate the impact of G-CSF administration on cardiac function in a rat model of myocardial infarction (MI). Recombinant human G-CSF (Filgrastim®, 50 or 200µg/kg/day, sc) or vehicle was administered after MI. Cardiac performance was evaluated by electrocardiography, hemodynamic and treadmill exercise test. Both infarcted groups exhibited impaired cardiac function compared to sham-operated rats. All cardiac functional parameters evaluated were not statistically different between G-CSF and vehicle group at resting conditions as well as after treadmill exercise stress test. There was no sign of cardiac regeneration and infarct size was not different on histological analysis between groups. These data clearly show that G-CSF treatment was unable to prevent cardiac remodeling or to improve cardiovascular function in a rat model of myocardial infarction, despite bone marrow stem cell mobilization.

Keywords: myocardial infarction – G-CSF – stem cells – cardiac regeneration

SUMÁRIO

FOLHA DE APROVAÇÃO.....	ii
FICHA CATALOGRÁFICA	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
SUMÁRIO.....	vi
LISTA DE SIGLAS UTILIZADAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
INTRODUÇÃO.....	1
1.1. A contribuição do Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho à terapia celular com IM induzido pela ligadura permanente da coronária descendente anterior em ratos	3
1.2. Infarto do miocárdio	4
1.3. Características anatômicas e funcionais	5
1.4. Terapia celular	9
1.5. Fator de estimulação de colônias de granulócitos (G-CSF)	12
1.6. Produção de G-CSF e seus efeitos sobre a hematopoiese	13
1.7. G-CSF e a mobilização de células precursoras	14
1.8. Tratamento com G-CSF em modelos experimentais de IM	15
2. OBJETIVOS	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1. Animais.....	30
3.2. Técnica de indução do infarto do miocárdio	30
3.3. Tratamento com G-CSF e mobilização celular	32
3.4. Registros eletro e ecocardiográficos.....	33
3.5. Análises hemodinâmicas	36
3.6. Teste cardiopulmonar	38
3.7. Histopatologia.....	39
3.8. Análise estatística	39
4. RESULTADOS	40
4.1. Grupo I.....	40
4.1.1. Contagem de Leucócitos periféricos e Ecocardiograma	40
4.2. Grupo II	44
4.2.1. Contagem de Leucócitos periféricos e Ecocardiograma	44
4.3. Grupo III.....	47
4.3.1. Contagem de leucócitos e células CD34 ⁺	47
4.3.2. ECG e ECO	50
4.3.3. Hemodinâmica e teste cardiopulmonar	53
4.3.4. Extensão do Infarto.....	56
5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

LISTA DE SIGLAS UTILIZADAS

CCS	Centro de Ciências da Saúde
G-CSF	fator de estimulação de colônia de granulócitos
IBCCF	Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
ICM	infarto cicatrizado do miocárdio
IM	infarto do miocárdio
VE	Ventrículo esquerdo
PDFVE	pressão diastólica final do VE
PDVE	Pressão desenvolvida pelo VE
ADVE	Área em diástole do VE
ASVE	Área em sístole do VE
FEA	Fração de encurtamento de área
DDF	Diâmetro diastólico final
DSF	Diâmetro sistólico final
SCF	Fator de Células-Tronco
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
TNF	fator de necrose tumoral
IL-1	interleucina 1
IL-3	Interleucina 3
IL-4	Interleucina 4
G-MCSF	fator de estimulação de colônia de granulócitos e macrófagos
IFN- γ	interferon gama
IL-1 α	Interleucina 1 – alfa
Il-6	Interleucina 6
VLA-4	Receptor do fator derivado de estroma
SDF-1	Fator derivado de estroma 1
GFP+	Green fluorescent protein
VEGF	Fator de crescimento de endotélio
G-CSFR	Receptor do G-CSF

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelos de infarto experimental em ratos.....	31
Figura 2 - Medida de fração de encurtamento no ecocardiograma. (A) Modo bidimensional de um corte transversal do VE na altura dos papilares. (B) Modo M guiado pelo bidimensional em A. (C) A partir da relação do diâmetro do VE em sístole e em diástole é calculada a Fração de Encurtamento ($FE = (DDVE - DSVE) / DDVE * 100$).....	35
Figura 3 - Cálculo da fração de encurtamento de área (FEA). (A) Tracejado da área de um animal infartado em diástole. (B) Tracejado da área do mesmo animal em sístole. $FEA = (ADVE - ASVE) / ADVE * 100$	35
Figura 4 - Sistema de registro das pressões intraventriculares (A) Cânula inserida diretamente no VE ligada ao sistema de aquisição. (B) Registro das pressões ventriculares. (C) Derivada da curva de pressão sobre o tempo.	37
Figura 5 - (a) Leucócitos sanguíneos totais dos animais do grupo I (50 µg/Kg/dia - 3 horas após o infarto).; (b) Leucócitos sanguíneos totais dos animais normais tratados da mesma maneira. O dia zero representa o antes do tratamento com G-CSF.....	41
Figura 6 - Acompanhamento Ecocardiográfico do Grupo I. (A) Fração de Encurtamento (b) Diâmetro Diastólico do VE.....	43
Figura 7 - Leucócitos no grupo II. O dia zero representa antes do início do tratamento com -G-CSF.....	45
Figura 8 - Análise ecocardiográfica do grupo II.....	46
Figura 9 - (A) Leucócitos totais ao final do tratamento do Grupo III (100µg/kg) e (b) Percentual de Neutrófilos do grupo III.....	49
Figura 10 – Percentual de Acinesia do Ventrículo Esquerdo.....	51
Figura 11 Teste de esforço máximo do grupo III. (A) Consumo máximo de oxigênio (VO_2max) e (B) Tempo de permanência em exercício.....	55
Figura 12 (A) Imagens representativas do corte histológico dos corações na altura dos músculos papilares coradas com pricosírius (fatia C) dos grupos tratado e não tratado (grupo III). (B) Extensão do Infarto.	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise sanguínea de CD34 (cells/mm ³) por citometria de fluxo antes e depois	50
Tabela 2 - Dados de ECG e ECO 19-20 dias após IM	52
Tabela 3 PDFVE, pressão diastólica final do VE; PSFVE, pressão sistólica final do VE; PDVE, pressão desenvolvida pelo VE. Valores estão em Média ± Desvpad.. FO, Falso Operado.. *** p<0,001 vs FO	54

INTRODUÇÃO

A incidência das doenças isquêmicas já atinge, nos dias de hoje, níveis endêmicos no Brasil e no mundo. Como consequência, o infarto do miocárdio (IM) tem sido objeto de pesquisa tanto em modelos animais experimentais quanto em pacientes que sofreram oclusão das artérias coronárias.

Neste contexto, não é surpreendente que o foco de um grande contingente de trabalhos científicos publicados e indexados nas principais bibliotecas virtuais de todo o mundo tenha sido o IM. Uma rápida busca por periódicos no sítio (*site*) do Centro de Informações em Biotecnologia dos Estados Unidos (*National Center for Biotechnology Information*) mostra que 134.052 artigos tiveram as palavras “Infarto do Miocárdio” (*myocardial infarction*) escritas em seus textos. Esse serviço oferecido pela Biblioteca Médica e pelo Instituto de Saúde americanos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>) revela também que dos 134.052 (cento e trinta e quatro mil e cinquenta e dois) trabalhos indexados, 41.405 (quarenta e um mil e quatrocentos e cinco) intitularam suas pesquisas com as palavras IM.

Os trabalhos com IM vão desde intervenções clínicas clássicas como re-vascularização e terapias farmacológicas até o uso de células-tronco como alternativa de tratamento. O transplante celular com células-tronco de diversas naturezas no tratamento do IM apareceu em 658 (seiscentos e cinquenta e oito) trabalhos indexados ao longo dos últimos 56 anos (busca feita com data inicial de 1º de janeiro de 1950). Dos 658 (seiscentos e cinquenta e oito) estudos detectados pela combinação das inscrições “infarto do miocárdio” e “células-tronco” (*myocardial infarction and stem cells*), 164 (cento e sessenta

e quatro) foram publicados antes do dia 2 de agosto de 2002 e 494 (quatrocentos e noventa e quatro) aceitos para publicação em revistas científicas após esta mesma data. A escolha do autor por tal marco temporal se deve ao fato de se referir ao dia da defesa da sua dissertação para a obtenção de grau mestre “Efeitos do Fator Estimulador de Granulócitos (G-CSF) em corações de ratos infartados”. No ano anterior, o Laboratório de Cardiologia Molecular e Celular da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), do qual o autor faz parte, havia iniciado essa nova empreitada para investigar sobre a pertinência do uso das células-tronco como uma ferramenta terapêutica no IM em ratos. Para tal, admitiu o ingresso no programa de pós-graduação dos alunos Emerson Lopes Olivares, Vanessa Pinho Ribeiro e o autor, João Pedro Saar Werneck de Castro.

A ligadura da coronária descendente anterior de ratos para a indução de infartos foi estabelecida como modelo para o estudo. A partir dele, as células-tronco de medula óssea foram eleitas como fonte de células-tronco para o tratamento do IM. Três vias principais de terapia foram estudadas pelos alunos supra-referidos, respectivamente: (1) injeção direta das células no tecido cardíaco, (2) injeção venosa e (3) indução da mobilização das células-tronco de medula óssea para a circulação sistêmica através da administração de fatores como o fator de estimulação de colônia de granulócitos (do inglês, *G-CSF*).

Os dados preliminares com a administração de G-CSF em ratos previamente infartados foram apresentados pelo autor em sua defesa de monografia de mestrado no dia 2 de agosto de 2002. Até aquele momento, apenas 12 (doze) trabalhos haviam abordado a terapia com G-CSF e IM (busca com as palavras *myocardial infarction and G-CSF*). Uma busca por trabalhos que apresentassem a combinação de “IM” e “G-CSF” em qualquer lugar no texto no período entre os dias 2/8/2002 e a data da pesquisa (08/05/2006) localizou 75 (setenta e cinco) obras. Quando a busca dessas inscrições foi restringida ao

título, nenhum trabalho foi encontrado antes de agosto de 2002 e 9 (nove) foram localizados após esta data. Abrangendo a pesquisa para a ocorrência no título e no resumo, 7 (sete) e 53 (cinquenta e três) artigos científicos foram identificados antes e depois de agosto de 2002, respectivamente.

A busca rápida e simples de estudos em IM, células-tronco e G-CSF apresentada acima denota um aumento expressivo de laboratórios no mundo que se propuseram a pesquisar a ação das células-tronco no infarto.

1.1. A contribuição do Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho à terapia celular com IM induzido pela ligadura permanente da coronária descendente anterior em ratos

Ao longo do último quinquênio, o grupo de pesquisa do Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho respondeu a questões importantes da terapia celular com IM induzido pela ligadura permanente da coronária descendente anterior em ratos.

O primeiro fruto concreto veio com a publicação do artigo da dissertação do agora doutor Emerson Olivares no conceituado periódico científico *American Journal of Physiology*, em 2004 (Olivares e cols, 2004). Em 2005, foi aceito o trabalho de pós-doutorado da doutora Karla Consorti (Consorti e cols, 2005) na revista internacional *Cell Transplantation* (participei de ambas as publicações na condição de co-autor). Durante esses anos também foi possível à equipe estudar de forma minuciosa as alterações funcionais induzidas pelo infarto experimental utilizado em estudos com células-tronco. O resultado foi submetido a publicação no *Brazilian Journal of Medical and Biology Research*, e aguarda manifestação dos revisores.

Especificamente sobre o estudo da injeção de G-CSF em ratos infartados, liderado por este autor, o artigo completo foi submetido no dia 9 de fevereiro do presente ano à revista *Basic Research in Cardiology*. Dois pesquisadores especialistas que revisaram os dados sugeriram mudanças do texto e a realização de um experimento adicional de mobilização celular. Em seus comentários ambos manifestaram opinião de que o trabalho acrescentará dados importantes para discussão sobre os efeitos do G-CSF em eventos isquêmicos. O experimento proposto foi realizado e o artigo re-submetido no dia 20 de abril.

Os principais achados do estudo protagonizado pelo autor serão descritos ao longo das próximas páginas, que também serão utilizadas para discutir os resultados obtidos por outros grupos que se dedicaram a estudar a função do G-CSF em modelos experimentais de infarto do miocárdio.

1.2. Infarto do miocárdio

Até o presente momento, o modelo experimental de oclusão da artéria coronária em ratos ainda é o mais utilizado para tentar reproduzir o infarto que ocorre em humanos. Este modelo foi descrito primeiramente por Robert F. Heimburger no ano de 1946, que estudava a re-vascularização do miocárdio após a injeção de substâncias no saco pericárdico. Oito anos mais tarde, Johns & Olson (1954) se preocuparam em descrever a mesma técnica com mais propriedade, apresentando, inclusive, detalhes sobre a distribuição das artérias coronárias em diferentes espécies de animais de laboratório, procurando estabelecer um modelo experimental para o infarto agudo do miocárdio (IAM). Em 1959, Kaufman, Gava e Hill publicaram dados morfológicos e histoquímicos

observados em ratos com IM, obtidos pela técnica de oclusão da artéria coronária descendente anterior. Mas foi em 1978 com Fishbein e cols que o modelo experimental em tela ganhou excelente contribuição, sendo até hoje um dos trabalhos mais citados como referência para detalhamento da técnica. A partir daí, multiplicaram-se os trabalhos destinados ao estudo do modelo de IM.

1.3. Características anatômicas e funcionais

A completa oclusão da artéria coronária descendente anterior esquerda em ratos leva a uma isquemia transmural e, conseqüentemente, ao infarto da parede livre do ventrículo esquerdo - que varia em extensão, dependendo da altura em que se faz a ligadura da artéria durante o procedimento cirúrgico.

O IM em ratos foi classicamente descrito, em 1978, por Fishbein e cols. quando os autores relataram minuciosamente todas as etapas, dia-a-dia, da evolução fisiopatológica provocada pela ligadura da coronária anterior. Eles analisaram as mudanças no número de fibras necrosadas do miocárdio, a resposta inflamatória, as mudanças vasculares, a proliferação de fibroblastos e a deposição de colágeno para formação do tecido cicatricial. Os autores concluíram que (a) há grande proliferação vascular do terceiro ao décimo sétimo dia e de fibroblastos do quarto ao vigésimo primeiro dia, (b) que há, também, deposição de colágeno do quinto ao vigésimo primeiro dia após o infarto; (c) que a ativação de sítios inflamatórios acontece mais cedo, no primeiro dia com o aparecimento dos neutrófilos, primeiras células do sistema imune a proliferarem com a inflamação. Entretanto, (d) a infiltração de células linfocitárias acontece somente a partir do segundo

dia e atinge seu pico no sétimo dia após o início da injúria miocárdica e (e) a fase aguda do infarto do miocárdio caracterizada por isquemia e lesão tecidual evoluirá para uma acentuada morte celular e resultará em mudanças significativas na função e na geometria das câmaras cardíacas.

A evolução histopatológica do infarto experimental no rato tem características gerais similares às do infarto humano, sendo, porém, mais rápido e com resposta polimorfonuclear menos intensa (Selye e cols., 1978). O rápido e completo desenvolvimento do infarto é assegurado graças ao pobre fluxo colateral desta espécie (Schaper e cols., 1984; Hearse e cols., 1988). Ao término da fase de cicatrização, por volta do 21º dia após a cirurgia, a análise histológica revela uma ausência quase total de necrose, sinais discretos de edema, hemorragia e congestão, poucos linfócitos; presença moderada de fibroblastos, células pigmentadas (hemossiderina), proliferação vascular e níveis altos de colágeno intersticial (Fishbein e cols., 1978a; Novaes e cols., 1992).

Após a cicatrização, o IM do rato é caracterizado por uma elevação da massa cardíaca total (Norman & Coers, 1960; Anversa e cols., 1984; Olivetti e cols., 1986; Spadaro e cols., 1989) devido a um aumento do ventrículo direito, ou seja, aumento do peso absoluto e relativo (quando normalizado pelo peso corporal) deste (Norman & Coers, 1960; Turek e cols., 1978; Fletcher e cols., 1981; Anversa e cols., 1984; Olivetti e cols., 1986; Spadaro e cols., 1989). Em relação ao ventrículo esquerdo (VE), seu peso relativo tende a manter-se constante (Turek e cols., 1978; Pfeffer e cols., 1979; Spadaro e cols., 1989) devido à perda tecidual da região necrosada e à hipertrofia da massa muscular remanescente que se compensam (Olivetti e cols., 1986). No trabalho de Olivetti e cols. (1991), encontram-se alterações significativas, nos grandes infartos, da geometria cardíaca em nível macroscópico: aumento do diâmetro transversal, longitudinal e do volume da

câmara ventricular esquerda, corroborando os trabalhos de Turek e cols. (1978), Anversa e cols. (1984), Spadaro e cols., (1989) e Olivetti e cols. (1991). Além disso, o grau de hipertrofia dos miócitos do ventrículo esquerdo parece variar de acordo com a distância que estes se encontram da cicatriz da lesão, ou seja, na borda da região cicatrizada (parede livre do VE) encontram-se miócitos com o diâmetro transverso maior do que aqueles situados em uma distância maior da mesma (septo interventricular) (Olivetti e cols., 1991).

Devido à perda de miocárdio viável, a função ventricular esquerda é imediatamente diminuída, como evidenciado pela queda da pressão sistólica ventricular esquerda, elevação da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo e diminuição do débito cardíaco (Zimmer e cols., 1989). Nesta situação experimental, o miocárdio não-isquêmico tem que compensar a perda de tecido tanto no aspecto metabólico como funcional.

Em infartos grandes Pfeiffer e cols. (1979) detectaram redução da pressão arterial sistólica, aumento da pressão diastólica final do VE (PDFVE), redução do débito cardíaco, do volume sistólico e do trabalho externo (produto do volume sistólico pela diferença entre as pressões arterial média e atrial direita) corrigidos pelo peso corpóreo. Em infartos moderados, houve uma redução da pressão sistólica e em pequenos infartos nenhum dos parâmetros sofreu alterações significativas.

Fletcher *e cols.* (1981) observaram diminuição da pressão arterial sistólica e aumento da PDFVE apenas em infartos moderados e grandes. Porém, sinais de insuficiência foram observados quando os animais foram submetidos à sobrecarga de volume ou à oclusão aórtica, evidenciados pela diminuição da resposta a estas manipulações (aumento de débito cardíaco, volume sistólico e pressão sistólica máxima do VE) ou resultaram em resposta exagerada quanto ao aumento da PDFVE em todos os grupos infartados em relação ao controle.

O infarto do miocárdio em humanos é caracterizado pela presença de tecido fibroso formado entre a 6^a e a 12^a semana após a fase aguda da doença isquêmica. Estruturalmente, o miocárdio lesado se modifica e apresenta uma cicatriz fibrosa neovascularizada, transmural ou subendocárdica, constituída por uma densa camada de fibras colágenas e fibroblastos, que define o “infarto cicatrizado do miocárdio” (ICM) (Mallory e cols., 1939; Fishbein e cols., 1978b; Factor, 1990). O tecido miocárdico sobrevivente pode também sofrer modificações anátomo-patológicas que variam em intensidade devido a fatores estruturais, como a extensão da lesão e as características do processo cicatricial e hemodinâmico (sobrecarga volumétrica), que se instalam desde a fase aguda devido à necrose tecidual. Estas modificações abrangem: hipertrofia e aumento da cavidade ventricular, caracterizando um processo conhecido como “remodelamento cardíaco” (Ellis e cols., 1962; Factor, 1990; Pfeffer & Braunwald, 1990).

Pacientes com ICM apresentam, clinicamente, arritmias ventriculares, “angina pectoris” e insuficiência cardíaca, principalmente em infartos de grande extensão (Julian, 1989; Morris e cols., 1990) e tornam-se vulneráveis à morte súbita (Hagstrom e cols., 1964; Panidis & Morganroth, 1983; Kempf & Josephson, 1984). Nos primeiros 5 anos pós-infarto a taxa de mortalidade destes pacientes alcança entre 5 e 10% ao ano (Norris e cols., 1974; Kannel e cols., 1979; Pohjola e cols., 1980) e a incidência de morte súbita encontra-se aumentada, sobretudo devido à ocorrência de arritmias ventriculares complexas, ou seja, batimentos prematuros repetitivos acoplados, multifocais, ou precoces e surtos de taquicardia ventricular (Kotler e cols., 1973; Ruberman e cols., 1981). Há, também, baixa velocidade de condução na região próxima ao infarto (Wiener e cols., 1982; Marchlinski, 1990).

Um grande desafio médico-científico é tentar cessar ou atenuar essa progressão inevitável do infarto do miocárdio para a fase crônica, que evolui para a falência cardíaca.

1.4. Terapia celular

A deficiência quantitativa de cardiomiócitos e o remodelamento progressivo representam o estágio final de falência cardíaca causado por várias etiologias (Li e cols., 1993). A possibilidade de intervir nesse processo de doença restritiva cardíaca (infarto cicatrizado do miocárdio - icm) se torna extremamente interessante, sobretudo sob o ponto de vista de melhora do débito sistólico e, em última análise, da função cardíaca em geral.

Uma das mais atrativas possibilidades de conduta terapêutica, e que vem recebendo bastante atenção, é a reconstituição do miocárdio danificado pelo transplante de células saudáveis, a chamada cardiomioplastia celular (Marelli e cols., 1992; Chiu e cols., 1994), onde um tipo celular apropriado é transplantado a um miocárdio recipiente com injúria, atingindo com isso, a base fisiopatológica da falência cardíaca congestiva e criando uma importante estratégia de aumento do número de células e da função contrátil do coração em falência. Em consonância com essa idéia, vários estudos têm sido realizados nos últimos anos em modelos animais e até mesmo em seres humanos, utilizando-se diferentes tipos celulares para demonstrar a viabilidade desta atrativa abordagem terapêutica. Assim, fibroblastos (Sakai e cols., 1999a; Hutcheson e cols., 2000), células cardíacas adultas (Li e cols., 2000; Li e cols., 1999a), cardiomiócitos atriais autólogos (Sakai e cols. 1999b), cardiomiócitos fetais (Koh e cols., 1993; Soonpaa e cols., 1994; Li e cols., 1996), mioblastos esqueléticos (Marelli e cols., 1992; Chiu e cols., 1995; Taylor e cols., 1998;

Kessler e cols., 1999; Scorsin e cols., 2000; Menasche e cols., 2001), mioblastos imortalizados (Robinson e cols., 1996), células-tronco embrionárias (Klug e cols., 1996; Min e cols. 2002), células-tronco mesenquimais de medula óssea (Wang e cols., 2000a; Wang e cols., 2001; Olivares e cols, 2004), células-tronco hematopoiéticas (Tomita e cols., 1999; Liechty e cols. 2000), células-tronco derivadas de fígado de rato adulto (Malouf e cols., 2001), precursores de células endoteliais derivados de medula óssea humana (Kocher e cols., 2001), células endoteliais diferenciadas (Kim e cols., 2001), células musculares lisas (Li e cols., 1999b) e células mononucleares de medula óssea (Perin e cols, 2003) vêm sendo testados.

Porém, mesmo com a diversidade de candidatos, a melhor escolha quanto ao tipo celular doador permanece controverso e o efeito benéfico do transplante celular vem sendo demonstrado sem evidência de que as células implantadas contraem sincronicamente com o coração receptor. Outrossim, a técnica de injeção de células diretamente no coração constitui-se em um procedimento altamente invasivo.

As possíveis complicações associadas a uma cirurgia para injeção de células diretamente no tecido cardíaco levaram alguns autores a buscar alternativas que transpusessem essa dificuldade. Taylor e cols. (1997) e Suzuki e cols. (2001) injetaram mioblastos esqueléticos e Wang e cols. (2001) injetaram células de estroma de medula óssea nas coronárias de modelos animais experimentais e verificaram que essas células eram capazes de repovoar o tecido danificado e sobreviverem no coração hospedeiro. Entretanto, estes estudos não analisaram a função dos corações que receberam o transplante celular.

Esses foram os primeiros passos na tentativa de se determinar a migração das células implantadas na circulação para o tecido cardíaco lesionado. Na realidade, em 1992

Neumeyer e cols. já haviam testado a infusão de mioblastos de músculos esqueléticos na circulação periférica com o intuito de mostrar a presença dessas células nos sítios de lesão de músculo esquelético, induzidos experimentalmente. O transplante de células-tronco na circulação para regeneração muscular esquelética também foi documentado por Gussoni *et al.* (1999). Foram injetadas na circulação de camundongos transgênicos *mdx* (desordem degenerativa muscular progressiva) células-tronco de medula óssea de camundongos normais. As células injetadas tiveram a capacidade de restaurar a expressão de distrofina, proteína ausente em camundongos *mdx*, sugerindo que houve realmente uma migração e uma estimulação de diferenciação das células da medula em células musculares capazes de expressar distrofina.

Recentemente, alguns trabalhos vêm direcionando seu foco para o tratamento de doenças cardiovasculares através da administração de citocinas, visto que o processo inflamatório criado em reação à lesão isquêmica desencadeia a liberação de citocinas das mais diversas variedades, que servirão de sinalização para a proliferação e atração das células do sistema imune. Fatores estimuladores de colônias vêm sendo estudados como potentes estimuladores da resposta imune e catalisadores da proliferação celular. O fator de estimulação de colônia de granulócitos é o principal potencializador da resposta neutrofílica e, nos últimos anos, vem sendo utilizado como mobilizador de células precursoras da medula óssea para a circulação periférica.

1.5. Fator de estimulação de colônias de granulócitos (G-CSF)

A administração de G-CSF como mobilizador de células precursoras foi utilizada originalmente nos transplantes de medula óssea. Assim como a injeção direta de células-tronco no coração de humanos, o transplante de medula óssea é um procedimento cirúrgico invasivo que causa desconforto e pode causar danos aos pacientes (Buckner e cols., 1984). Estudos recentes têm utilizado células mononucleares de sangue periférico de doadores, mobilizadas por fatores, como substitutas de células da medula óssea em transplantes HLA-idênticos (antígenos leucocitários humanos) no tratamento de doenças malignas. O uso das células da medula óssea apresenta algumas desvantagens em relação à utilização das células do sangue periférico. Uma delas é a submissão do doador aos riscos da anestesia para a coleta da medula, como: hipotensão, hipóxia e parada cardíaca (Buckner e cols., 1984). Outra, é a possível injúria do tecido no procedimento de coleta, incluindo dano ósseo e dano nervoso (Buckner e cols., 1984) e riscos de infecções nos sítios de coleta de medula (Bortin e cols, 1983). Já a coleta de células do sangue periférico pode ser realizada sem a necessidade de hospitalização do doador e não requer anestesia ou cirurgia.

Para lançar mão de células do sangue periférico como substitutas aos transplantes de medula óssea é necessária a mobilização prévia de precursoras para o sangue. Essa mobilização de precursores da medula óssea para a periferia vem sendo obtida através da administração de citocinas como o G-CSF, GM-CSF e o SCF (fator de células-tronco), (Bodine e cols., 1996). O G-CSF tem sido a citocina de maior preferência na mobilização

de precursores para a utilização em transplantes, em face das experiências positivas de administração e pelo seu perfil de baixa toxicidade para doadores normais (Bensinger e cols., 1996).

1.6. Produção de G-CSF e seus efeitos sobre a hematopoíese

O G-CSF é produzido por uma variedade de tipos celulares. Células de linhagem monocítica/macrofágica estão entre as maiores produtoras de G-CSF. No entanto, esse fator também pode ser produzido por células endoteliais (Zsebo e cols., 1988), por fibroblastos (Koeffler e cols., 1987) e por células mesoteliais (Demetri e cols., 1989). A produção de G-CSF pode ser induzida nestas células *in vitro* através de diversos agentes estimulatórios, incluindo LPS (Vellenga e cols., 1988), TNF, IL1, GM-CSF, IL3 (Oster e cols., 1989), IL-4 (Wieser e cols., 1989) e IFN- γ (Herrmann e cols., 1986). Majumdar e cols. (1998) não detectaram uma produção basal de G-CSF ou de GM-CSF, ao contrário do fator de célula-tronco (SCF), nas células do estroma de medula óssea. Contudo, após a exposição das culturas celulares à molécula inflamatória IL-1 α (Aman e cols., 1994; Caldweel), houve um acréscimo considerável na produção de G-CSF, mostrando uma resposta positiva na liberação de G-CSF a processos inflamatórios.

A medula óssea é composta por células hematopoiéticas e células estromais de origem não hematopoiética as quais, junto com a matriz extracelular, formam o chamado micro-ambiente da medula óssea. O micro-ambiente da medula óssea é essencial para o desenvolvimento e para a manutenção das células progenitoras hematopoiéticas que serão ativadas e recrutadas para programas de diferenciação dependentes dos estímulos externos.

A expressão de citocinas, os fatores de crescimento e a secreção de proteínas da matriz extracelular promovem interações célula-célula que norteiam todo esse micro-ambiente favorável (Williams, e cols.,1994).

Em indivíduos sob condições de estresse, com uma infecção ou com altas doses de terapia citotóxica, os níveis de G-CSF aumentam drasticamente. Os níveis plasmáticos de G-CSF variam de acordo com o número de neutrófilos circulantes. Quedas no número de neutrófilos estimulam a expressão de G-CSF (Watari e cols., 1989). Yamada e cols. (2002) relataram um aumento significativo de G-CSF e IL-6 plasmáticos após o exercício físico, considerado um stress fisiológico. Eles verificaram que da mesma forma que os níveis de neutrófilos mantinham-se altos uma e duas horas após o exercício, os níveis de G-CSF também aumentavam com a atividade física. O G-CSF age predominantemente nas células de linhagem neutrofilica. Todavia, a administração de G-CSF aumenta o número de células progenitoras circulantes, abrangendo não somente progenitores mielóides, mas também eritróides, megacariocíticos e progenitores multipotenciais (Tanaka e cols, 1996).

1.7. G-CSF e a mobilização de células precursoras

Morrison e cols demonstraram que o resultado do tratamento de pacientes com G-CSF ocorre em duas fases: uma fase inicial em que se verifica um aumento de mais de dez vezes no número de precursores na medula óssea no terceiro dia de tratamento e uma segunda fase marcada pela abrupta migração destes precursores para a periferia, no quinto dia (Morrison e cols, 1997).

Análise de citometria de fluxo mostrou que as células precursoras do sangue periférico mobilizadas pelo G-CSF têm características de células quiescentes, retratadas pela baixa ou ausente expressão de HLA (To e cols, 1994).

A mobilização e a subsequente saída dos precursores para o sangue são potencialmente mediadas pela ação regulatória do G-CSF nas moléculas de adesão como VLA-4, LFA-1 E CD62L (Mohle e cols, 1993). Os mecanismos envolvidos na mobilização dos precursores ainda são pouco compreendidos e conhecidos. No entanto, essas modificações nas moléculas de adesão podem alterar a capacidade de aderir ao estroma medular, pois as células precursoras interagem com células estromais e com proteínas da matriz extracelular como, por exemplo, a fibronectina, recebendo sinais regulatórios de proliferação e diferenciação. Alguns autores acreditam que as citocinas possam expandir e mobilizar precursores fora da medula óssea (Tavassoli e cols, 1993). Entretanto, outros, baseados no aumento inicial e queda subsequente dos precursores na medula óssea e nas alterações nas moléculas de adesão, crêem que a ação das citocinas se deve ao fato delas induzirem a proliferação de uma sub-população de progenitores medulares, os quais interagem fracamente com o micro-ambiente da medula óssea (Lapidot e cols., 2002).

1.8. Tratamento com G-CSF em modelos experimentais de IM

Como visto, nos últimos 4 anos houve um aumento significativo do número de trabalhos que investigaram a ação do G-CSF em modelos experimentais de Infarto do Miocárdio – IM - sendo o Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho um dos precursores. Em 2002, o Laboratório obteve os

primeiros resultados com o tratamento de ratos infartados. Até aquele momento, poucos estudos haviam investigado a capacidade de regeneração de tecido cardíaco lesionado após o tratamento com fatores de mobilização de colônias, fatores de crescimento ou citocinas. De fato, apenas um grupo de pesquisadores de Nova Iorque, liderados por Donald Orlic, utilizou, em 2001, G-CSF e SCF (Fator de célula-tronco, do inglês *stem cell factor*) como mobilizadores de células da medula óssea na tentativa de recuperar corações de camundongos infartados (Orlic e cols, 2001b). No mesmo ano, Kocher e cols injetaram células humanas mobilizadas por G-CSF em ratos imuno-deficientes.

Em 2002, um grupo norueguês avaliou a expressão de diversos genes de fatores estimulantes de colônias após a indução do IM em camundongos. Portanto, até a defesa da dissertação de mestrado do autor, em agosto daquele ano, apenas o trabalho de Orlic e cols, (2001b) investigara realmente o potencial de tratamento do IM com fatores mobilizadores de células-tronco da medula óssea.

A partir do trabalho de Donald Orlic e cols (2001b), muitos laboratórios em todo o mundo começaram a testar a eficácia do tratamento em infartos experimentais em diversas espécies de animais, tais como: camundongos, ratos, coelhos e primatas. A maioria dos trabalhos experimentais revela uma significativa melhora da função cardíaca após o tratamento com G-CSF apenas, ou em associação com SCF. Entretanto, alguns estudos colocam em xeque os efeitos benéficos da utilização de G-CSF após IM, inclusive os dados obtidos em ratos no trabalho ora apresentado.

O grande divisor de águas para o crescimento de trabalhos com G-CSF e IM foi o ano de 2001: Orlic e cols publicaram dois trabalhos importantíssimos para a comunidade científica que estuda terapia celular. Em abril os mesmos pesquisadores mostraram que a injeção de células Lin⁻ e c-kit⁺ da medula óssea de camundongos GFP⁺ (do inglês,

enhanced green fluorescent protein) em camundongos previamente infartados era capaz de regenerar o tecido lesionado (Orlic e cols, 2001a). Os animais que receberam a injeção de células da medula óssea apresentavam células cardíacas na área onde a lesão fora induzida pela ligadura permanente da coronária esquerda, ao passo que os animais infartados e não tratados apresentavam tecido cicatricial não contrátil. A área onde foram encontrados os miócitos cardíacos foi denominada pelos autores como “área de regeneração miocárdica”. A área em regeneração apresentou marcações para proteínas de canais juncionais específicos de músculo cardíaco, proteínas de músculo liso e proteínas contráteis cardíacas. Os autores concluíram que as células injetadas se diferenciaram em vasos e cardiomiócitos. Além disso, fatores de transcrição como o NKx 2.5 foram detectados nessa área, o que denota a presença de cardiomiócitos cardíacos imaturos, ainda em desenvolvimento (Orlic e cols, 2001b). Resultados semelhantes foram obtidos em agosto, quando G-CSF (50µg/kg/dia) e SCF (200µg/Kg/dia) foram injetados 3 dias antes da obstrução da artéria coronária descendente anterior e por mais 5 dias após a cirurgia. Os pesquisadores construíram a hipótese de que um aumento no número de células Lin⁻ e c-kit⁺ circulantes provenientes da medula óssea poderia aumentar a migração das células ao sítio inflamatório, atraídas pelas citocinas produzidas pela lesão tecidual do coração. Esse tratamento já havia sido descrito na literatura como capaz de aumentar em 250 vezes o número de células Lin⁻ e c-kit⁺ no sangue (Bodine e cols, 1994; Orlic e cols, 1993). Novamente, foi encontrada uma área de regeneração nos animais tratados com os fatores. Foi atribuído ao tratamento uma menor mortalidade dos animais tratados (redução de 68%), um tamanho de infarto menor (em 40%) e uma menor dilatação da cavidade cardíaca (em 26%).

A partir desses dois trabalhos consecutivos, diversos grupos de pesquisa no mundo começaram a dar atenção para essa nova abordagem de terapia com células-tronco - uma

abordagem bem menos invasiva para o tratamento do IM do que a injeção intracárdica ou intracoronariana de células. Na realidade, durante dois anos não houve publicações envolvendo a terapia com G-CSF em modelos animais, até que em dezembro de 2003, Norol e cols. (2003) informaram haver testado a combinação de SCF e G-CSF antes do IM, em macacos *baboons* (primatas). Embora tivesse havido uma grande mobilização de células CD34+ para a circulação periférica e uma melhor perfusão miocárdica nos animais tratados, não houve quaisquer modificações nos parâmetros funcionais ecocardiográficos analisados até dois meses após o tratamento.

O primeiro trabalho com ratos (Askari e cols, 2003) surgiu ainda em 2003. O foco do estudo era a investigação do papel do fator derivado do estroma 1 (SDF-1, *stromal derived factor-1*) para a migração das células mobilizadas por G-CSF (cujo nome comercial é). Os autores injetaram G-CSF oito semanas após a indução do IM e relataram que não houve um aumento da migração das células para o tecido cardíaco lesado e, conseqüentemente, a função cardíaca manteve-se prejudicada independente do tratamento. O SDF-1 é o principal fator de atração das células hematopoiéticas para o seu nicho fisiológico. As altas concentrações de SDF-1 no fígado fetal e, depois, na medula óssea adulta determinam o sítio de hematopoiese do organismo. Deste modo, os autores avaliaram a expressão de SDF-1 após IM e relataram um pico de expressão no sétimo dia. No trigésimo dia, os níveis de SDF-1 eram indetectáveis. Tal evidência poderia explicar o insucesso do experimento anterior. Portanto, eles induziram a expressão de SDF-1 em fibroblastos e injetaram diretamente nos corações de ratos infartados na oitava semana após IM com concomitante mobilização com G-CSF. Quatro semanas após a injeção, o número de células que migraram para o coração foi maior e a fração de ejeção (parâmetro ecocardiográfico de função cardíaca) aumentou. Esses dados indicam que a expressão de SDF-1 é fundamental para a migração celular para o coração infartado e que os tratamentos

com G-CSF deveriam acontecer nas primeiras horas após o IM. Portanto, até aquele momento, dois trabalhos apontavam para uma melhora da função cardíaca devido à mobilização celular em camundongos (Orlic e cols., 2001b) e ratos (Askari e cols., 2003) e outro demonstrava que, mesmo com a mobilização celular, não havia melhora da função cardíaca em primatas (Norol e cols., 2003).

No ano de 2004, motivados pela hipótese de migração das células mobilizadas da medula óssea para o tecido cardíaco danificado, Ohtsuka e cols substituíram as células da medula óssea de camundongos selvagens por células de camundongos transgênicos GFP+. A iniciativa permitiria aos autores identificar as células que migravam para o coração e garantiria que estas células eram provenientes da medula óssea. O estudo também objetivava responder se o tratamento com SCF e G-CSF seria efetivo quando iniciado após a indução do IM e se o efeito combinado desses fatores era perdido quando injetados sozinhos. Logo, experimentaram a injeção de G-CSF e SCF antes e depois do IM e a injeção de G-CSF ou SCF isoladamente após o IM. A curva de sobrevivência apontou para uma mesma taxa de mortalidade nos grupos tratados com ambos os fatores antes e depois do IM e no grupo que recebeu apenas G-CSF. Os animais que receberam apenas SCF e os que não receberam tratamento algum demonstraram uma baixa taxa de sobrevivência ao longo de catorze dias.

Ainda que os autores não tenham observado uma menor área de infarto dos três primeiros grupos (que obtiveram maiores taxas de sobrevivência), a espessura da parede anterior infartada foi maior nesses grupos em relação aos controles (infartados e não tratados) e ao grupo tratado apenas com SCF, corroborando a hipótese de presença de maior área de miocárdio viável e a idéia de uma área em regeneração descrita por Orlic e cols. (2001a e 2001b). Os três grupos experimentais em que se detectou menor mortalidade

apresentaram também maior densidade capilar e um menor grau de apoptose. Reunidos, os dados desse importante trabalho demonstram que os efeitos benéficos do tratamento com os fatores são exercidos, principalmente, pelo G-CSF e que suas ações são ainda eficazes quando administrado após o IM. A presença de células GFP+ no coração também reforça a hipótese de que a mobilização celular é importante e que essas células são atraídas para os corações infartados.

Este mesmo grupo de pesquisadores (Iwanaga e cols, 2004) injetou G-CSF em animais de grande porte (suínos). Vinte e quatro horas após a ligadura permanente da coronária esquerda, injetaram G-CSF por sete dias em suínos e quatro semanas depois observaram uma melhora funcional e um aumento de vasos sanguíneos nas regiões infartadas e adjacentes. Observaram, também, uma menor área infartada, um reduzido número de células apoptóticas e maior expressão do fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF, do inglês *vascular endothelium growth factor*). A expressão de VEGF pelo miocárdio isquêmico era o primeiro indício de que o G-CSF poderia agir diretamente no tecido cardíaco. Inclusive, essa hipótese foi levantada pelos autores citando dados ainda não publicados de que o G-CSF age diretamente nos cardiomiócitos de ratos neonatos *in vitro*. Esses e outros dados foram publicados no ano seguinte e serão apresentados mais à frente.

No próprio ano de 2004, dois trabalhos publicados na mesma edição da revista *Nature* desafiaram a teoria de que as células-tronco hematopoiéticas seriam capazes de se transdiferenciar em células cardíacas (Balsam e cols, 2004 e Murry e cols, 2004). *Transdiferenciação* é o conceito de que uma célula precursora de um determinado tecido consiga adotar o fenótipo de uma célula de tecido diferente. Os dois estudos demonstraram que células-tronco hematopoiéticas não são capazes de adotar um fenótipo cardíaco em

animais infartados, porém com experimentos diferentes e complementares. Balsam e cols. (2004) injetaram três tipos de células de camundongos GFP⁺ descritas como capazes de reconstituir o sistema hematopoiético e são, portanto, células-tronco hematopoiéticas, em camundongos selvagens infartados. Nenhum dos tipos celulares injetados foi capaz de adquirir características de cardiomiócitos. A maioria manteve a expressão da proteína de superfície de membrana CD45, a qual está presente em todas as células hematopoiéticas. Além disso, esses pesquisadores investigaram se células circulantes poderiam migrar e regenerar o tecido infartado. Para tanto, lançaram mão de um modelo de parabiose da circulação sistêmica. Um animal GFP⁺ teve sua circulação compartilhada com a circulação de um animal selvagem infartado. Novamente, nenhum sinal de regeneração foi encontrado e as poucas células encontradas no tecido cardíaco lesionado não eram positivas para marcador específico cardíaco algum. Murry e cols. (2004) injetaram células de camundongos transgênicos que possuíam o gene para a expressão da beta-galactosidase sob controle de um promotor cardíaco-específico. O promotor para expressão da beta-galactosidase era o da proteína alfa-miosina cardíaca. Assim, se as células injetadas começassem a expressar a miosina cardíaca passariam a expressar, ao mesmo tempo, a beta-galactosidase e poderiam ser identificadas pela marcação com X-gal, substrato para a beta-galactosidase. Infelizmente, nenhuma célula positiva para X-gal foi encontrada nos tecidos cardíacos infartados. Além disso, estes pesquisadores substituíram as células da medula óssea de animais selvagens previamente irradiados por células da medula óssea de camundongos GFP⁺ e relataram uma baixa ocorrência dessas células no tecido isquêmico. Esses achados apoiam os dados de Wagers e cols. (2002), que também utilizaram o modelo de parabiose e reportaram haver pouca evidência para o desenvolvimento de plasticidade de células-tronco hematopoiéticas adultas para quaisquer tipos de tecido que não fosse o próprio hematopoiético.

Os trabalhos subseqüentes a estes relatos na revista *Nature* que utilizavam G-CSF no modelo de IM iniciaram, de forma sutil, uma mudança na atenção dada às células-tronco mobilizadas da medula óssea e sua subseqüente diferenciação e regeneração tecidual. Três estudos importantes focalizaram o processo de cicatrização do tecido injuriado após o tratamento com G-CSF (Minatoguchi e cols., 2004; Miki e cols., 2004 e Sugano e cols., 2005).

O primeiro deles poderia ser denominado como um estudo de transição, isto é, avaliou tanto a possibilidade de regeneração cardíaca pela migração das células de medula óssea quanto os eventos da formação de tecido fibroso no miocárdio. Minatoguchi e cols. (2004) foram os primeiros a utilizar o modelo de isquemia e reperfusão, com o objetivo de avaliar o potencial terapêutico do G-CSF. Os pesquisadores mantiveram a coronária ocluída por trinta minutos e permitiram a reperfusão do coração de coelhos. De acordo com os dados funcionais, os animais tratados com G-CSF tiveram um melhora significativa da contratilidade miocárdica. Ao mesmo tempo, os ratos tratados apresentaram maior número de vasos nos primeiros 14 dias pós-isquemia. Para avaliar a migração das células de medula óssea, os autores realizaram punção da crista ilíaca e retiraram parte das células da medula para marcação *ex-vivo* com corante nuclear fluorescente. As células foram, então, injetadas novamente na crista ilíaca dos animais. Catorze dias pós IM e mobilização, foram encontradas células duplo-positivas para o corante nuclear e proteínas expressas por vasos, como a alfa-actina de músculo liso e CD31. Em adição, algumas células co-expressavam a proteína cardíaca Troponina I. Esses dados reforçam o fato de que há migração e regeneração induzida pela nova formação de vasos e células cardíacas a partir das células da medula óssea. Entretanto, nesse mesmo estudo foi demonstrado que a administração de G-CSF aumentou o número de neutrófilos e macrófagos para o tecido lesionado. O aumento desses tipos celulares sanguíneos levou à

maior absorção do tecido necrótico e à maior velocidade no processo de substituição do tecido isquêmico pelo cicatricial. Ao redor da área infartada, a expressão de metaloproteinases (MMP) estava aumentada. Isso poderia explicar uma menor cicatriz e área fibrótica nos ratos tratados. Os autores concluíram que a melhora funcional deveu-se tanto à regeneração tecidual com a formação de novos vasos e células cardíacas provenientes da medula óssea quanto à aumentada reabsorção das células necróticas e à menor extensão da área infartada.

Os outros dois trabalhos (Miki e cols., 2004 e Sugano e cols., 2005) utilizaram ratos e ambos induziram IM através da ligadura permanente da coronária esquerda. Entretanto, Miki e cols., combinaram o tratamento de G-CSF com M-CSF. Nos dois trabalhos os autores relataram uma aumentada expressão de RNAm do agente fibrótico TGF- β_1 e dos principais componentes do tecido cicatricial, colágenos I e III. O tratamento com G-CSF, informaram os autores, acelerou o processo de substituição do tecido cardíaco necrosado por fibroblastos e colágeno (cicatriz), fato que impediu uma dilatação deletéria da câmara cardíaca. A constatação refletiu nas avaliações funcionais. Miki e cols. (2004) avaliaram a capacidade de desenvolver pressão dos corações em resposta a progressivos aumentos de pré-carga (pressão diastólica final do ventrículo esquerdo– PDFVE) em montagem de corações isolados. Corações normais ou submetidos à cirurgia fictícia são capazes de aumentar o seu poder contrátil (aumento da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo) com o aumento da PDFVE de zero para 10 ou 20 milímetros de mercúrio (mmHg). Os animais tratados com G-CSF foram capazes de responder aos aumentos de PDFVE enquanto os animais não tratados exibiram uma queda da função sistólica com o aumento de pré-carga. Sugano e cols. (2005) realizaram as análises funcionais *in vivo* através de ecocardiografia e a análise da pressão intraventricular esquerda. Os ratos tratados exibiram melhora funcional em ambas as análises. Todos os créditos para a

evidente melhoria da função cardíaca foram imputados à indução mais rápida de fibrose pelo G-CSF. Muito embora os dois trabalhos não fornecessem evidências claras da participação direta de miócitos ou fibroblastos cardíacos como atores dos efeitos no processo de cicatrização acelerado induzido por G-CSF, seus dados sinalizavam que cada vez mais evidências experimentais apontavam para a ação direta do fator no coração, e não para a regeneração cardíaca induzida pela mobilização e migração das células da medula óssea. Neste contexto, Fukuhara e cols. (2005) concluíram que as células oriundas da medula óssea contribuem muito pouco para a regeneração miocárdica após o IM.

No ano de 2005, Harada e colaboradores. causaram impacto na comunidade científica somente comparado ao primeiro trabalho publicado por Orlic e cols. (2001b), quatro anos antes. Pela primeira vez foi demonstrada a presença de receptores de G-CSF (G-CSFR) no coração, tanto *in vitro* quanto *in situ*. Tanto os cardiomiócitos quanto os fibroblastos cardíacos apresentavam RNAm para G-CSFR, abrindo o leque de ação do G-CSF para uma ação direta, intracardíaca. A administração de G-CSF em culturas de cardiomiócitos antes da indução de hipóxia, reduziu consideravelmente o número de células apoptóticas. O pré-tratamento com G-CSF aumentava a expressão de proteínas anti-apoptóticas como a *Bcl-1* e *Bcl-xL* através da ativação da via de sinalização *Jak-Stat*, principalmente pela fosforilação da *Stat-3*. Nos experimentos *in vivo*, os pesquisadores observaram um aumento na expressão do G-CSFR nos corações dos animais que sofreram ligadura permanente da coronária esquerda, o que poderia aumentar os efeitos do G-CSF em corações infartados. Os corações infartados tratados com G-CSF apresentavam, também, uma expressão aumentada da *Stat-3* fosforilada, mais uma vez indicando uma ativação da via *Jak-Stat* pela ativação do G-CSFR. Os animais tratados com G-CSF melhoraram a função cardíaca e apresentaram uma menor área de infarto. Animais transgênicos que expressavam o gene dominante negativo para *Stat-3* e receberam G-CSF

não apresentaram diferenças histológicas e funcionais em relação aos animais selvagens não tratados.

Os efeitos benéficos do G-CSF foram similares em fêmeas e machos, mas eram dose e tempo dependentes. Nesse trabalho foram testadas doses de 10 e 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ por 4 dias, iniciadas logo após o IM, e apenas a segunda dose foi bem sucedida. Os efeitos do G-CSF foram atribuídos à menor presença de células apoptóticas no tecido devido ao aumento da expressão de proteínas anti-apoptóticas como *Bcl-2* e *Bcl-xL*, corroborando os achados *in vitro*.

Não satisfeitos em demonstrar de forma contundente que todos os benefícios encontrados após o tratamento de culturas de cardiomiócitos e animais infartados eram dependentes da ativação do G-CSFR e, conseqüentemente, do acionamento de vias de sinalização anti-apoptóticas, Harada e cols. (2005) excluíram qualquer possibilidade de migração celular da medula óssea, de aumento na proliferação de cardiomiócitos residentes ou de ativação das células-tronco cardíacas.

Primeiro, injetaram células da medula óssea de camundongos GFP⁺ em animais selvagens, infartaram os animais hospedeiros e os trataram com G-CSF. O número de células presentes no coração era o mesmo nos animais tratados e não tratados, excluindo a hipótese de migração celular. Segundo, não notaram um aumento na presença de células Ki67⁺ (marcador de ciclo celular) no tecido cardíaco, refutando a proliferação celular dos próprios cardiomiócitos residentes. Terceiro, a administração de G-CSF não aumentou o número de células Sca-1⁺ cardíacas. A população Sca-1⁺ cardíaca foi demonstrada previamente como a população de células-tronco do próprio coração. Desse modo, os autores rejeitaram a hipótese de ativação de células-tronco cardíacas. Inegavelmente, o (excelente) trabalho científico de Harada e cols. (2005) inclinou os holofotes dos

mecanismos de ação do G-CSF em direção aos efeitos diretos no tecido cardíaco e não mais à regeneração induzida pela migração de células-tronco da medula óssea para o coração isquêmico.

Faz-se importante, nesse momento, remeter o leitor aos principais achados até a presente data. A grande maioria dos trabalhos apresentada ao longo desta seção aponta os impactos positivos na função cardíaca com o tratamento de G-CSF antes (Orlic e cols., 2001b e Ohtsuka e cols., 2004) ou depois da indução do Infarto (Askari e cols., 2003; Miki e cols., 2004; Sugano e cols., 2005; Minatoguchi e cols., 2004; Harada e cols., 2005; Iwanaga e cols., 2004), independente do mecanismo de ação. Diversos trabalhos sustentam a idéia de que a mobilização celular é o fator preponderante para a melhora encontrada (Orlic e cols., 2001b; Ohtsuka e cols., 2004; Askari e cols., 2003; Minatoguchi e cols., 2004) e outros preconizam a ação direta no coração como via necessária para a ação do G-CSF (Sugano e cols., 2005; Iwanaga e cols., 2004; Harada e cols., 2005; Fukuara e cols., 2005). Apenas o trabalho de Norol e cols. (2003) falhou em detectar melhorias na função cardíaca de baboons após oclusão da artéria coronária esquerda. Portanto, a literatura corrente aponta para efeitos positivos do G-CSF em animais infartados.

Motivados pelos trabalhos positivos publicados, pesquisadores da Universidade de Leipzig, na Alemanha, interessados em estudar o mecanismo pelo qual o tratamento com G-CSF e SCF induziria a melhora de camundongos infartados, reproduziram o trabalho de Orlic e cols. (2001b) e investigaram o padrão de expressão gênica do tecido cardíaco tratado ou não (Deten e cols., 2005). Além disso, injetaram células Lin⁻ da medula óssea de camundongos machos na veia de fêmeas infartadas. Surpreendentemente, a taxa de mortalidade foi igual entre os grupos tratados ou não com G-CSF e SCF, antes ou depois do IM e no grupo que recebeu células. Pela primeira vez, os animais infartados foram

testados sob condições de estresse. Neste caso, foi induzido estresse farmacológico por infusão de noradrenalina. A extensão do infarto foi similar entre os grupos e todos apresentavam parâmetros hemodinâmicos funcionais abaixo dos ratos falso-operados. O padrão de expressão genética não foi diferente entre os animais tratados com os fatores e, muito menos, nos animais injetados com células da medula. Deten e cols. (2005) reportaram, de maneira consistente, que não há melhora da função cardíaca através do aumento do número de precursores da medula óssea para o sangue periférico. Apesar de não terem averiguado a ação direta do G-CSF e do SCF nos cardiomiócitos, seus resultados negativos também excluem essa via de ação do G-CSF (Deten e cols., 2005).

Em 2006, dois grupos de pesquisadores investigaram o papel do tratamento com citocinas em camundongos infartados (Kanellakis e cols., 2006 e Dawn e cols., 2006). Ao invés da clássica ligadura permanente extensamente utilizada nos trabalhos com IM, o infarto foi induzido através da ligadura transiente com posterior reperfusão. O modelo de isquemia-reperfusão (IR) utilizado nos estudos é exaltado como o mais próximo da clínica, pois os pacientes infartados invariavelmente são submetidos à procedimento para reabertura da coronária afetada. Ao mesmo tempo, a reperfusão poderia facilitar a migração das células, muito embora grande parte dos trabalhos que relataram efeitos positivos do G-CSF tenha empregado a ligadura permanente. Os dois grupos testaram o tratamento com G-CSF e SCF em camundongos selvagens e camundongos quiméricos, os quais sofreram ablação da medula original e substituição por células de camundongos transgênicos, com o intuito de averiguar a migração celular da medula para o coração. Ambos os trabalhos obtiveram sucesso nas análises funcionais e atribuíram a melhora ao aumento de cardiomiócitos e vasos sanguíneos, porém discordaram da origem das células: enquanto Kanellakis e cols. (2006) evidenciaram que as células migratórias da medula óssea permaneciam com seu fenótipo hematopoiético original, os dados de Dawn e cols.

(2006) levaram à conclusão de que os novos cardiomiócitos formados eram oriundos das células dos camundongos doadores que reconstituíram a medula óssea. Contrariando todas as expectativas, o tratamento somente com G-CSF não foi efetivo (Dawn e cols., 2006). Ainda que o mecanismo de ação seja motivo de muita controvérsia, particularmente nos dois trabalhos citados logo acima, o modelo de indução do infarto do miocárdio não parece ser preponderante para o estímulo positivo do tratamento com citocinas.

O leitor é capaz de notar que os estudos envolvendo G-CSF e outras citocinas ainda são alvo de muita controvérsia, apesar de a maioria das pesquisas apontar para uma melhora significativa na função cardíaca. Neste contexto, o Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho vem investigando há algum tempo os possíveis efeitos benéficos do tratamento com G-CSF em ratos infartados através da ligadura permanente da coronária descendente esquerda. Infelizmente, os resultados somam-se aos negativos de Norol e cols., (2003), Deten e cols., (2005) e de Dawn e cols., (2006). O trabalho brasileiro avaliou a função dos corações tanto em condições basais quanto em condições de *estresse* fisiológico. Os dados encontram-se submetidos à revista *Basic Reseach in Cardiology* para publicação.

2. OBJETIVOS

- Avaliar a mobilização celular induzida por G-CSF em ratos normais e infartados.
- Avaliar os efeitos do tratamento com G-CSF em ratos infartados em condições basais através de eletrocardiograma, ecocardiograma e cateterismo.
- Analisar o impacto do tratamento com G-CSF na função sistólica de ratos infartados em condições de estresse fisiológico, em exercício físico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Ratos machos Wistar singênicos pesando entre 200 e 250g foram obtidos do biotério do Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz da FIOCRUZ – Bahia/BA. Eles foram divididos em três grupos: o grupo falso-operado, que foi submetido a todos os procedimentos cirúrgicos dos ratos infartados exceto pela ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda; o grupo infartado e tratado com G-CSF e o grupo infartado não tratado com G-CSF. Os procedimentos de manipulação dos animais foram em conformidade com o comitê de uso de animais do IBCCF.

3.2. Técnica de indução do infarto do miocárdio

O infarto experimental em ratos foi obtido como descrito por Johns & Olson (1954) e Selye e cols (1960). Assim, após anestesia com éter dietílico PA (Merck), os animais foram fixados em uma pequena mesa cirúrgica de madeira revestida por fórmica em decúbito dorsal, tricotomizados em nível torácico e, em seguida, submetidos ao procedimento cirúrgico que se segue: incisão da pele em nível para-esternal esquerda de aproximadamente 1cm de comprimento e localizada a 1cm da linha esternal média, na junção dos terços inferior e médio da distância entre a clavícula e o rebordo costal. Em seguida, os músculos peitoral maior e menor foram dissecados para melhor visualização do

gradil costal esquerdo. Neste momento, foi feita uma sutura em bolsa da pele e dos músculos da região, deixando o nó aberto até o término da cirurgia. Com o auxílio de uma pinça hemostática reta foi feita a incisão entre o 4º ou 5º espaço intercostal esquerdo, através do qual o coração era exteriorizado por meio de uma compressão manual torácica direita. Após a localização da artéria coronária esquerda, a oclusão foi feita com fio de seda 6-0 através de um nó duplo o mais próximo possível de sua origem na aorta (Figura 1). Em seguida, o coração foi recolocado rapidamente em sua posição anatômica original e o nó da sutura em bolsa foi finalmente apertado. Caso fosse necessário, os animais eram submetidos à ventilação mecânica através de um pequeno ambú de fabricação doméstica.

Os animais controles da cirurgia de infarto (falso operado – FO) foram submetidos à cirurgia fictícia. Todos os passos descritos acima foram feitos, porém os fios não foram apertados em volta da coronária, ou seja, o fio de sutura era passado pelo músculo cardíaco sem promover o nó cirúrgico.

Os animais foram mantidos em observação até o momento do tratamento. Trinta e cinco por cento (35%) dos animais morreram durante ou minutos após a cirurgia.

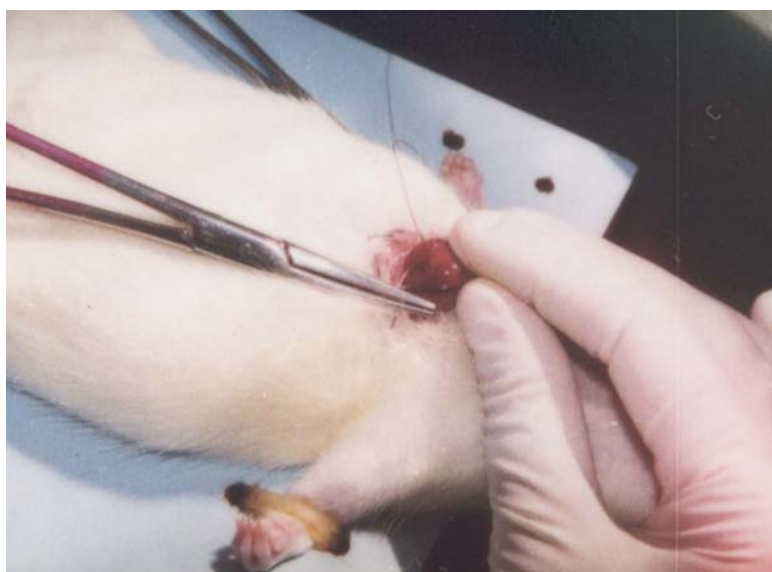


Figura 1 – Modelo de infarto experimental em ratos

3.3. Tratamento com G-CSF e mobilização celular

Três tipos diferentes de tratamento foram tentados no nosso trabalho em ratos infartados. Em todos os tratamentos, foi injetado G-CSF (Filgrastin[®] - Biossintética LTDA), em 200µl de solução glicosilada (5%) por via subcutânea. Os ratos não tratados receberam o mesmo volume de veículo.

No primeiro grupo experimental (**grupo I**), 50 µg/kg/dia de Filgratim foram injetados três horas após o IM por cinco dias consecutivos. No segundo (**grupo II**), a primeira injeção de 50 µg/kg/dia de Filgrastim foi dada no terceiro dia pós IM e continuou por 5 dias. No terceiro (**grupo III**), 100 µg/kg/dia de G-CSF foram injetados 3 horas após a ligadura, duas vezes por dia, durante uma semana.

Nos dois primeiros grupos tratados com 50 µg/kg/dia de G-CSF, 10µl de sangue foram coletados e diluídos em solução de lise (ácido acético 2%) para a contagem dos leucócitos totais na câmara de Neubauer. Cinco microlitros de sangue foram utilizados para o esfregaço sanguíneo e corados com a solução de Wright-Giemsa para identificação dos tipos celulares sanguíneos. Um total de 100 células foi contado em cada esfregaço, assim, o percentual de linfócitos e neutrófilos foi quantificado. Nos grupos I e II o sangue foi coletado antes do tratamento, 3 e 5 dias após o início do tratamento. No grupo III, o sangue foi coletado apenas no sétimo dia. Todas as amostras sanguíneas foram adquiridas 2 horas após a injeção do dia.

Para confirmar o poder de mobilização do G-CSF e averiguar se nosso tratamento era capaz de elevar o número de células precursoras hematopoiéticas na circulação, cinco ratos normais foram tratados com G-CSF pelo mesmo tempo e dosagem do grupo III. Um dia antes e no sétimo dia de tratamento, os leucócitos totais foram contados em

hematocítômetro clínico automático (Coulter T890) e $5-8 \times 10^5$ células foram duplamente marcadas com anticorpos para as proteínas CD-34 (conjugado à ficoritrina – CD34-PE - clone ICO 115, Santa Cruz Biotechnology) e CD45 (conjugado à fluoresceína – CD45-FITC - Caltag Laboratories, Burlingame, CA) por 20 minutos protegidas da luz. Depois da marcação, as células foram incubadas com solução de lise por 20-30 minutos, também protegida da luz, e analisada no citômetro de fluxo (FACSCalibur, Becton-Dickinson).

3.4. Registros eletro (ECG) e ecocardiográficos (ECO).

Os registros de eletrocardiograma e de ecocardiograma foram realizados três horas após o IM em todos os grupos, portanto, antes do tratamento. No **grupo I**, o ECG e o ECO foram repetidos 2 (14d), 4 (28d), 6 (42d) e 10 (70d) semanas pós o IM. No **grupo II**, essas ferramentas foram reutilizadas 1 (7d), 2 (14d), 4 (28d), 6 (42d) e 10 (70d) semanas após o IM. No **grupo III**, ECG e ECO foram novamente realizados 3 (21d) semanas após o IM.

Os animais foram anestesiados com uma combinação de cloridrato de Ketamina (Dopalen[®]) na dose de 50mg/kg e cloridrato de Xilazina (Amasedan[®]) na dose de 5mg/kg intraperitonealmente na mesma seringa. Após a perda dos reflexos postural e locomotor, o registro do ECG de superfície era realizado com os animais na posição de decúbito dorsal sobre uma mesa de madeira. As patas dianteiras foram fixadas com fita adesiva na mesa, perpendicularmente ao corpo. Os quatro eletrodos para as derivações do plano frontal do eletrocardiógrafo convencional (Cardimax FX-2111 – Fukuda Denshi) foram conectados às agulhas hipodérmicas inseridas sob a pele dos animais. As derivações utilizadas foram: as derivações clássicas do plano frontal D1, D2, D3, aVR, aVL e aVF; O aparelho foi

calibrado para a velocidade de 50 mm/s e voltagem de 20mm = 1mV. O posicionamento dos animais foi rigorosamente padronizado para diminuirmos a variabilidade dos registros entre eles, sobretudo para os cálculos dos vetores médios de despolarização ventricular. A presença de onda Q na derivação D1 e o desvio do eixo de despolarização ventricular para direita ($>90^\circ$) foram usados como evidência de infarto.

Em seguida, foi realizada a tricotomia da região torácica e os animais foram colocados em decúbito lateral esquerdo ou decúbito dorsal para a realização do exame ecocardiográfico. Os exames foram realizados em um equipamento comercialmente disponível (Megas - Esaote) que permite a obtenção de imagens nos modos unidimensional e bidimensional. Foi utilizado um transdutor de 10 MHz e as imagens foram armazenadas no próprio aparelho para posterior análise.

A análise ecocardiográfica foi realizada por um único observador que desconhecia a procedência dos animais e os grupos experimentais aos quais eles pertenciam.

Imagens do eixo transversal do ventrículo esquerdo foram realizadas ao nível dos músculos papilares para a obtenção das medidas Bidimensionais e no Modo-M (Figura 2).. Os diâmetros do ventrículo esquerdo (VE) em diástole (DDVE) e em sístole (DSVE) foram mensurados no Modo-M e as áreas do VE em diástole (ADVE) e em sístole (ASVE) as foram em imagens bidimensionais. A função sistólica dos animais foi expressa pela fração de encurtamento ($FE (\%) = [(DDVE - DSVE) / DDVE] * 100$) e pela fração de encurtamento de area ($FEA (\%) = [(ADVE - ASVE) / ADVE] * 100$) (Figuras 2 e 3)

Para assegurar a semelhança da extensão dos infartos induzidos em todos os animais, mensuramos o percentual da parede do ventrículo esquerdo que não apresentava sinais de espessamento no grupo III (contração). Chamamos essa medida de percentual de acinesia do VE (AVE%).

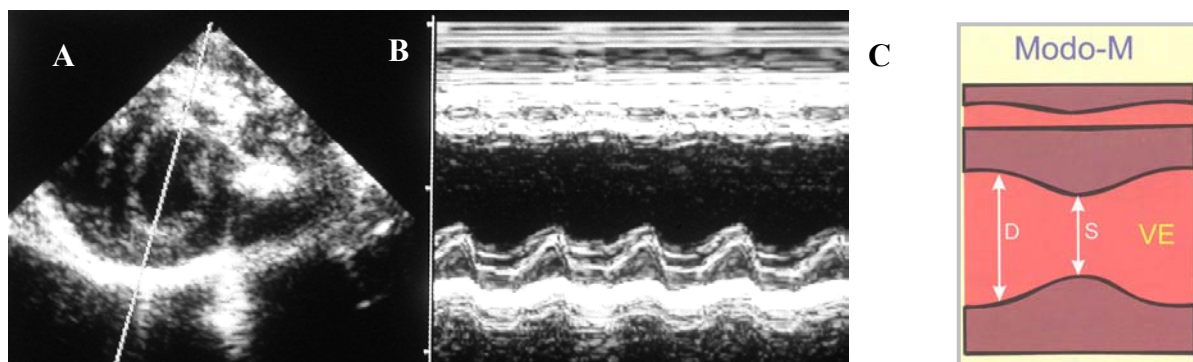


Figura 2 - Medida de fração de encurtamento no ecocardiograma. (A) Modo bidimensional de um corte transversal do VE na altura dos papilares. (B) Modo M guiado pelo bidimensional em A. (C) A partir da relação do diâmetro do VE em sístole e em diástole é calculada a fração de encurtamento ($FE = (DDVE - DSVE) / DDVE * 100$)

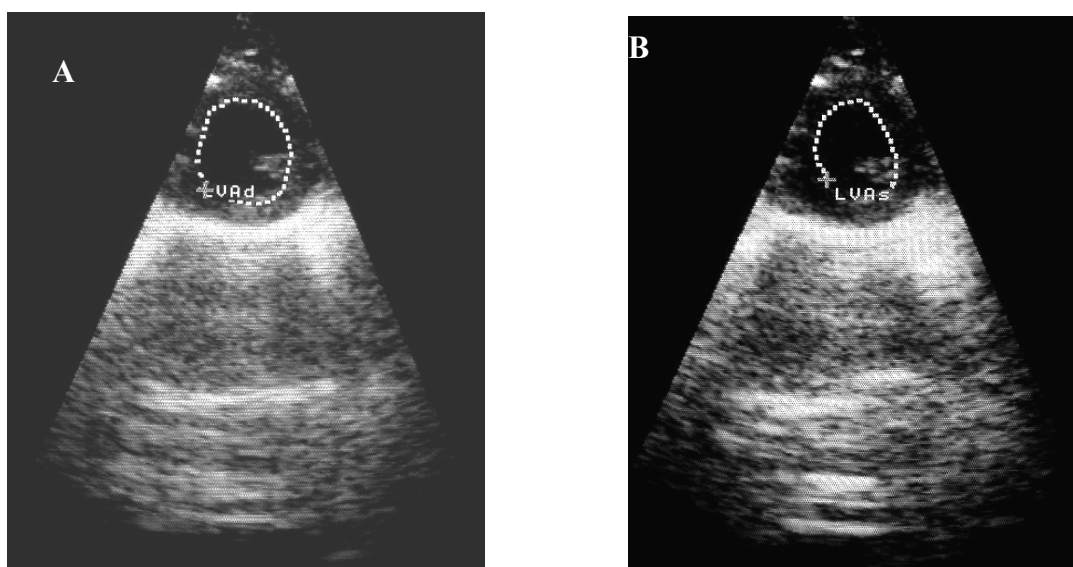


Figura 3 - Cálculo da fração de encurtamento de área (FEA). (A) Tracejado da área de um animal infartado em diástole. (B) Tracejado da área do mesmo animal em sístole. $FEA = (ADVE - ASVE) / ADVE * 100$

3.5. Análises hemodinâmicas

Os animais foram anestesiados com quetamina/xilazina e uma cânula P10 foi inserida no VE através da artéria carótida direita. A ponta oposta à cânula foi exposta dorsalmente entre as escápulas. Depois de 24 horas do procedimento cirúrgico, a cânula foi conectada a um transdutor de pressão (MLT380/D, instrumentos/ADI) associado a um sistema de aquisição Power-Lab400 (instrumentos/ADI) (Figura 4A). Após um período de adaptação de 30 minutos, iniciou-se a aquisição da pressão ventricular esquerda com os animais acordados (Figura 4B) Quatro animais tratados e um não tratado morreram durante a manipulação no sistema de aquisição. Apenas os animais do grupo III foram submetidos às análises hemodinâmicas no dia 21. Avaliamos a pressão sistólica final do VE (PSFVE), a pressão diastólica final do VE (PDFVE), pressão desenvolvida do VE ($PDVE = PSFVE - PDFVE$), o índice de contratilidade ($+dp/dt$) e relaxamento ($-dp/dt$) cardíacos (Figura 4C) em 10 batimentos cardíacos consecutivos.

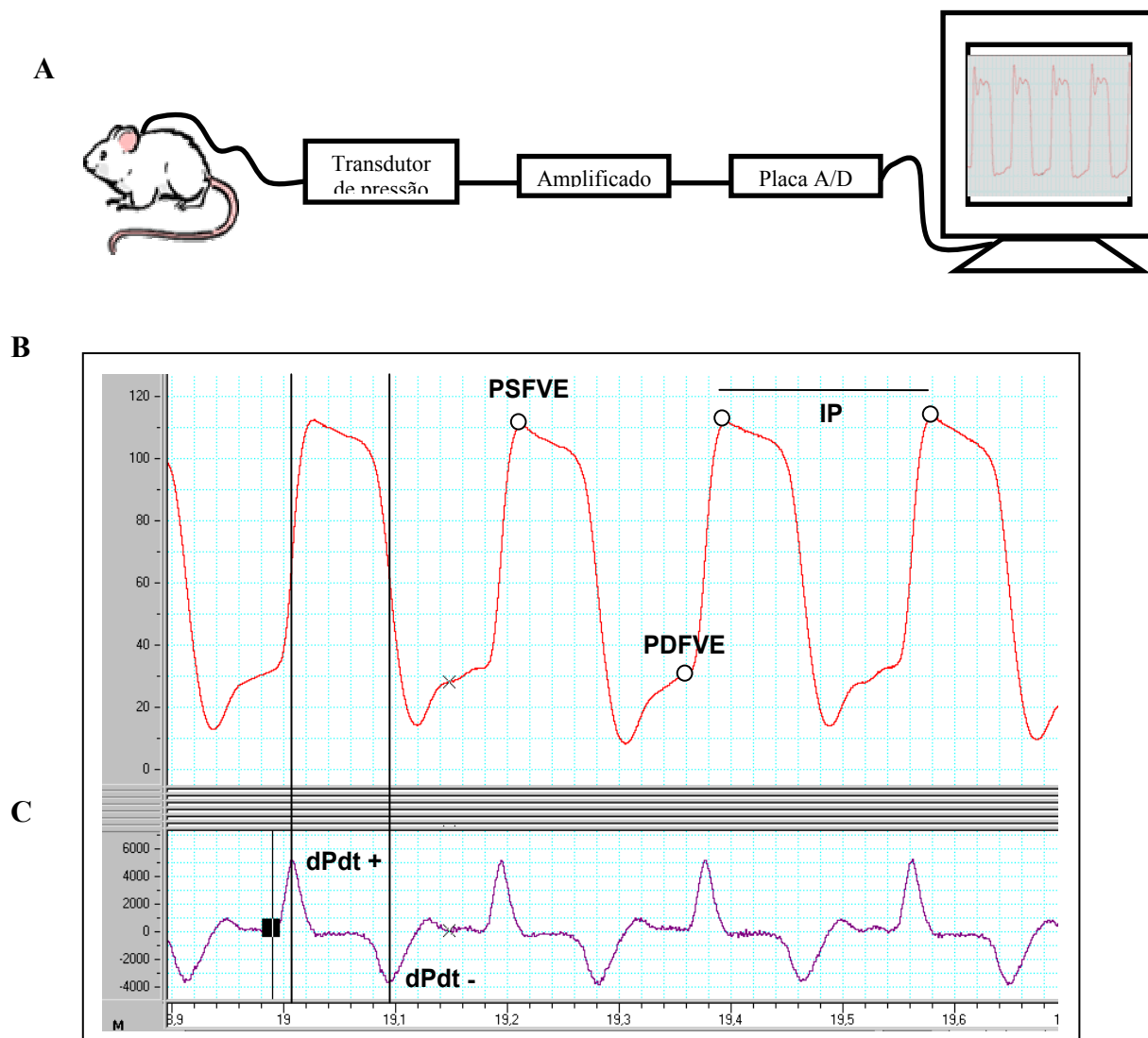


Figura 4 - Sistema de registro das pressões intraventriculares (A) Cânula inserida diretamente no VE ligada ao sistema de aquisição. (B) Registro das pressões ventriculares. (C) Derivada da curva de pressão sobre o tempo.

3.6. Teste cardiopulmonar

Os animais do grupo III foram pesados antes do exame no vigésimo dia. Um esteira de ratos vedada completamente (AccuScan Instruments, Model LC2/M, USA) foi utilizada para exercitar os animais. A velocidade do fluxo por todo o sistema foi padronizado em 680ml/min e o ar foi direcionado para um analisador de oxigênio (Sable Systems FC-1B O2 e Analisadores CA-2^a C O2, USA) para medir o consumo máximo de oxigênio (VO₂max). O teste foi realizado a uma inclinação fixa de 10° (esteira Accupacer, Accuscan Instruments, Inc. Columbus, Ohio, USA) e a temperatura ambiente foi mantida em 22° C. O protocolo de exercício máximo foi adaptado para animais infartados (Henderson e cols, 2002). Em resumo, cada rato passou por período de adaptação à corrida (5 minutos a uma velocidade de 17cm/s) de 3-4 dias antes do teste de esforço. No quinto dia, cada rato foi testado para a capacidade máxima de exercício. O consumo de oxigênio basal foi medido por 10 minutos antes do início do teste. O teste foi iniciado com uma velocidade de 17cm/s e uma inclinação constante de 10°. A velocidade da esteira foi aumentada em 2cm/s a cada 2 minutos e cada rato correu até a exaustão. A cada dois minutos o consumo de oxigênio era medido. Estímulos elétricos no fundo da esteira mantinham os ratos em exercício. O critério de exaustão foi determinado pela incapacidade do animal em sair da área de choque. O consumo de oxigênio a cada momento foi obtido pela seguinte fórmula:

$$\text{VO}_2 = [(\%O_2 \text{ exercício máximo} - \%O_2 \text{ basal}) \times 680 \text{ ml/min}] / \text{peso (Kg)/100}$$

Considerou-se o consumo máximo de oxigênio aquele obtido durante o exercício máximo. O mesmo protocolo foi repetido com 7 dias de intervalo em oito animais normais para assegurar a sua reprodutibilidade ($r = 0,82$).

3.7. Histopatologia

Depois da realização de toda a análise da função cardíaca, os animais foram sacrificados e tiveram seus corações retirados para análise histopatológica. Os corações foram parados em diástole pela injeção de KCI 10 % e a fixação dos corações foi efetuada por perfusão com paraformaldeído a 4% em tampão fostato. Os ventrículos foram seccionados em quatro partes do ápice até a base (A, B, C e D, respectivamente). Cortes de 5 μ m da fatia C foram corados com Picrosyrius (syrius vermelho) para avaliação do infarto. O tamanho do infarto foi determinado através de planimetria computadorizada (ImageJ version 1.27z, National Institute of Health, USA) na seção C (Spadaro e cols, 1980), na altura dos músculos papilares.

3.8. Análise estatística

A análise estatística foi utilizada para a comparação dos resultados apresentados pelos grupos experimentais. Para comparação entre dois grupos, foi utilizado o test t de *student*. Nos experimentos onde foram comparados três ou mais grupos, o teste de *ANOVA Oneway* foi empregado, complementado pelo pós teste de *Bonferroni*. O grau mínimo de significância considerado foi 95 % ($p < 0.05$) e os cálculos foram realizados no

computador, utilizando para tanto, o programa Graphpad Prizm (New York, EUA). Todos os valores foram representados como média \pm dp (desvio padrão).

4. RESULTADOS

4.1. Grupo I

4.1.1. Contagem de Leucócitos periféricos e Ecocardiograma

A partir dos trabalhos desenvolvidos pelo grupo liderado por Orlic e cols. (2001a e 2001b), nosso laboratório resolveu investigar o tratamento de ratos infartados. As grandes limitações do trabalho de Orlic e cols. (2001b) eram a esplenectomia dos animais e o fato do tratamento iniciar-se antes da indução experimental do IM. Então, no nosso primeiro grupo experimental testamos 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ de G-CSF em ratos, 3 horas após a ligadura da coronária esquerda por cinco dias.

Os ratos tratados com G-CSF exibiram uma significativa mobilização de leucócitos na circulação sanguínea já no terceiro dia de tratamento e foi mantida no quinto dia. (Figura 5a). Antes do tratamento não houve diferença no número de leucócitos entre o grupo tratado (G-CSF) e não tratado (NT) (6678 ± 1425 vs 7369 ± 1849 cels/ mm^3 , respectivamente; $p > 0,05$). Entretanto, o grupo que recebeu a injeção de G-CSF aumentou, no terceiro dia, para 19190 ± 4264 cels/ mm^3 , e, no quinto dia, para 17490 ± 6915 cels/ mm^3 . O aumento foi sempre significativo em relação ao número antes do tratamento e aos ratos não tratados ($p < 0,001$: 8865 ± 1965 cels/ mm^3 no dia 3 e 6877 ± 1519 cels/ mm^3 no dia 5).

Essa mobilização foi comparável aos ratos normais (Figura 5b) que saíram de 8507 ± 2508 para 18720 ± 4732 (3d) e 20320 ± 6637 (5d) cels/mm^3 . Nenhum animal morreu durante o tratamento. Esses dados sugerem que o G-CSF foi capaz de induzir leucocitose tanto em ratos normais quanto em ratos infartados.

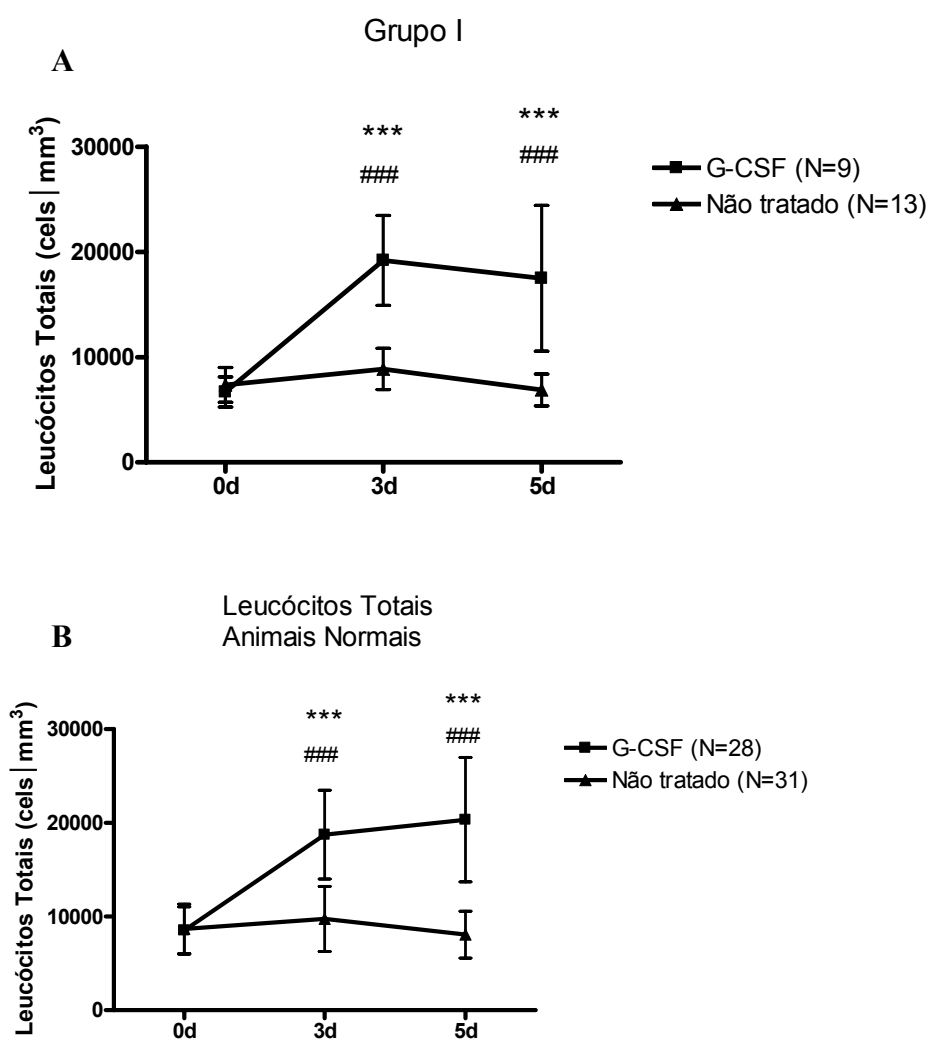


Figura 5 - (a) Leucócitos sanguíneos totais dos animais do grupo I ($50 \mu\text{g}/\text{Kg}/\text{dia}$ - 3 horas após o infarto); (b) Leucócitos sanguíneos totais dos animais normais tratados da mesma maneira. O dia zero representa o antes do tratamento com G-CSF *** $p < 0,001$ em relação aos não tratados e ### $p < 0,001$ em relação aos níveis basais.

As análises ecocardiográficas demonstram que os animais infartados apresentavam FE deteriorada na primeira análise com 3h em relação ao FO ($59\pm 6\%$ nos FO, $31\pm 9\%$ nos G-CSF e $25\pm 8\%$ nos NT, $p < 0,001$ em relação ao FO) e não houve diferença entre os grupos infartados, independente do tratamento (Figura 6a). O padrão de incapacidade sistólica se manteve até a décima semana de acompanhamento (FO – $61\pm 8\%$; G-CSF – $20\pm 5\%$ e NT – $21\pm 6\%$; $p < 0,001$ em relação ao FO). Três horas após a cirurgia os animais infartados não apresentavam sinais de dilatação da cavidade do ventrículo esquerdo (DDVE: FO – $6,1\pm 0,5\text{mm}$; G-CSF – $6,6\pm 0,5\text{mm}$; NT - $7,0\pm 1,0\text{mm}$), entretanto, o DDVE progressivamente aumentou e na décima semana os animais infartados apresentavam uma maior DDVE em relação aos FO (Figura 6b). Novamente, não houve diferença significativa entre o grupo tratado e não tratado (DDVE: FO – $6,6\pm 0,7\text{mm}$; G-CSF – $9,6\pm 1,6\text{mm}$; NT – $9,5\pm 0,7\text{mm}$; $p < 0,001$ em relação ao FO).

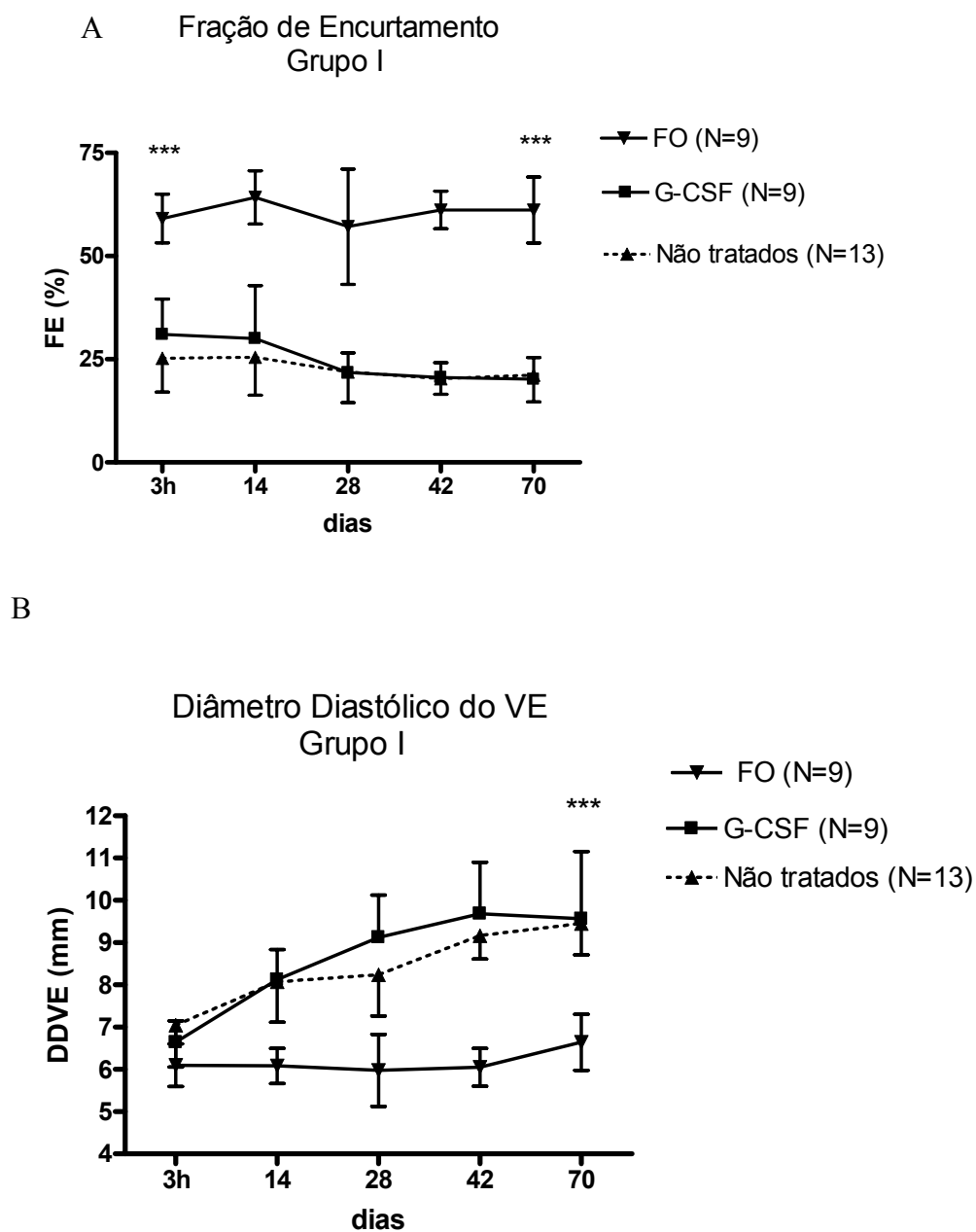


Figura 6 - Acompanhamento Ecocardiográfico do Grupo I. (A) Fração de Encurtamento (b)

Diâmetro Diastólico do VE *** $p < 0,001$ em relação ao falso operado (FO)

Os resultados do grupo I mostram claramente que não houve melhora da função cardíaca mesmo com a evidente mobilização celular. Partimos, então, para iniciar a mobilização celular no terceiro dia pós infarto com o intuito de mobilizarmos as células em um momento de menor processo inflamatório no tecido cardíaco. A mobilização de células precursoras acontece principalmente a partir do terceiro dia de tratamento, período este em há um intenso sítio de inflamação, que poderia inviabilizar a sobrevivência das células da medula óssea no coração. Iniciando o tratamento no terceiro dia, o processo inflamatório tecidual poderia ser menor, porém ainda efetivo como atrator das células precursoras. Portanto, decidimos realizar o grupo II.

4.2. Grupo II

4.2.1. Contagem de leucócitos periféricos e ecocardiograma

A mobilização de leucócitos para a periferia, como esperado, do grupo II foi semelhante à demonstrada no grupo I e nos ratos normais. Os animais infartados e tratados com G-CSF por cinco dias saíram de valores basais de 8727 ± 2511 cels/mm³ para 18710 ± 4298 cels/mm³, no terceiro dia, e para 22480 ± 7979 cels/mm³; $p < 0,001$ em relação ao valor basal tanto no dia 3 quanto 5, Figura 7). Os animais infartados e não tratados dos grupos I e II não diferiram entre eles (dados não mostrados). Portanto, foram utilizados como controles para os grupos I e II.

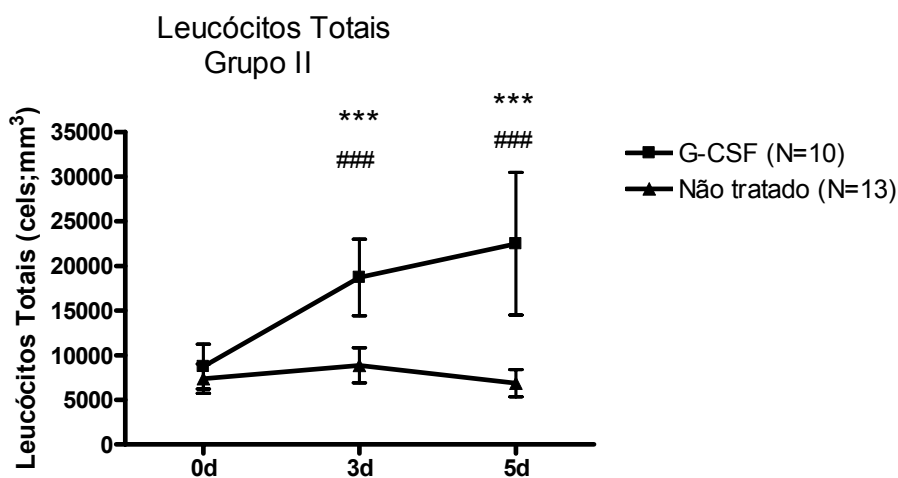
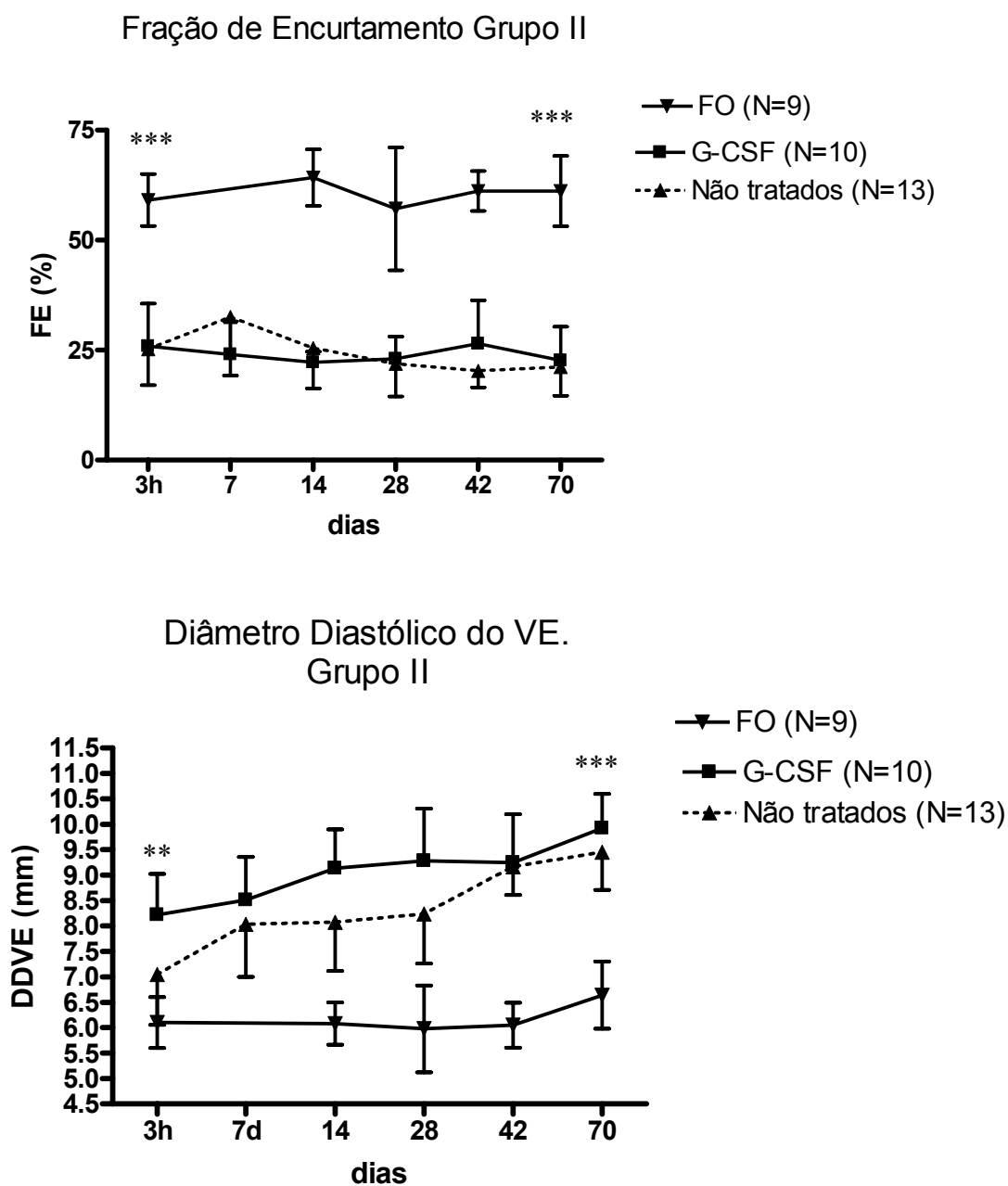


Figura 7 - Leucócitos no grupo II. O dia zero representa antes do início do tratamento com G- CSF.

*** $p < 0,001$ em relação aos não tratados e ### $p < 0,001$ em relação aos níveis basais.

Semelhante ao grupo I, as análises ecocardiográficas da Figura 8 demonstram que os animais infartados apresentavam FE deteriorada na primeira análise com 3h em relação ao FO ($59 \pm 6\%$ nos FO, $26 \pm 10\%$ nos G-CSF e $25 \pm 8\%$ nos NT, $p < 0,001$) e não houve diferença entre os grupos infartados, independente do tratamento. A função sistólica deteriorada se manteve até a décima semana de acompanhamento (FO – $61 \pm 8\%$; G-CSF – $23 \pm 8\%$ e NT – $21 \pm 6\%$; $p < 0,001$ em relação ao FO). Três horas após a cirurgia os animais infartados, antes do tratamento, que fizeram parte do grupo tratado, apresentavam sinais de dilatação da cavidade do ventrículo esquerdo em relação ao FO (DDVE: FO – $6,1 \pm 0,5$ mm vs G-CSF – $8,2 \pm 0,8$ mm, $p < 0,001$), porém sem diferença em relação ao grupo infartado não tratado (G-CSF – $8,2 \pm 0,8$ mm vs NT - $7,0 \pm 1,0$ mm). Entretanto, o DDVE progressivamente aumentou e na décima semana os animais infartados apresentavam uma maior DDVE em relação aos FO. Novamente, não houve diferença significativa entre os grupos tratado e

não tratado (DDVE: FO – $6,6\pm 0,7\text{mm}$; G-CSF – $9,9\pm 0,7\text{mm}$; NT – $9,5\pm 0,7\text{mm}$; $p < 0,001$ em relação ao FO).



Os dados dos grupos I e II não corroboravam a corrente hipótese de migração celular para o coração. Ohtsuka e cols., (2004) se disponibilizaram a responder as mesmas perguntas que nós fizemos ao elaborar o grupo I e II. Ao contrário dos nossos resultados, eles obtiveram sucesso ao tratar camundongos infartados após o IM e com o baço intacto.

Algumas perguntas vieram à tona sobre os nossos experimentos, tais como: será que o ecocardiograma não é sensível suficiente para detectar diferenças mínimas entre os grupos? Acordados, os animais exibiriam função cardíaca diferenciada, ao invés de anestesiados para as análises do ECO? Sob condições de estresse, será que os corações dos animais tratados responderiam de forma melhor do que os não tratados? Será que a dose de G-CSF administrada até este momento é pequena para ratos? Será que nosso tratamento efetivamente mobiliza células precursoras para a periferia?

4.3. Grupo III

4.3.1. Contagem de leucócitos e células CD34⁺

Para responder estas questões, foi iniciado mais um grupo experimental (grupo III). A dose de Filgrastim foi aumentada para 100µg/kg e administrada duas vezes ao dia por uma semana (200µg/kg/dia). Conforme descrito em Materiais e Métodos, foi analisado o número de células CD34⁺ no sangue além do número de leucócitos totais em cinco ratos normais. Vinte e um dias após o IM, além da ecocardiografia, foram mensuradas as pressões intracardíacas em animais acordados e realizado teste de esforço máximo.

Conforme esperado, o grupo tratado com G-CSF exibiu um enorme aumento no número de leucócitos circulantes (54920 ± 20150 vs 12590 ± 2512 cels/mm³, $p < 0,001$; Figura 9A) e no percentual de neutrófilos ($39.7 \pm 13.5\%$ vs $63.8 \pm 23.5\%$, $p < 0.01$; Figura 9B) quando comparado ao grupo controle não tratado. Esses valores se repetiram com animais normais, não infartados, que foram tratados com G-CSF. Nestes animais, os leucócitos aumentaram de 8520 ± 2178 (antes do tratamento) para 32500 ± 11090 cels/mm³ (após tratamento, $p < 0.01$) e o percentual de neutrófilos aumentou de valores basais de $30.2 \pm 8\%$ para $58.6 \pm 16.7\%$ após o tratamento ($P < 0.01$). O tratamento com G-CSF induziu um incremento no número de células CD34⁺ em todos os cinco ratos normais (aumento de 15 a 4939 vezes antes do tratamento, tabela 1)

Esses dados sugerem que o G-CSF humano foi capaz de induzir mobilização celular da medula óssea para a periferia e, mais importante, de precursores hematopoiéticos em ratos.

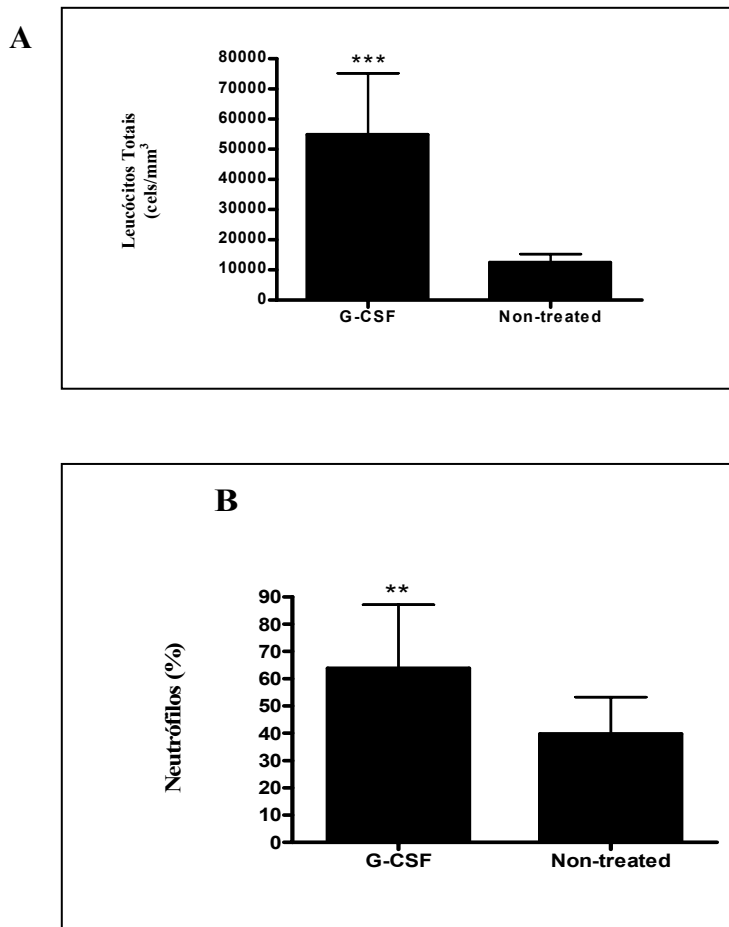


Figura 9 - (A) Leucócitos totais ao final do tratamento do Grupo III (100 μ g/kg) e (b) Percentual de Neutrófilos do grupo III. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$

Efeito do G-CSF nas células CD34⁺/CD45⁻ (celulas/mm³)

	<i>Antes</i>	<i>Depois</i>
Rato 1	0,33	1630
Rato 2	0,59	716
Rato 3	1,79	27
Rato 4	0,36	57
Rato 5	0,62	31

Tabela 1 - Análise sanguínea de CD34 (cells/mm³) por citometria de fluxo antes e depois do tratamento com G-CSF em ratos normais. –

4.3.2. ECG e ECO

Animais normais não apresentam onda Q em D1, entretanto, todos os animais infartados incluídos nos nossos experimentos apresentaram onda Q na derivação frontal D1 antes e após o tratamento com G-CSF. Os registros dos animais submetidos à cirurgia fictícia eram muito semelhantes ao de animais normais. A Figura 10 mostra que os dois grupos de animais infartados exibiram percentuais semelhantes de acinesia do VE antes do início do tratamento ($41,18 \pm 7,86$ vs $44,17 \pm 9,69\%$; G-CSF vs NT). Isso sugere uma mesma magnitude de infarto em ambos os grupos, o que é um importante controle para posterior avaliação do tratamento.

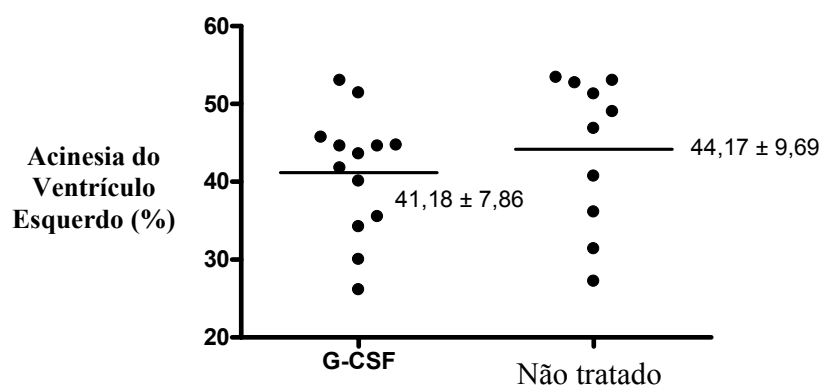


Figura10 – Percentual de acinesia do ventrículo esquerdo

O eixo do vetor de despolarização ventricular (vetor QRS) manteve-se desviado para direita ($>90^\circ$) nos dois grupos, 21 dias após o IM ($127,1 \pm 11,9$ vs $132,8 \pm 13,1$, Tabela 2). Os animais falso-operados sustentaram o eixo QRS em valores normais (entre 0 e 90° .)

O diâmetro diastólico final do VE (DDVE – $9,2 \pm 1,0$ vs $8,9 \pm 1,2$ mm) e o diâmetro sistólico final do VE (DSVE – $7,5 \pm 1,0$ vs $7,0 \pm 1,2$ mm) não apresentaram diferenças entre os animais tratados e não tratados no dia 21 (Tabela 2). Em adição, a área do ventrículo em diástole (ADVE - $0,59 \pm 0,1$ vs $0,53 \pm 0,2$ cm²) e a área do ventrículo em sístole (LVSA- $0,41 \pm 0,1$ vs $0,38 \pm 0,16$ cm²) também não eram significativamente diferentes. Portanto, a fração de encurtamento de área estava igualmente prejudicada nos dois grupos (FEA - $31,3 \pm 8,4$ vs $26,4 \pm 7,5$ %).

Dados de ECG e ECO 19-20 dias após IM

	FO (n = 9)	G-CSF (n = 13)	Não tratado (n = 10)
AQRS (graus)	58,9±13,18	127,1±11,9***	132,8±13,1***
DDVE (mm)	6,4±0,6	9,2±1,0***	8,9±1,2***
DSVE (mm)	2,4±0,7	7,5±1,0***	7,0±1,2***
ADVE (cm ²)	0,28±0,04	0,59±0,1***	0,53±0,2**
ASVE (cm ²)	0,07±0,02	0,41±0,1***	0,38±0,16***
FEA (%)	73,8±11,7	31,3±8,4***	26,4±7,5***
HR (bpm)	264±45	275±40	277±51

Tabela 2 - Dados de ECG e ECO 19-20 dias após IM. **p<0,01 em relação ao FO e ***p<0,001 em relação ao FO

4.3.3. Hemodinâmica e teste cardiopulmonar

Os parâmetros hemodinâmicos medidos ao final do experimento estão expostos na Tabela 3. Não houve diferença estatística entre os grupos tratados com G-CSF e não tratado. Vinte e um dias após o tratamento, a pressão diastólica final do VE (PDFVE) aumentou em ambos os grupos infartados em relação ao grupo FO. (FO - $3,5 \pm 2,7$ mmHg vs G-CSF - $19,7 \pm 8,2$ mmHg e NT - $21,0 \pm 9,3$ mmHg; $p < 0,001$, em relação ao FO) e a taxa de relaxamento do VE ($-dp/dt$ (mmHg/s)) era muito menor nos animais infartados, independente do tratamento (FO - $[-5873 \pm 742,6$ mmHg/s]; G-CSF - $[-3719 \pm 694,4$ mmHg/s] e NT - $[-3530 \pm 866,3$ mmHg/s]; $p < 0,001$, em relação ao FO). Esses resultados sugerem uma menor capacidade de relaxamento do VE dos ratos infartados. Os parâmetros de contratilidade apontados pelos valores da pressão desenvolvida pelo VE (PDVE = PSFVE - PDFVE) e pela taxa de desenvolvimento de pressão ao longo do tempo ($+dp/dt$ (mmHg/s)) eram muito menores nos grupos infartados em relação ao FO ($p < 0,001$) (PDVE: FO - $129,2 \pm 12,8$ mmHg; G-CSF - $84,56 \pm 11,2$ mmHg e NT - $79,70 \pm 11,8$ mmHg; e $+dp/dt$; FO - $[7721 \pm 995,8$ mmHg/s]; G-CSF - $[5318 \pm 977,6$ mmHg/s] e NT - $[4874 \pm 913,3$ mmHg/s]

Dados hemodinâmicos 21 dias após o IM

	FO (n = 9)	G-CSF (n = 9)	Não tratado (n = 9)
<u>+dp/dt (mmHg/s)</u>	7721 ± 995,8	5318 ± 977,6***	4874 ± 913,3***
<u>-dp/dt (mmHg/s)</u>	-5873 ± 742,6	-3719 ± 694,4***	-3530 ± 866,3***
PDFVE (mmHg)	3,5 ± 2,7	19,7 ± 8,2***	21,0 ± 9,3***
PSFVE (mmHg)	132,7 ± 10,8	108,6 ± 8,7***	103,8 ± 13,6***
PDVE (mmHg)	129,2 ± 12,8	84,56 ± 11,2***	79,70 ± 11,8***

Tabela 3 - PDFVE, pressão diastólica final do VE; PSFVE, pressão sistólica fina do VE; PDVE, pressão desenvolvida pelo VE. Valores estão em Média ± Desvpad.. FO, Falso Operado.. *** p<0,001 vs FO

Todos os dados funcionais realizados sob condições basais (ECG, ECO e Hemodinâmica) mostram que o tratamento com G-CSF foi ineficaz na prevenção do remodelamento cardíaco com conseqüente queda de função.

Os dados basais poderiam mascarar as diferenças funcionais entre os grupos sob condições de estresse ao aparelho cardiovascular. Assim, desafios ao sistema cardiovascular poderiam aumentar a sensibilidade de detecção de melhorias funcionais tênues. Entretanto, tanto o tempo de permanência em exercício (Figura 11B) quanto o consumo máximo de oxigênio não foram diferentes entre os grupos tratado e não tratado (Figura 11A).

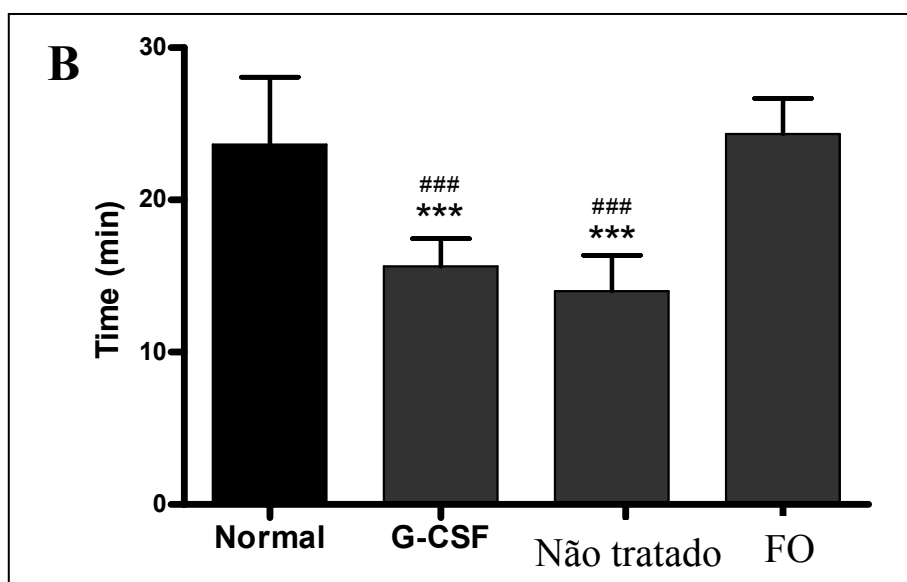
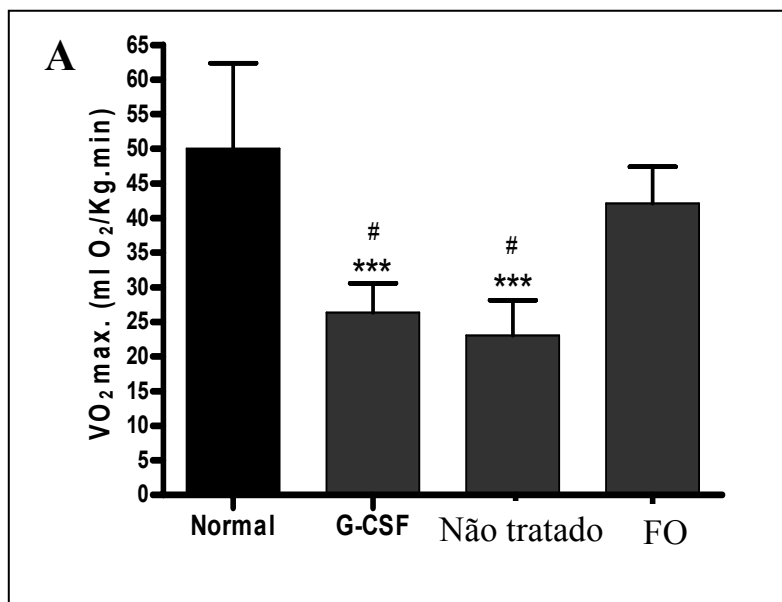


Figura 11 Teste de esforço máximo do grupo III. (A) Consumo máximo de oxigênio (VO₂max) e (B) Tempo de permanência em exercício. ***p<0,001 em relação ao normal. # p<0,5 em relação ao FO ### p<0,001 em relação ao FO

4.3.4. Extensão do Infarto

Não houve diferença significativa entre os grupos no percentual de infarto na altura dos músculos papilares (Figura 12). O grupo tratado com G-CSF teve $44,6 \pm 9,6\%$ do VE substituídos por tecido cicatricial enquanto que o grupo não tratado teve $48,6 \pm 7,6$.

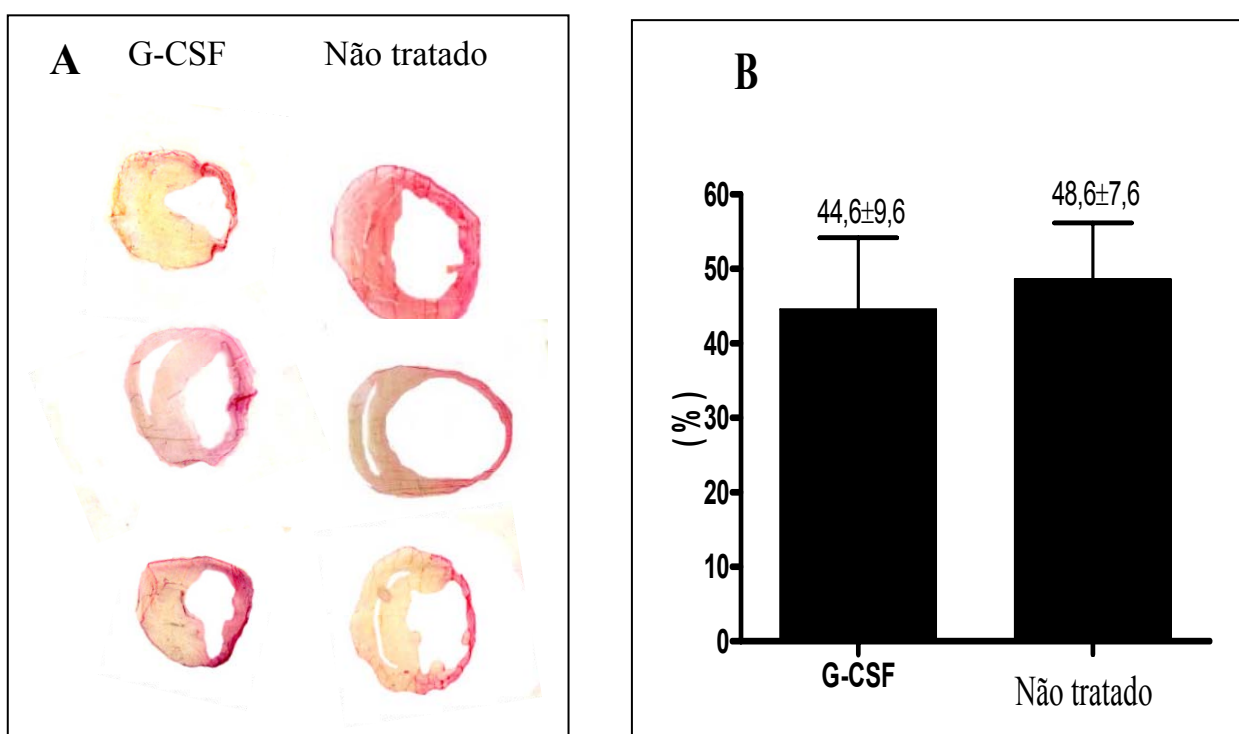


Figura 12 (A) Imagens representativas do corte histológico dos corações na altura dos músculos papilares coradas com pricosírius (fatia C) dos grupos tratado e não tratado (grupo III). (B) Extensão do Infarto.

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

No presente trabalho, o tratamento de ratos infartados com 50µg /kg/dia uma vez ao dia por cinco dias ou 100 µg/kg/dia, duas vezes ao dia duas vezes por dia durante sete dias consecutivos não altera a pobre função causada pela ligadura da coronária esquerda. Em condições basais, não houve diferença significativa entre o grupo tratado e não tratado tanto sob anestesia (Ecocardiograma – Tabela 2) ou quando conscientes (Hemodinâmica – Tabela 3).

As terapias celulares vêm sendo propostas como solução para a reconstituição do tecido cardíaco morto com a isquemia. As principais rotas de administração das células têm sido a intracardíaca ou a intracoronária, o que implica uma nova cirurgia ou um procedimento hemodinâmico invasivo aos pacientes e aos animais.

A promissora possibilidade de utilização de fatores capazes de mobilizar células precursoras da medula óssea para o sangue periférico e induzir a migração para o tecido infartado contém um grande apelo clínico. Neste contexto, o G-CSF aparece como potencial candidato. O G-CSF tem sido usado por várias décadas em pacientes sem apresentar sérios efeitos adversos e é amplamente descrito como capaz de mobilizar células-tronco hematopoiéticas e progenitoras da medula óssea para a periferia (Fu e cols., 2000 e Lapidot e cols., 2002).

Com esse raciocínio e impulsionados pelo seu trabalho prévio onde demonstraram que células da medula óssea regeneravam o tecido isquêmico (Orlic e cols., 2001a), Orlic e cols., (2001b) testaram G-CSF em combinação com SCF em camundongos com IM. Os resultados foram empolgantes com grande decréscimo na taxa de mortalidade. Entretanto,

os dados não podem ser extrapolados para a clínica devido ao uso de camundongos esplenectomizados e, ainda, que o tratamento fora iniciado antes da indução do IM. Os ratos utilizados em nosso trabalho tinham seus baços intactos e, mesmo assim, apresentaram grande mobilização celular. O número de células precursoras hematopoiéticas (CD34⁺) no sangue aumentou de forma bem significativa nos ratos normais, sendo que o menor aumento foi de 15 vezes em relação a antes do tratamento. A esplenectomia em ratos não aumentou o número de leucócitos totais no sangue após 5 dias de tratamento com G-CSF - 50µg/kg, *sc.* (dados não mostrados). Nossos dados, somados aos trabalhos posteriores onde os animais não foram esplenectomizados, sugerem que a esplenectomia não limita a mobilização celular e muito menos pode limitar os possíveis efeitos positivos do tratamento com citocinas.

Vários trabalhos foram publicados após o pioneiro de Orlic *et. al.*, (2001b) com resultados conflitantes. Ohtsuka e cols (2004) utilizaram G-CSF apenas ou em associação com SCF tanto antes quanto depois do IM experimental em camundongos não esplenectomizados. Os resultados foram semelhantes e a melhora da função cardíaca foi atribuída à formação de novos vasos e à menor apoptose dos cardiomiócitos. Os autores induziram IM em camundongos quiméricos que receberam transplante de células de medula óssea de camundongos transgênicos GFP⁺ (do inglês enhanced green fluorescent protein) e identificaram vasos sanguíneos no coração expressando GFP. Em concordância com Orlic e cols. (2001b), os autores construíram a hipótese de que o aumento de células tronco circulantes seria suficiente para promover a migração celular e, conseqüentemente, o reparo tecidual. Por outro lado, Deten e cols., (2005) realizaram exatamente o mesmo protocolo do trabalho do Orlic e cols. (2001b), até mesmo a esplenectomia, e não relataram efeito benéfico algum do tratamento com as citocinas. Deten e cols., (2005) relataram que, embora tenha havido uma importante mobilização de células c-Kit⁺ CD45⁻, população

preconizada por Orlic e cols. (2001b) como capaz de dar origem aos tipos celulares do coração, não houve melhora evidente nos animais tratados com G-CSF e SCF. No presente trabalho, G-CSF sozinho notadamente adicionou células CD34⁺ e CD45⁻ na circulação (Tabela 1). Entretanto, os ratos infartados tratados com G-CSF ostentaram queda na função sistólica comparável ao grupo controle. Neste contexto, Norol e cols, (2003) mostraram que a administração de G-CSF e SCF mobilizou células CD34⁺ com concomitante expressão de fatores de transcrição cardíacos (GATA 2 e 4) mas insuficiente para aumentar a capacidade contrátil de *baboons* infartados. Em consonância, já foi demonstrado que células hematopoiéticas não adotam fenótipos cardíacos tanto em corações normais (Wagers e cols., 2002) quanto isquêmicos (Balsam, e cols., 2004 e Murry e cols., 2004).

Além disso, Deten e cols. (2005) injetaram células Lin⁻ da medula óssea de camundongos machos na veia de fêmeas infartadas. Surpreendentemente, a taxa de mortalidade foi igual entre os grupos tratados ou não com G-CSF e SCF, antes ou depois do IM e no grupo que recebeu células. Nosso laboratório também testou a via sistêmica para o tratamento do IM em ratos infartados (Pinho-Ribeiro e cols., 2003). Injetamos células mononucleares e do estroma de medula óssea na veia da cauda de animais infartados por ligadura permanente da coronária esquerda horas após a cirurgia. Os ratos foram acompanhados por um período de 12 semanas e não houve diferença na função sistólica entre os grupos tratado e não tratado avaliados pelo Ecocardiograma. Poucas células foram encontradas no tecido cardíaco nos estudos histológicos. Para quantificarmos o percentual de células capaz de migrar para o coração, 48 horas após o IM, injetamos células marcadas com o radioisótopo tecnécio (Tc-99m) na veia jugular. A maioria das células injetadas migrou para o fígado e rins. Menos de 1% das células foi encontrado nos corações (dados não mostrados de parte da tese de doutorado da aluna

Vanessa Pinho Ribeiro). Nossos resultados com mobilização por G-CSF e infusão de células na periferia, somados aos dados de Deten e cols. (2005) mostram que o aumento do número de células no sangue não é suficiente para melhora funcional cardíaca.

O trabalho de Deten e cols. (2005), pela primeira vez, testou os animais infartados sob condições de *estresse*, provavelmente pelo insucesso nas medidas basais. Neste caso, foi induzido *estresse* farmacológico por infusão de noradrenalina. Todos os animais, independente do tratamento, exibiram função cardíaca prejudicada em relação ao grupo falso operado (FO) e não houve diferença entre os grupos mobilizados, injetados com células e controles. O nosso trabalho, foi o primeiro a submeter os animais a *estresse* fisiológico. No final de 19-20 dias de IM, os ratos foram submetidos a um teste de esforço progressivo máximo em esteira. O teste de esforço é comumente utilizado em pacientes como ferramenta de análise de função cardiopulmonar (ver adiante). Pequenas diferenças na capacidade contrátil dos corações poderiam ser detectadas pelo esforço máximo, já que o débito cardíaco é um dos principais limitantes do exercício. Todavia, não houve diferenças significativas entre os grupos infartados tanto no consumo máximo de oxigênio quanto no tempo de permanência em exercício. Logo, os dois únicos trabalhos que avaliaram os animais tratados com citocinas mobilizadoras de células da medula óssea sob condições de estresse, não obtiveram sucesso no tratamento (Deten e cols., 2005 e o presente trabalho).

Deten e cols. (2005) reportaram, de maneira consistente, que não há melhora da função cardíaca através do aumento do número de precursores da medula óssea para o sangue periférico. A extensão do infarto foi similar entre os grupos, todos apresentavam parâmetros hemodinâmicos funcionais abaixo dos ratos falso-operados e o padrão de

expressão genética não foi diferente entre os animais tratados com os fatores e, muito menos, nos animais injetados com células da medula.

No corrente trabalho, nós administramos altas doses de G-CSF por sete dias consecutivos e não observamos sinal algum de efeitos positivos do tratamento na performance cardíaca de ratos infartados em condições basais e sob estresse físico. Os nossos resultados levam a conclusão de que a injeção de apenas G-CSF, 3 horas após ligadura permanente da artéria coronária descendente esquerda em ratos, foi incapaz de prevenir o remodelamento cardíaco e a piora na função cardíaca.

Uma importante questão a ser levantada seria se o modelo de ligadura permanente poderia dificultar a migração celular para o tecido lesionado. Os trabalhos negativos descritos acima foram desenvolvidos com ratos infartados por oclusão permanente (Norol e cols., 2003 e Deten e cols., 2005). Os ratos envolvidos no presente estudo e nos experimentos de infusão de células nas veias caudal ou jugular também não realizaram reperfusão após o nó cirúrgico da coronária. Adicionado os resultados positivos do nosso laboratório com a injeção intracardíaca de células do estroma de medula óssea em infartos cicatrizados (Olivares e cols., 2004), o insucesso poderia ser creditado ao fechamento permanente do acesso das células.

Contudo, a oclusão permanente não parece limitar os possíveis efeitos benéficos visto que a grande maioria dos trabalhos da literatura induziu o IM da mesma forma (Orlic e cols., 2001b; Askari e cols., 2003, Ohtsuka e cols., 2004). Além disso, devido à controvérsia em torno da transdiferenciação das células da medula óssea, diversos estudos focalizaram a atenção em uma possível ação intracardíaca do G-CSF também na ligadura permanente (Harada e cols., 2004; Minatoguchi e cols., 2005; Sugano e cols., 2005; Miki e cols., 2005; Li e cols., 2005; Iwanaga e cols., 2004). Em 2006, dois trabalhos utilizaram o

modelo de isquemia e reperfusão para indução do IM e trataram os animais com G-CSF e SCF (Dawn e cols., 2006 e Kanellakis e cols., 2006). Neste modelo, a coronária era obstruída por 30 (Dawn e cols., 2006) ou 60 (Kanellakis e cols., 2006) minutos e depois era permitida a reperfusão coronariana. Embora utilizassem um modelo que facilitaria a migração das células para o tecido lesionado, os resultados foram contraditórios. Os dois grupos testaram o tratamento com G-CSF e SCF em camundongos selvagens e camundongos quiméricos, os quais sofreram ablação da medula original e substituição por células de camundongos transgênicos, com o intuito de averiguar a migração celular da medula para o coração. Ambos os trabalhos obtiveram sucesso nas análises funcionais e atribuíram a melhora ao aumento de cardiomiócitos e vasos sanguíneos, porém discordaram da origem das células: enquanto Kanellakis e cols. (2006) evidenciaram que as células migratórias da medula óssea permaneciam com seu fenótipo hematopoiético original, os dados de Dawn e cols. (2006) levaram à conclusão de que os novos cardiomiócitos formados eram oriundos das células dos camundongos doadores que reconstituíram a medula óssea. Contrariando todas as expectativas, o tratamento somente com G-CSF não foi efetivo (Dawn e cols., 2006). Os autores justificaram o insucesso no tratamento com G-CSF pela expressão de moléculas de superfície de membrana das células mobilizadas. O tratamento com apenas G-CSF reduziu a expressão de CD62L e CD11a, duas moléculas envolvidas com a migração. Sem dúvidas, parece que o modelo de indução de infarto não é o passo limitante para os animais infartados obterem os efeitos benéficos, se houver, do G-CSF. Além disso, na clínica, os pacientes que são internados com oclusão coronariana são, rapidamente, submetidos à cirurgia de reperfusão miocárdica. Nos trabalhos clínicos com reperfusão, também não houve melhora na função cardíaca (ver discussão adiante)

Nossos resultados negativos sugerem que a terapia com G-CSF não funcionaria em ensaios clínicos. Uma breve revisão dos dados publicados com pacientes infartados corrobora nossas conclusões. Apoiados pelas evidências pré-clínicas que o G-CSF poderia melhorar a função cardíaca tanto de forma direta quanto através da mobilização celular, vários trabalhos nos últimos três anos investigaram o potencial do tratamento com G-CSF em humanos. Ademais, o IM em pacientes por si só desencadeia uma mobilização de células CD34⁺ para o sangue (Leone e cols., 2005a, Leone e cols., 2005b e Paczkowska e cols., 2005; Massa e cols., 2005). Leone e cols. (2005a) avaliaram, pela citometria de fluxo, a expressão de CD34 nos leucócitos sanguíneos de pacientes infartados, com angina e pessoas saudáveis. Foi observado significativa mobilização e o pico de células CD34⁺ foi maior nos pacientes infartados. Vinte e oito pacientes foram reavaliados 12 meses depois. Surpreendentemente, embora não houvesse correlação do número de células inicialmente mobilizadas com a função cardíaca medida logo após o IM, os pacientes que apresentaram um maior pico de células CD34⁺ pós infarto, 12 meses depois, não pioraram os parâmetros funcionais tanto quanto aos pacientes com baixos níveis de células CD34⁺. Ao analisarem a expressão de G-CSF no sangue dos mesmos pacientes, os autores notaram uma aumentada quantidade de G-CSF e uma razoável correlação entre o aumento do G-CSF endógeno e o pico de células CD34⁺. Estes dois trabalhos levaram os autores a concluir que o IM aumenta a expressão de G-CSF e este, por sua vez, induziria uma significativa mobilização celular, capaz de frear a progressiva queda de função sistólica dos pacientes com IM. Pensaram, também, na hipótese de que um aumento do número de células CD34⁺ poderia trazer algum benefício para tais pacientes.

Entretanto, apenas os trabalhos de Ince e cols (2005a e 2005b) mostraram um aumento discreto, porém significativo, na fração de ejeção, no espessamento de parede ventricular e no índice de motilidade das paredes do VE nos desafios farmacológicos com

Dobutamina. A fração de ejeção manteve-se maior no grupo mobilizado com G-CSF do que nos controles até 12 meses após o evento isquêmico. A grande crítica aos trabalhos de Ince e cols (2005a), é que o grupo controle não era placebo controlado, não excluindo os efeitos placebos que uma terapia inovadora poderia acarretar. Também sem grupo placebo, com apenas grupo controle, Hill e cols, (2005) mostraram que os pacientes tratados com G-CSF, a despeito da intensa mobilização celular, não exibiram melhora no índice de motilidade ou mudança nos segmentos ventriculares com perfusão anormal em condições basais. Não houve melhora do desempenho físico (tempo em exercício) dos pacientes mobilizados, avaliados 1 e 3 meses após a injeção de G-CSF.

Dois trabalhos randomizados, duplo-cego, e placebo controlados, recentemente publicados com pacientes que sofreram revascularização de 3-5 horas após o IM, falharam em demonstrar efeitos benéficos da mobilização celular com G-CSF (Ripa e cols, 2006 e Zohluhofer e cols, 2006). Os dois trabalhos utilizaram imagens de Ressonância Magnética (MRI, do inglês *magnetic resonance image*) para avaliar a função cardíaca dos pacientes, considerada o “padrão ouro” para avaliação da contratilidade cardíaca (Hill e cols, 2006).

Zohluhofer e cols, (2006) trataram 56 pacientes com G-CSF e 58 receberam tratamento placebo. Antes do tratamento a área comprometida pelo infarto era semelhante nos dois grupos, sugerindo mesmos níveis de lesão cardíaca. Ambos os grupos diminuíram a área de infarto do ventrículo esquerdo e aumentaram a fração de ejeção, como esperado após a intervenção cirúrgica de revascularização, quando avaliados 4 e 6 meses depois o tratamento. Entretanto, não houve diferença entre os pacientes submetidos à terapia de mobilização celular em relação ao grupo placebo. Os valores de função global ou regional não diferiram entre os grupos. Ripa e cols (2006) recrutaram 78 pacientes com supradesnivelamento do segmento ST em pelo menos duas derivações clássicas do eletrocardiograma e injetaram G-CSF na metade dos indivíduos e injetaram veículo na

outra metade. Seis meses após a revascularização e o início do tratamento, os dois grupos aumentaram, em média, a espessura da parede ventricular esquerda durante a sístole, medida por MRI, tanto na área infartada quanto na área viável remanescente. A melhora contrátil foi semelhante nos dois grupos. Não foram identificadas diferenças significativas, também, no volume diastólico final, no volume sistólico final e na fração de ejeção. Os resultados da MRI foram confirmados pelo ecocardiograma que demonstrou mudanças semelhantes nos grupos G-CSF e placebo. Em linhas gerais, todos os acompanhamentos clínicos associaram a mobilização com a função cardíaca. Todos, sem exceção, confirmaram a potente mobilização de células em resposta ao tratamento com G-CSF. As células mobilizadas foram descritas como células de fenótipos de precursores hematopoiéticos (CD34⁺) e/ou endoteliais (CD133⁺). Essas células, uma vez no coração, poderiam formar novos miócitos cardíacos e vasos sanguíneos. O próprio evento isquêmico é capaz de induzir a mobilização desses tipos celulares (Leone e cols, 2005a, Leone e cols, 2005b e Paczkowska e cols, 2005; Massa e cols, 2005), entretanto, evidências experimentais em animais não suportam a idéia de que células hematopoiéticas adotem um fenótipo que não seja o próprio hematopoiético (Balsam e cols, 2004; Murry e cols, 2004; Niegren e cols, 2004 e Wagers e cols, 2002). Assim, o tipo celular mobilizado poderia não ser o capaz de recuperar a massa ventricular morta pela oclusão repentina de um ramo das artérias coronárias. Alguns trabalhos apontam para uma mobilização de células de origem não hematopoiéticas para a circulação sanguínea após a injeção de G-CSF (Kassis I, e cols, 2006 e Kawada H e cols, 2004)). No trabalho desenvolvido por Zohluhofer e cols, (2006) foi relatado um aumento no número de células negativas para quaisquer marcadores de células hematopoiéticas (CD34 e CD45 negativas) no sétimo dia de tratamento com G-CSF. As células não hematopoiéticas mobilizadas foram chamadas pelos autores de células-tronco mesenquimais e expressavam os receptores de SDF-1

(CXCR-4) e VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular, do inglês *vascular endothelium growth factor*). Conforme já foi mencionado, há um pico de expressão de SDF-1 no tecido do coração após o IM (Askari e cols, 2003) o que poderia facilitar a migração da célula para o coração. Uma vez no tecido, a célula seria capaz de responder ao VEGF, que expresso no coração após diminuição do aporte sanguíneo, e formar novos vasos colaterais. Além disso, as células mesenquimais são multipotentes e são capazes de formar diversos tecidos, inclusive o cardíaco (Pittenger e cols, 1999). Entretanto, mesmo com a mobilização de células precursoras hematopoiéticas, endoteliais e mesenquimais, Zohluhofer e cols, (2006) não evidenciaram nenhum benefício na função cardíaca do tratamento com G-CSF.

Em conclusão, nossos dados demonstram claramente que, a despeito da sua habilidade em mobilizar células da medula óssea, o tratamento com G-CSF não previne a falência cardíaca progressiva após o infarto do miocárdio em ratos, tanto através de testes funcionais em animais anestesiados, conscientes porém em condições basais e sob estresse cardiovascular fisiológico extremo. Nosso estudo acrescenta dados importantes na discussão em torno do tratamento com G-CSF em doenças isquêmicas principalmente pelos insucessos encontrados na clínica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMAN, M.J.; KELLER, U.; DEGRIS, G.; MAHAMADZADEH, M.; HUVER, C. and PESCHEL, C. Regulation of cytokine expression by interferon-alpha in human bone marrow stromal cells: inhibition of hematopoietic growth factors and induction of interleukin-1 receptor antagonist. *Blood* 84:4142-4150, 1994.

ANVERSA, P.; BEGHI, C.; McDONALD, S.L.; LEVICKY, V.; KIKKAWA, Y. and OLIVETTI, G. Morphometry of right ventricular hypertrophy induced by myocardial infarction in the rat. *American Journal of Pathology* 116(3): 504-513, 1984.

ARRAS, M.; ITO, W.D.; SCHOLZ, D.; WINKLER, B.; SCHAPER, J. and SCHAPER, W. Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *J. Clin. Invest.* 101:40-50, 1998.

ASKARI, A., UNZEG, S., POPOVIC, Z., GOLDMAN, C., FORUDI, F., KIEDROWSKI, M., ROVNER, A. ELLIS, S., THOMAS, J., DICORLETO, P., TOPOL, E., PENN, M. (2003) Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischemic cardiomyopathy. *The Lancet* Aug. 30, 697-703

BALSAM LB, WAGERS AJ, CHRISTENSEN JL, KOFIDIS T, WEISSMAN IL, ROBBINS RC (2004) Hematopoietic stem cells adopt mature hematopoietic fates in ischemic myocardium. *Nature*. Apr 8;428:668-73,

BESINGER, W.I.; CLIFT, R.A.; ANASSETI, C.; APPELBAUM, F.A.; DEMIRER, T.; ROWLEY, S.; SANDMAIER, B.M.; TOROK-STORB, B. and BUCKNER, C.D.

Transplantation of allogeneic peripheral blood stem cells mobilized by recombinant human granulocyte colony stimulating factor. *Stem Cells* 14:90-105, 1996

BODINE, D.M.; SEIDEL, N.E. and ORLIC, D. Bone marrow collected 14 days after in vivo administration of granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor to mice has 10-fold more repopulating ability than untreated bone marrow. *Blood* 88:89-97, 1996

BODINE, D.M.; SEIDEL, N.E. GALE, M.S.; NIENHUIS, A.W.; ORLIC, D. Efficient retrovirus transduction of mouse pluripotent hematopoietic stem cells mobilized into the peripheral blood by treatment with granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor. *Blood* 84: 1482-1491, 1994.

BORTIN, M.M. and BUCKNER, C.D. Major complications of marrow harvesting for transplantation. *Exp. Hematol.* 11:916-921, 1983

BUCKNER C.D.; PETTERSEN, F.B. and BOLONESI, B.A. Bone marrow donors. In: FORMAN S.J.; BLUME, K.G.; THOMAS, E.D. *Bone Marrow Transplantation* 1ed Boston: Blackwell Scientific Publications 259-269, 1984

BUSCHMANN, I.R.; HOEFER, I.E.; ROYEN, N.V.; KATZER, E.; BRAUNDULLEAUS, R.; HEIL, M.; KOSTIN, S.; BODE, C. And SCHAPER, W. *Atherosclerosis* 159:343-356, 2001.

CALDWELL, J. and EMERSON, S.G.; IL-1 α and TNF- α act synergistically to stimulate production of myeloid colony-stimulating factors by culture human bone marrow stromal cells and cloned stromal cell lines. *J. Cell. Physiol.* 159:221-228, 1994.

CHIU, R.C.J. Using skeletal muscle for cardiac assistance. *Sci Am Sci Med*, Nov/Dec: 2-11, 1994.

CHIU, R.C.J.; ZIBAITIS, A.; KAO, R.L. Cellular cardiomyoplasty: myocardial regeneration with satellites cell implantation. *Ann Thorac Surg* 60: 12-18, 1995.

DAWN, B., GUO, Y., REZAZADEH, A., HUANG, Y, STEIN, A., HUNT, G., TIWARI, S., VARMA, J., GU, Y. PRABHU, S., KASJUSTURA, ANVERSA, P. , ILDSTAD, S., BOLLI, R. (2006) Postinfarct cytokine therapy regenerates cardiac tissue and improves left ventricular function 1098-1104

DEMETRI, G.; ZENZIE, B.; RHEINWALD, J.; GRIFFIN, J. Expressing of colony-stimulating factor by normal human mesothelial cells and human malignant mesothelioma cell lines in vivo. *Blood* 74:940, 1989

DETEN A, VOLZ HC, CLAMORS S, LEIBLEIN S, BRIEST W, MARX G, ZIMMER HG (2005) Hematopoietic stem cells do not repair the infarcted mouse heart *Cardiovasc Res.* Jan 1;65(1):52-63

ELLIS, L.B.; ALLISON, R.B.; RODRIGUEZ, F.L. and ROBBINS, S.L. Relations of the degree of coronary artery disease and of myocardial infarctions to cardiac hypertrophy and chronic congestive heart failure. *New England Journal of Medicine* 266(11): 525-9, 1962.

FACTOR, S.M. Pathophysiology of myocardial ischemia. In: HURST, J.W.; SCHLANT, R.C.; RACKLEY, C.E.; SONNENBLICK, E.H.; WENGER, N.K., ed. *The heart. Arteries and veins.* 7 ed. New York, Mc Graw-Hill, Cap. 49, p. 940-59, 1990.

FISHBEIN, M.C.; MACLEAN, D and MAROKO, P.R. Experimental Myocardial infarction in the rat: qualitative and quantitative changes during pathologic evolution. *Am. J. Pathol.*, 90: 57-70, 1978a.

FISHBEIN, M.C.; MACLEAN, D and MAROKO, P.R. The histologic evolution of the myocardial infarction. *Chest* 73: 843-9, 1978b.

FLETCHER, P.J.; PFEFER, J.M.; PFEFFER, M.A. and BRAUNWALD, E. Left ventricular diastolic pressure-volume relations in rats with healed myocardial infarction. Effects on systolic function. *Circulation Research* 49(3): 618-26, 1981.

FUKUHARA, S., TOMITA, S., NAKAHANI, T., YUTANI, C., KITAMURA, S., *The Journal of heart and Lung Transplantation*: 67-72, 2005

GUSSONI.; SONEOKA, Y.; STRICKLAND, C.D.; BUZNEY, E.A.; KHAN, M.K.; FLINT, A.F.; KUNKEI, L.M. and MULLIGAN, R.C. Dystrophin expression in the mdx mouse restores by stem cell transplantation. *Nature* 401:390-394, 1999.

HAGSTROM, R.M.; BILLINGS, F.T.; CHAPNICK, E.M.; BALL, C.O.T. and MENEELY, G.R. Sudden death in survivors of myocardial infarction. *Circulation* 30(Suppl. III): III-91-2, 1964.

HARADA M, QIN Y, TAKANO H, MINAMINO T, ZOU Y, TOKO H, OHTSUKA M, MATSUURA K, SANO M, NISHI J, IWANAGA K, AKAZAWA H, KUNIEDA T, ZHU W, HASEGAWA H, KUNISADA K, NAGAI T, NAKAYA H, YAMAUCHI-TAKIHARA K, KOMURO I. (2005) G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. *Nat Med.* Mar;11(3):305-11,

HEARSE, D.J.; RICHARD, V.; YELLON, D.M. and KINGMAN, J.G. Jr. Evolving myocardial infarction in the rat in vivo: inappropriate model for the investigation of drug-induced infarct size limitation during sustained regional ischemia. *J Cardiovasc Pharmacol* 11: 701-710, 1988.

HEARSE, D.J.; YELLON, D.M.. (Eds), pp 79-90. New York: Raven Press, 1984.

HEIMBURGER, R.F. Injection into pericardial sac and ligation of coronary artery of the rat. *Arch Surg* 52: 677-89, 1946.

HERMANN, F.; CANNISTRA, S. and GRIFFIN, J. T-cell/monocyte interactions in the production of humoral factors regulating human granulopoiesis in vitro. *J. Immunol.* 135:2856, 1986.

HILL JM, BARTUNEK J. The end of granulocyte colony-stimulating factor in acute myocardial infarction? Reaping the benefits beyond cytokine mobilization. *Circulation.* Apr 25;113(16):1926-82006

HILL JM, SYED MA, ARAI AE, POWELL TM, PAUL JD, ZALOS G, READ EJ, KHUU HM, LEITMAN SF, HORNE M, CSAKO G, DUNBAR CE, WACLAWIW MA, CANNON RO Outcomes and risks of granulocyte colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease *J Am Coll Cardiol.* Nov 1;46(9):1643-8. 2005

HUTCHESON, K.A.; ATKINS, B.Z.; HUEMAN, M.T.; HOPKINS, M.B.; GLOWER, D.D. and TAYLOR, D.A. Comparing the benefits of cellular cardiomyoplasty with skeletal myoblasts of dermal fibroblasts on myocardial performance. *Cell Transpl* 9: 359-368, 2000.

INCE H, PETZSCH M, KLEINE HD, ECKARD H, REHDERS T, BURSKA D, KISCHE S, FREUND M, NIENABER CA. Prevention of left ventricular remodeling with granulocyte colony-stimulating factor after acute myocardial infarction: final 1-year results of the Front-Integrated Revascularization and Stem Cell Liberation in Evolving Acute Myocardial Infarction by Granulocyte Colony-Stimulating Factor (FIRSTLINE-AMI) Trial *Circulation*. Aug 30;112(9 Suppl):I73-80. 2005

IWANAGA K, TAKANO H, OHTSUKA M, HASEGAWA H, ZOU Y, QIN Y, ODAKA K, HIROSHIMA K, TADOKORO H, KOMURO I. Effects of G-CSF on cardiac remodeling after acute myocardial infarction in swine *Biochem Biophys Res Commun*. Dec 24;325(4):1353-9. 2004

JOHNS, TNP and OLSON, J.B. Experimental myocardial infarction: a method of coronary occlusion in small animals . *Ann. Surg* 140: 675 – 82, 1954.

JULIAN, D.G. Prognosis, risk stratification and rehabilitation after acute myocardial infarction. In: JULIAN, D.G.; CAMM. A.J.; FOX, K.M.; HALL, R.J.C.; POOLE-WILSON, P.A., ed. *Diseases of the heart*. London, Baillière Tiddall Cap. 51, p. 1192-1202, 1989.

KANELLAKIS, P., SLATER, N. DU, X. BOBIK, A., CURTIS, DAVID (2006)
Cardiovascular research Feb. 23: 117-125

KANNEL, W.B.; SORLIE, P. and McNAMARA, P.M. Prognosis after initial myocardial infarction: the Framingham study. American journal of cardiology 44: 53-9, 1979.

KASSIS I, ZANGI L, RIVKIN R, LEVDANSKY L, SAMUEL S, MARX G, GORODETSKY R. Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads. Bone Marrow Transplant. May;37(10):967-76, 2006

KAUFMAN, N; GAVA T.L. and HILL, RW Experimental myocardial infarction in the rat. Arch. Pathol. Lab. Med., 67: 482 – 488, 1959.

KAWADA H, FUJITA J, KINJO K, MATSUZAKI Y, TSUMA M, MIYATAKE H, MUGURUMA Y, TSUBOI K, ITABASHI Y, IKEDA Y, OGAWA S, OKANO H, HOTTA T, ANDO K, FUKUDA K. Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. Blood. Dec 1;104(12):3581-7. 2004

KEMPF, F.C and JOSEPHSON, M.E. Cardiac arrest recorded on ambulatory electrograms. American Journal of Cardiology 53: 1577-1582, 1984.

KESSLER, P.D. and BYRNE, B.J. Myoblast cell grafting into heart muscle: cellular biology and potential applications. Annu Ver Physio 61: 219-242, 1999.

KIM, E-J.; LI, R-K; WEISEL, R.D.; MICKLE, D.A.G.; JIA, Z.Q.; TOMITA, S.; SAKAI, T. and YAU, T.M. Angiogenesis by endothelial cell transplantation. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 122 (5): 963-971, 2001.

KLUG, M.A.; SOONPAA, M.H.; KOH, G.Y. and FIELD, L.J. Purification of cardiac myocytes differentiated from embryonic stem cells for use in intracardiac grafting. In *Tissue Engineering*. Edited by Hubbell JÁ, Reddi HÁ. Taos, NM: Keystone Symposia; 1996.

KOCHER, A.A.; SCHUSTER, M.D.; SZABOLCS, M.J.; TAKUMA, S.; BURKHOFF, D.; WANG, J.; HOMMA, S.; EDWARDS, N.M. and ITESCU, S. Neovascularization of ischemic myocardial by human bone marrow-derived endothelial precursors prevents post-infarction remodeling and improve cardiac function. *Nature Med* 7: 430-436, 2001.

KOEFLER, H.P.; GASSON, J.; RANYARD, J.; SOUZA, L.; SHEPAR, M. and MUNKER, R. Recombinant human TNF alpha stimulates production of granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 70:55, 1987

KOH, G.Y.; SOONPAA, M.H.; KLUG, M.G. and FIELD, L.J. Long-term survival of AT-1 cardiomyocyte grafts in syngeneic myocardium. *Am J Physiol* 264, H1727-1733, 1993.

KOTLER, M.N.; TABATZNIK, B.; MOWER, M.N. and TOMINAGA, S. Prognostic significance of ventricular ectopic beats with respect to sudden death in the late postinfarction period. *Circulation* 47: 959-966, 1973.

L'ENFANTE C. NHLBI at 50 – Reflections on a half century of research on the heart, lungs, and blood. National Heart, lung, and Blood Institute. JAMA 280: 2062-2064, 1998.

LAPIDOT T, PETIT I. Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells.

LEONE AM, RUTELLA S, BONANNO G, ABBATE A, REBUZZI AG, GIOVANNINI S, LOMBARDI M, GALIUTO L, LIUZZO G, ANDREOTTI F, LANZA GA, CONTEMI AM, LEONE G, CREA F. Mobilization of bone marrow-derived stem cells after myocardial infarction and left ventricular function Eur Heart J Jun;26(12):1196-204. 2005

LEONE AM, RUTELLA S, BONANNO G, CONTEMI AM, DE RITIS DG, GIANNICO MB, REBUZZI AG, LEONE G, CREA F. Endogenous G-CSF and CD34(+) cell mobilization after acute myocardial infarction. Int J Cardiol. Jul 25, 2005

LI Y, TAKEMURA G, OKADA H, MIYATA S, ESAKI M, MARUYAMA R, KANAMORI H, LI L, OGINO A, MISAO Y, KHAI NC, MIKAMI A, MINATOBUCHI S, FUJIWARA T, FUJIWARA H. (2006) Treatment with granulocyte colony-stimulating factor ameliorates chronic heart failure. *Lab Invest.* Jan;86(1):32-44

LI, P.; ZHANG, X.; CAPASSO, J.M.; MEGGS, LG; SONNENBLINK, E.H. and ANVERSA, P. – Myocyte loss and left ventricular failure characterize the long-term effects of coronary artery narrowing or renal hypertension in rats. *Cardiovasc Res* 27: 1066-1075, 1993.

LI, R.K.; JIA, Z.Q.; WEISEL, R.D.; MERANTE, F. and MICKLE, D.A.G. Smooth muscle cell transplantation into myocardial scar tissue improve heart function. *J Mol Cell Cardiol* 31: 513-22, 1999b.

LI, R.K.; JIA, Z.Q.; WEISEL, R.D.; MICKLE, D.A.G.; ZHANG, J. and MOHABEER, M.K.; *e cols.* Cardiomyocytes transplantation improves heart function. *Ann Thorac Surg* 62: 654-61, 1996.

LI, R.K.; WEISEL, R.D.; MICKLE, D.A.G.; JIA, Z.Q.; KIM E-J; SAKAI, T.; *e cols.* Autologous porcine heart cell transplantation improved heart function after a myocardial infarction. *J Thorac Cardiovasc Surg* 119: 62-8, 2000.

LI, R-K.; WEISEL, R.; MICKLE, D.; CHOI, A and YAU, T. Survival and function of bioengineered cardiac grafts. *Circulation*, 100(19 suppl): 163-169, 1999a.

LIECHTY, K.W.; *et cols.* Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in uterus transplantation in sheep. *Nature Med* 1282-1286, 2000.

MAJUMDAR, M.K.; THIEDE, M.A.; MOSCA, J.D.; MOORMAN, M. and GERSON S.L. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *Journal of cellular physiology* 176:57-66, 1998.

MALLORY, G.K.; WHITE, P.D. and SALCEDO-SALGAR, J. The speed of healing of myocardial infarction. A study of the pathologic anatomy in seventy-two cases. *American Heart Journal* 18(6): 647-71, 1939.

MALOUF, N.N.; COLEMAN, W.B.; GRISHAM, J.W.; LININGER, R.A.; MADDEN, V.J.; SPROUL, M. and ANDERSON, P.A.W. Adult-derived stem cells from the liver become myocytes in the heart in vivo. *American Journal of Pathology* 158 (6): 1929-1935, 2001.

MARCHLINSKI, F.E.; Ventricular tachycardia: clinical presentation, course and therapy. In: ZIPES, D.P. JALIFE, J., ed *Cardiac electrophysiology. From cell to bedside.* Philadelphia, W.B. Saunders, P. 82, 1990.

MARELLI, D.; DESROSIERS, C.; EL-ALFY, M.; KAO, R.L. and CHIU, R.C.J. Cell transplantation for myocardial repair: an experimental approach. *Cell Transplant* 1: 383-390, 1992.

MENASCHE, P Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 357:279-280, 2001.

MIKI T, MIURA T, NISHINO Y, YANO T, SAKAMOTO J, NAKAMURA Y, ICHIKAWA Y, IKEDA Y, KOBAYASHI H, URA N, SHIMAMOTO K.

MIN, J-Y.; YANG, Y.; CONVERSO, K.L.; *e cols.* Transplantation of embrionic cells improves cardiac function in postinfarcted rats. *J Appl Physiol* 92: 288-296, 2002.

MINATOGUCHI S, TAKEMURA G, CHEN XH, WANG N, UNO Y, KODA M, ARAI M, MISAO Y, LU C, SUZUKI K, GOTO K, KOMADA A, TAKAHASHI T, KOSAI K, FUJIWARA T, FUJIWARA H (2004) Acceleration of the healing process and myocardial regeneration may be important as a mechanism of improvement of cardiac function and remodeling by postinfarction granulocyte colony-stimulating factor treatment. *Circulation*. Jun 1;109(21):2572-80,

MOHLE, R.; MUREA, S.; KIRSH, M. and HAAS, R. Differential expression of L-selectin, VLA-4, and LFA-1 on CD34 progenitor cells from bone marrow and peripheral blood during G-CSF enhance recovery. *Exp Hematol* 23:1535, 1993.

MORRIS, D.C.; WALTER, P.F. and HURST, J.W. The recognition and treatment of myocardial infarction and its complications. In: HURST, J.W.; SCHLANT, R.C.; ed. *The heart. Arteries and veins*. 7 ed. New York, Mc Graw-Hill, Cap. 53C, p. 1054-1078, 1990.

MORRISON, S.J.; WRIGHT, DE. and WEISSMAN, IL. Cyclophosphamide/grnulocyte colony-stimulating factor induces hematopoietic stem cells to proliferate prior tomobilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94:1908-1913, 1997.

MURRY CE, SOONPAA MH, REINECKE H, NAKAJIMA H, NAKAJIMA HO, RUBART M, PASUMARTHI KB, VIRAG JI, BARTELMEZ SH, POPPA V, BRADFORD G, DOWELL JD, WILLIAMS DA, FIELD LJ (2004) Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature*. Apr 8;428:664-8

NEUMEYER, A.N.; DIGREGÓRIO, D.M.and BROWN, R.H. Arterial delivery of myoblasts to skeletal muscle *Neurology* 42:2258-2262, 1992

NORMAN, T.D. and COERS, C.R. Cardiac hypertrophy after coronary artery ligation in rats. Archives of Pathology 69: 69-72, 1960.

NOROL F, MERLET P, ISNARD R, SEBILLON P, BONNET N, CAILLIOT C, CARRION C, RIBEIRO M, CHARLOTTE F, PRADEAU P, MAYOL JF, PEINNEQUIN A, DROUET M, SAFSAFI K, VERNANT JP, HERODIN F (2003) Influence of mobilized stem cells on myocardial infarct repair in a nonhuman primate model. Blood. Dec 15;102(13):4361-8

NORRIS, R.M.; CAUGHEY, D.E.; MERCER, C.J. and SCOTT, P..J. Prognosis after , myocardial infarction. Six-year follow up. British Heart Journal 36: 786-90, 1974.

NOVAES, M.A.S. Estudo das alterações morfológicas e funcionais do músculo papilar do ventrículo esquerdo de ratos submetidos ao infarto do miocárdio. Vitória, Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, 1992.92p. (Tese, Mestrado).

OHTSUKA M, TAKANO H, ZOU Y, TOKO H, AKAZAWA H, QIN Y, SUZUKI M, HASEGAWA H, NAKAYA H, KOMURO I. (2004) Cytokine therapy prevents left ventricular remodeling and dysfunction after myocardial infarction through neovascularization. *FASEB J.* May;18(7):851-3

OLIVARES EL, RIBEIRO VP, WERNECK DE CASTRO JP, RIBEIRO KC, MATTOS EC, GOLDENBERG RC, MILL JG, DOHMANN HF, DOS SANTOS RR, DE CARVALHO AC, MASUDA MO. Bone marrow stromal cells improve cardiac performance in healed infarcted rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Aug;287(2):H464-70. 2004

OLIVETTI, G.; CAPASSO, J.M.; MEGGS, L.G.; SONNENBLICK, E.H. and ANVERSA, P. Cellular basis of chronic left ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *Circulation Research* 68(3): 856-69, 1991.

OLIVETTI, G; RICCI, R; BEGHI, C; GUIDERI, G. and ANVERSA, P. Response of the border zone to myocardial infarction in rats. *American Journal of Pathology* 125(3): 476-83, 1986.

ORLIC D., KAJSTURA, J., CHIMENTI S. JAKONLUK, I., ANDERSON S.,
BAOSHENG L., PICKEL J., MCKAY, R., NADAL-GINARD, BERNARDO,
BODLINE, LERI D., A. ANVERSA, P, (2001) Bone marrow cells regenerate infarcted
myocardium. Nature Apr. 5 701-705

ORLIC, D.; FISCHER, R.; NISHIKAWA, S.I.; NIENHUIS, A.W. and BODINE, D.M.
Blood 91:3247-3254, 1993.

ORLIC, D.; KAJSTURA, J.; CHIMENTI, S.; LIMANA, F.; JAKONIUK, I.;
ANDERSON, S.M.; LI, B.; PICKEL, J.; MACKAY, R.; NADAL-GINARD, B.;
BODINE, D.; LERI, A. and ANVERSA, P. Bone marrow cells regenerate infarcted
myocardium. Nature 410: 701-705, 2001.

ORLIC, D.; KAJSTURA, J.; CHIMENTI, S.; LIMANA, F.; JAKONIUK, I.; QUAINI,
F.; NADAL-GINARD, B.; BODINE, D.; LERI, A. and ANVERSA, P. Mobilized bone
marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. Partners
HealthCare System. Inc. 98:10344-10349, 2001.

OSTER, W.; LINDEMANN, A.; MERTELSMANN, R. and HERRMANN, F. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and multilineage CSF recruit human monocytes to express granulocyte CSF. *Blood* 73:64, 1989.

PACZKOWSKA E, LARYSZ B, RZEUSKI R, KARBICKA A, JALOWINSKI R, KORNACEWICZ-JACH Z, RATAJCZAK MZ, MACHALINSKI B. Human hematopoietic stem/progenitor-enriched CD34(+) cells are mobilized into peripheral blood during stress related to ischemic stroke or acute myocardial infarction. *Eur J Haematol* Dec;75(6):461-7. . 2005

PANIDIS, I. and MORGANROTH, J. Sudden death in hospitalized patients: cardiac rhythm disturbances detected by ambulatory electrocardiographic monitoring. *Journal of the American College of Cardiology* 2: 798-805, 1983.

PFEFFER, J.M. and BRAUNWALD, E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* 81(4): 1161-1172, 1990.

PFEFFER, J.M.; PFEFFER, M.A; FLETCHER, P.J. and BRAUNWALD, E. Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction. *Am. J. Physiol* 260: H1406-H1414, 1991.

PFEFFER, M.A., PFEFFER, J.M.; FISHBEIN, M.C.; FLETCHER, P.J., SPADARO, J., KLONER, R.A. and BRAUNWALD, E. – Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res* 44: 503-512, 1979.

PFEFFER, M.A.; PFEFER, J.M.; STEINBERG, C. and FINN, P. – Survival after an experimental myocardial infarction: beneficial effects of long term therapy with captopril. *Circulation* 72: 406-12, 1985.

PITTENGER MF, MACKAY AM, BECK SC, JAISWAL RK, DOUGLAS R, MOSCA JD, MOORMAN MA, SIMONETTI DW, CRAIG S, MARSHAK DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. Apr 2;284(5411):143-7. 1999

POHJOLA, S.; SILTANEN, P. and ROMO, M. Five-year survival of 728 patients after myocardial infarction. A community study. *British Heart Journal* 43: 176-183, 1980.

RIBEIRO KC, MATTOS EC, WERNECK DE CASTRO JP, RIBEIRO VP, COSTA E SOUZA RH, MIRANDA A, OLIVARES EL, FARINA, M, MILL JG, GOLDENBERG RC, MASUDA MO, DE CARVALHO AC. Ectopic ossification in the scar tissue of rats with myocardial infarction. Aceito pela revista *Cell Transplantation*, dez-2005

RIPA RS, JORGENSEN E, WANG Y, THUNE JJ, NILSSON JC, SONDERGAARD L, JOHNSEN HE, KOBER L, GRANDE P, KASTRUP J. Stem cell mobilization induced by subcutaneous granulocyte-colony stimulating factor to improve cardiac regeneration after acute ST-elevation myocardial infarction: result of the double-blind, randomized, placebo-controlled stem cells in myocardial infarction (STEMMI) trial. *Circulation*. Apr 25;113(16):1983-92, 2006

ROBINSON, S.W.; CHO, P.W.; LEVITSKY, H.I.; OLSON, J.L.; HRUBAN, R.H.; ACKER, M.A. and KESSLER, P.D. Arterial delivery of genetically labeled skeletal myoblasts to the murine heart: long-term survival and phenotypic modification of implanted myoblasts. *Cell Transpl* 1996, 5: 77-91.

RUBERMAN, W; WEINBLATT,E; GOLDBERG, J.D.; FRANK, C.W.; CHAUDHARY, B.S. and SHAPIRO, S. Ventricular premature complexes and sudden death after myocardial infarction. *Circulation* 64(2): 297-305, 1981.

SAKAI, T.; LI, R-K.; WEISEL, R.D.; *e cols.* Autologous heart cell transplantation improves cardiac function after myocardial injury. *Ann Thorac Surg* 68: 2074-2081, 1999b.

SCHAPER, W. Experimental infarctions and the microcirculation. *Therapeutic Approaches to Myocardial Infarct Size Limitation*, 1984

SCORSIN, M.H.; HAGEGE, A.A.; VILKIN, J.T.; FISZMAN, M; MARROTE, F; SAMUEL, J.L.; *e cols.* Comparison of effect of fetal cardiomyocytes and skeletal myoblast transplantation on postinfarction left ventricular function. J Thorac Cardiovasc Surg 119: 1169-75, 2000.

SEILER, C.; POHI, T.; WUSTMANN, K.; HUTTER, D.; NICOLET, P.A.; WINDECKER, S.; EBERLI, F. and MEIER, B. Promotion of collateral growth by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease. A randomized, double-blind, placebo-controlled study. Circulation 104:2012-2017, 2001.

SELYE, H.; BAJUSZ, E.; GRASSO, S. and MENDELL, P. Simple techniques for the surgical occlusion of coronary vessels in the rat. Angiology 1: 398-407, 1978.

SOONPAA, M.H.; KOH, G.Y.; KLUG, M.G. and FIELD, L.J. Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium. Science 264: 98-101, 1994.

SPADARO, J.; CICOGNA, A.C.; TUCCI, P.J.F.; CURY, P.R. and MONTENEGRO, M.R. Morphometric evaluation of the time course of right ventricular hypertrophy after left artery coronary ligation in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 22: 517-522, 1989.

SUGANO Y, ANZAI T, YOSHIKAWA T, MAEKAWA Y, KOHNO T, MAHARA K, NAITO K, OGAWA S (2005) Granulocyte colony-stimulating factor attenuates early ventricular expansion after experimental myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* Feb 1;65(2):446-56

SUZUKI, K.; BARI MURTUZA, M.A.; SUZUKI, N; SMOLENSKI.; R.T.; *e cols.* Intracoronary infusion of skeletal myoblasts improves cardiac function doxorubicin-induced heart failure. *Circulation* 104 (Suppl I): I-213-I-217, 2001.

TANAKA, R.; MATSUDAIRA, T.; AIZAWA, J.; EBIHARA, Y.; MURAOKA, K.; TSUJI, K.; IKEBUCHI, K.; KODAMA, K.; TAKAKU, F. and NAKAHATA, T. Characterization of peripheral blood progenitor cells (PBPC) mobilized by (rHuG-CSF) in normal volunteers dose-effect relationship for with the character of mobilized PBPC. *British Journal of Haematology.* 92:795-803, 1996.

TAVASSOLI, M. Expansion of blood stem cell pool or mobilization of its marrow counterpart. *Exp. Hematol.* 21:1205-1206, 1993.

TAVAZZI, L. Epidemiological burden of heart failure. *Heart* 1998;79(Suppl 2): S6-9.

TAYLOR, D.A.; ATKINS, B.Z.; HUNGSPREUGS, P.; JONES, T.R.; REEDY, M.C.; HUTCHESON, K.A; *e cols.* Regeneration functional myocardium: Improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nature Med* 4: 929-933, 1998.

TAYLOR, D.A.; SILVESTRY, S.C.; BISHOP, S.P.; ANNEX, B.H.; LILLY, R.E.; GLOWER, D.D. and KRAUS, W.E. Delivery of primary autologous skeletal myoblasts into rabbit heart by coronary infusion: A potential approach to myocardial repair. *Proceedings of the Association of Americans Physicians.* 109: 245-253, 1997

TO, LB.; HAYLOCK, DN. and DOWSE, T. A comparative study of the phenotype and proliferative capacity of peripheral blood (PB) CD34+ cells mobilized by four different protocols and those of steady-phase PB and bone marrow CD34+ cells. *Blood.* 84:2930-2939, 1994.

TOMITA, S; LI, R.K; WEISEL, R.D.; MICKLE, D.A.G.; KIM E-J; SAKAI, T.; *e cols.* Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* 1999;100 (Suppl): II-247-56.

TUREK, Z.; GRANDTNER, M; KUBAT, K.; RIGNALDA, M. and KREUZER, F. Arterial blood gases, muscle fiber diameter and inter capillary in cardiac hypertrophy of rats with an old myocardial infarction. *Pflugers Archives* 376: 209-215, 1978.

VELLENGA, E.; RAMBALDI, A.; ERNST, T.J.; OSTAPOVICZ,D. and GRIFFIN, JD. Independent regulation of M-CSF and G-csf gene expression in human monocytes. *Blood* 71:1529, 1988.

WAGERS, A., SHERWOOD, R., CHRISTENSEN, J. WEISSMAN, I. (2002) Little evidence for developmental plasticity of adults hematopoietic stem cells. *Science*, 2256-2259

WANG, J-S; SHUM-TIM, D.; CHEDRAWY, E. and CHIU, R.C-J. The coronary delivery of marrow stromal cells for myocardial regeneration: Pathophysiologic and therapeutic implications. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 122 (4): 699-705, 2001.

WANG, J-S; SHUM-TIM, D.; GALIPEAU, J.; CHEDRAWI, E.; ELIOPOULOS, N. and CHIU, R-C. Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages. *Ann Thorac Sur.* 20: 999-1006, 2000a.

WATARI, K.; ASANO, S.; SHIRAFUJI, N.; KODO, H.; OSAWA, K.; TAKAKY, F. and KAMACHI, S. Serum granulocyte colony-stimulating factor levels in healthy volunteers and patients with various disorders as estimated by enzyme immunoassay. *Blood* 73:117, 1989.

WIENER, I.; MINDCH, B. and PITCHON, R. Determinants of ventricular tachycardia in patients with ventricular aneurysms: results of intraoperative epicardial and endocardial mapping. *Circulation* 65 (5): 8566-8561, 1982.

WIESER, M.; BONIFER, R.; OSTER, W.; LINDEMANN, A.; MERTELSMANN, R. and HERMANN, F. Interleukin-4 induces secretion of CSF for macrophages from peripheral blood monocytes. *Blood* 73:1105, 1989.

WILLIAMS, D.A. Ex vivo expansion of hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 81:356-362, 1994.

YAMADA, M.; SUZUKI, K.; KUDO, S.; TOTSUKA, M.; NAKAJI, S. and SUGAWARA, K. Raised plasma G-CSF and IL-6 after exercise may play a role in neutrophil mobilization into the circulation. *J Appl Physiol* 92:1789-1794, 2002.

ZIMMER, H-G; MARTIUS, P.A and MARSCHNER, G. Myocardial infarction in rats: effects of metabolic and pharmacologic interventions. *Basic Res Cardiol* 84: 332-343, 1989.

ZOHLNHOFFER D, OTT I, MEHILLI J, SCHOMIG K, MICHALK F, IBRAHIM T, MEISETSCHLAGER G, VON WEDEL J, BOLLWEIN H, SEYFARTH M, DIRSCHINGER J, SCHMITT C, SCHWAIGER M, KASTRATI A, SCHOMIG A. Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: a randomized controlled trial. *JAMA*. Mar 1;295(9):1003-10. 2006

ZSEBO, K.; YUSTCHENKOFF, V.; SCHIFFER, S.; CHANG, D.; MCCALL, E.; DINARELLO, C.; BROWN, M.; ALTROK B. and BAGBY, G. Vascular endothelial cells and granulopoiesis: Interleukin-1 stimulates release of G-CSF and CM-CSF. *Blood* 71:99, 1988.

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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