

VÍVIAN YOCHIKO SAMOTO

**Terapia Celular Cardíaca: Vias de Infusão de Células Mononucleares em Cães
SRD**

**São Paulo
2006**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

VÍVIAN YOCHIKO SAMOTO

**Terapia Celular Cardíaca: Vias de Infusão de Células Mononucleares em Cães
SRD**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Departamento:
Cirurgia

Área de concentração:
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:
Pro^a. Dr^a Maria Angelica Miglino

SÃO PAULO

2006

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1651 FMVZ	Samoto, Vivian Yochiko Terapia celular cardíaca: vias de infusão decélulas mononucleares em cães SRD / Vivian Yochiko Samoto. – São Paulo: V. Y. Samoto, 2006. 105 f. : il. Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2006. Programa de Pós-graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres. Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres. Orientador: Profa. Dra. Maria Angélico Miglino. 1. Célula mononuclear. 2. Medula óssea. 3. Vias de infusão. 4. Coração. 5. Cães SRD. I. Título.
----------------	--

FOLHA DE AVALIAÇÃO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"


Comissão de Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Terapia celular cardíaca: vias de infusão de células tronco mononucleares em cães SRD", protocolo nº640/2005, utilizando 09 cães, sob a responsabilidade da Profª Drª Maria Angélica Miglino, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Cardiac cellulat therapy: pathways of mononuclear stem cell infusion in mongrel dogs", protocol number 640/2005, utilizing 09 dogs, under the responsibility of Profª Drª Maria Angélica Miglino, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 31 de março de 2005


Profª Drª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SAMOTO, Vivian Yochiko

Título: Terapia Celular Cardíaca: Vias de Infusão de Células Mononucleares em Cães SRD

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Dedicatória

A meus pais **Mitinobu** e **Yoriko Samoto** por todo amor, apoio, dedicação oferecidos.

Aos cães, pois foi com amor e respeito realizado, que hoje agradeço aqueles que se doaram sem compreender que suas vidas renasciam.

Agradecimentos

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Pela oportunidade de realização deste curso.

À FAPESP

Pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa.

À Professora Maria Angélica Miglino

Por me acolher e oferecer a oportunidade de pesquisar em uma inovadora área de trabalho.

À Érika Branco, Rosa Maria Cabral, Guilherme Ferreira (Mamão) e Guilherme Buzon – Grupo de Terapia Celular

Grandes amigos e irmãos que me ajudaram na realização deste projeto

Ao Hospital Pró-cardíaco e a Hans Fernando Rocha Dohmann, André Luiz Silveira Sousa, João Alexandre Resende Assad, Suzana Alves da Silva, Fábio Abrantes Tuche, Rodrigo Verney Castelo Branco, Ana Cristina Barbosa dos Santos Reis

Pela participação direta e dedicação nos trabalhos realizados com nossa equipe.

Aos Professores da FMVZ/USP: José Roberto Kfoury Jr, Francisco Hernandez Blasques, Antônio A. Coppi Maciel Ribeiro, Ângelo João Stopiglia e Maria Helena Akao Larsson,

Por cederem os laboratórios LTIAM, LSCA e Laboratório de Histologia, o Centro Cirúrgico de Cardiologia e pela realização de exames cardiológicos.

Aos Professores da Universidade Federal do Rio de Janeiro: Radovan Borojevic, Christina Maeda Takiya, Maria Isabel Doria Rossi e Maria Eugênia Leite Duarte,

Por auxiliar na realização do projeto, bem como na interpretação dos resultados.

Ao Professor Dr. Júlio César Balieiro

Pela orientação e realização das análises estatísticas.

À equipe de técnicos, funcionários e professores do setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Pela ajuda nos procedimentos da Pós-Graduação

Aos meus grandes amigos **Carlos Eduardo Ambrósio e Daniele dos Santos Martins**

Por me acolherem no início de meu mestrado, meus sinceros agradecimentos.

À Ana Rita de Lima, Elizângela dos Anjos Silva, Carla Fabiana Casagrande e Juliana Plácido Guimarães

Pelo companheirismo

Aos amigos que adquiri: **Tais Harumi Sasahara, Claudia Kanashiro, Janaína Munuera Monteiro, Rosemary Viola Bosch, Lílian Jesus de Oliveira, Emerson Ticona Fioretto, Flávia Thomaz Verechia Pereira, Antônio Assis Chaves Neto, Robson Fortes Giglio, Adriana Morini, Ana Paula Vidotti, Sandra F. Affonso e Cauê Lima Procópio.**

LISTA DE ABREVIATURAS

Ácido desoxirubonucléico: DNA
Células mononucleares da medula óssea: CMMO
Células-tronco embrionárias: ESCs
Células-tronco hematopoiéticas: HSCs
Células-tronco mesenquimais: MSCs
Centro de controle de zoonozes: CCZ
Colony forming units-fibroblasts: CFU-f
Fator de crescimento endotelial: VEGF
Fator de necrose tumoral α : TNF- α
Fator Inibidor de Leucemia: LIF
G-CSF:
Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: GM-CSF
Interleucina – 8: IL-8
Matriz metaloproteinase 9: MMP9
Medula óssea: MO
Sem raça definida: SRD
Stem cell factor: SCF
Stem cell: SC
Stromal derived factor-1: SDF-1

LISTA DE QUADRO

Quadro 1- Demonstração da vascularização cardíaca de cães SRD com ênfase na artéria coronária esquerda e seus segmentos e sub-segmentos (LOURENÇO, 2003).....	25
---	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Fotografias demonstrando a seqüência de procedimentos realizados desde a coleta de medula óssea através da punção da crista ilíaca (A), separação das células-tronco mononucleares através de gradiente de densidade (B) e finalmente a infusão (C).46
- Figura 2- (A) Cateter injetando contraste na região do seio aórtico, observe o refluxo de contraste no arco aórtico; (B) artéria circunflexa esquerda com o sub-ramo marginal ventricular esquerda (seta); (C) Cateter guia e cateter balão na artéria marginal ventricular esquerda e (D) Cateter balão insuflado e injeção de contraste.48
- Figura 3- Fotomicrografias demonstrando a presença de células-tronco mononucleares (seta) em: (A) átrio esquerdo - 50 μ m, (B) transição átrio/ventrículo esquerdo - 50 μ m, (C) abaixo da bifurcação da artéria marginal do ventrículo esquerdo - 100 μ m, (D) ápice do coração - 50 μ m. Coloração: Evans Blue49
- Figura 4- Fotomicrografia da região átrio-ventricular esquerda. As figuras A e A' correspondem a região atrial, B e B' transição átrio/ventrículo, C e C' abaixo do ramo marginal ventricular e D e D' região apical. Colorações: HE (A-D) e Tricromo de Masson (A' - D'); Barras: 40 μ m (A-C).....50
- Figura 5- Fotomicrografia de septo. Septo cardíaco em região proximal (A), média (B) e distal (C). Coloração: Evans Blue; Aumento: 50 μ m.....51
- Figura 6- Fotomicrografias da região septal, correspondendo A/A' à região proximal, B/B' região média e C/C' a região distal. Observar a presença de células tronco mononucleares em região muscular intersticial é maior em relação à quantidade em tecido conjuntivo. Colorações: HE - (A/C) e Tricromo de Masson (A'-C'); Barras: 40 μ m (A, B, B',C e C') e 100 μ m (A' e C').....52
- Figura 7- Fotomicrografia de átrio e ventrículo direito. Em (A) região de átrio direito; (B) transição átrio/ventrículo direito; (C) região ventral à bifurcação da artéria marginal ventricular e (D) ápice ventricular direito. Coloração: Azul de Evans; Barras:50 μ m (A, C e D) e 20 μ m (B).....53

- Figura 8- Fotomicrografias da região átrio-ventricular direita. Observar a normalidade do tecido cardíaco. Colorações: A à D - HE e A' à D' – Tricromo de Masson. Barras 100µm (A, A', B'e D) 40µm (B, C, C' e D').
.....54
- Figura 9- Presença de células-tronco em tecido pulmonar (A) pulmão e hepático (B). Coloração: Evans Blue. Aumento: 100µm.55
- Figura 10- (A) Fluoroscopia demonstrando arco aórtico (*) e região de seio coronário ingurgitados com contraste (♦); (B) presença do cateter Noga (seta dupla) no ventrículo esquerdo; (C) cateter Noga (seta dupla) no ventrículo esquerdo e infusão de contraste em seio coronariano (seta simples).57
- Figura 11- Mapeamento cardíaco (NOGA). Os pontos pretos estão referem-se aos locais de infusão de células. Na figura a esquerda observe a máxima voltagem do tecido cardíaco praticamente como um todo, com exceção à base do coração. Já na figura à direita, a condutância do impulso cardíaco tornou-se normal, despolarização atrial, seguindo para região das fibras de Purkinje.58
- Figura 12- Fotomicrografias de átrio e ventrículo esquerdo no qual pode-se observar a presença de células em todas as porções, sendo elas: (A) átrio esquerdo, (B) transição átrio/ventrículo esquerdo, (C) abaixo da bifurcação da artéria marginal do ventrículo esquerdo, (D) ápice do coração. Coloração: Evans Blue. Barras: A, B e D (50µm) e C (20µm).59
- Figura 13- Fotomicrografias da região átrio-ventricular esquerda, sendo A/A' região atrial, B/B' transição átrio-ventricular, C/C' abaixo da região de artéria marginal ventricular e D/D' ápice cardíaco. Colorações: HE (A-D) e Tricromo de Masson (A' – D'). Barras: 20µm (D), 40µm (A,B,C e D') e 80µm (A', B' e C').60
- Figura 14- Fotomicrografias da região de septo cardíaco em porções proximal (A), média (B) e distal (C). Sendo que em todas as porções foram observadas presenças de células mononucleares. Coloração Azul de Evans. Barras: 20µm (A) e 50µm (B e C).61

- Figura 15. Fotomicrografias da região septo cardíaco. Sendo A/A' região proximal, B/B' média e C/C' distal. Colorações: HE (A- C) e Tricromo de Masson (B' – D'). Barras: A-C e B' – D' (40 μ m) e A' (80 μ m).62
- Figura 16- Fotomicrografia de átrio e ventrículo direito. Em (A) região de átrio direito; (B) transição átrio/ventrículo direito; (C) região ventral à bifurcação da artéria marginal ventricular e (D) ápice ventricular direito. Coloração: Azul de Evans. Barras: 100 μ m (A) e 40 μ m (B, Ce D).63
- Figura 17- Fotomicrografias da região átrio-ventricular direita. Os segmentos A/A' referem-se a região atrial, B/B'transição átrio-ventricular, C/C' região abaixo da artéria marginal ventricular e D/D' ápice. Observar a grande quantidade de células entremeadas ao tecido conjuntivo.64
- Figura 18- Fotomicrografia no qual uma célula mononuclear encontra-se em região periportal. Coloração: Azul de Evans. Aumento de 40 μ m.65
- Figura 19- (A) localização do arco aórtico e do óstio do seio coronário, observar pela infusão de contraste; (B) catéter em veia cava cranial; (C) observe o catéter na artéria preenchida com contraste (seta simples); (D) presença do catéter em artéria e veia (seta dupla).67
- Figura 20- (A) infusão de contraste em artéria; (B) catéter balão arterial infulado com injeção de contraste; (C) cateter balão arterial e catéter venoso com infusão de contraste; (D) catéter arterial e venoso insuflados com infusão de células mesenquimais em veia.68
- Figura 21- Fotomicrografias de átrio e ventrículo esquerdo no qual pode-se observar a presença de células em todas as porções, sendo elas: (A) átrio esquerdo, (B) transição átrio/ventrículo esquerdo, (C) abaixo da bifurcação da artéria marginal do ventrículo esquerdo, (D) ápice do coração. Coloração: Evans Blue. Barras:20 μ m(A, C e D) 40 μ m (B).69
- Figura 22- Fotomicrografia de luz no qual podemos observar a presença de células mononucleares em todo tecido cardíaco em (A e A') região atrial, (B e B') região átrio-ventricular, (C e C') região média e (D e D') região apical. Colorações: HE e Tricromo de Masson. Barra 40 μ m.70
- Figura 23- Fotomicrografias da região de septo cardíaco em porções proximal (A), média (B) e distal (C). Sendo que em todas as porções foram

- observadas a presença de células mononucleares. Coloração Azul de Evans exceto em A. Barras: 20 μ m (A e C) e 40 μ m (B).71
- Figura 24- Fotomicrografias da região de septo cardíaco no qual A e A' referem-se à região proximal, B e B' região mediana e C e C' á região distal. Em todas as áreas podem ser observadas grandes quantidades de células mononucleares, principalmente em locais em que há tecido conjuntivo. Figuras de A à C: coloração HE, Barras de 50 μ m, 200 μ m, 100 μ m e 100 μ m respectivamente. Figuras A' à C': Coloração Tricrômio de Masson e Barras de 40 μ m, 100 μ m e 100 μ m respectivamente.72
- Figura 25- Fotomicrografias de átrio e ventrículo direito no qual pode-se observar a presença de células em todas as porções, sendo elas: (A) átrio esquerdo, (B) transição átrio/ventrículo esquerdo, (C) abaixo da bifurcação da artéria marginal do ventrículo esquerdo, (D) ápice do coração. Coloração: Evans Blue. Aumento de 20 μ m.73
- Figura 26- Fotomicrografias de átrio e ventrículo direito no qual pode-se observar a presença de células em todas as porções, sendo elas: (A/A') átrio esquerdo, (B/B') transição átrio/ventrículo esquerdo, Coloração: A-D (HE) e A'-D' (Tricromo de Masson); Barras: 40 μ m (C,D'), 80 μ m, 100 μ m (A, A',B, B', C' eD).74
- Figura 27- Fotomicrografias de epifluorescência no qual pode-se observar a presença de células tronco mononucleares em (A) baço, (B) pulmão e (C) língua. Coloração: Azul de Evans. Barras: 20 μ m (A e B) e 40 μ m (C).75
- Figura 28- Fotomicrografias vasos em tecido cardíaco, no qual podemos observar células aderidas ao endotélio (setas pretas) em diferentes vias de infusão de células mononucleares. A) via transendocárdica – célula endotelial (seta vermelha); B) Via anterógrada ou intracoronariana e C) via retrógrada. Coloração HE, Barras 10 μ m.76
- Figura 29- Fotomicrografias de fluorescência, no qual podemos observar células marcadas com Hoechst[®] (azul) em tecido conjuntivo peri-vascular. A) via anterógrada; B) via Transendocárdica e C) via retrógrada. Barras 10 μ m.77
- Figura 30- Fotomicrografias de cortes semi-finos de musculatura cardíaca. Observe que não há alterações no tecido após infusão. Observe a

grande vascularização no tecido, bem como a disposição das fibras aos discos intercalares separando-as. Coloração: Azul de Toluidina.

Barras: (A, B, D e F) 10 μ m e (E) 20 μ m.78

Figura 31- Fotomicroscopia eletrônica de transmissão de cães no qual foram infundidas células mononucleares da medula óssea por diferentes vias de infusão. Observe a normalidade do tecido, sendo que em (A) evidencia-se a presença de uma célula imatura, em (B) vaso apresenta-se entremeado a musculatura cardíaca, em (C) corte longitudinal de fibra cardíaca e em (D) corte transversal da fibra cardíaca. Barras: (A) 5nm; (B e C) 5 μ m; (D) 4,98 μ m.....79

LISTA DE TABELA

Tabela 1- Médias de quadrados mínimos do comportamento das regiões dentro de cada via de infusão	80
Tabela 2- Médias de quadrados mínimos do comportamento das regiões dentro de cada via de infusão	81

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1- Quantificação do número de células em relação às regiões atrial, basal, medial e apical.....81
- Gráfico 2- Quantificação do número de CMMO em relação às vias de infusão. Observar que a via transendocárdica apresenta um maior número de células em relação às vias intracoronariana e retrógrada.81

RESUMO

SAMOTO, V.Y. **Terapia celular cardíaca: vias de infusão de células mononucleares em cães SRD.** [Cardiac Cellular Therapy: Pathway of Mononuclear Stem Cell Infusion in Mongrel Dogs]. São Paulo, 2006. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2006.

As células-tronco adultas possuem capacidade de se transformar em certos tipos de tecidos. Surge desta forma, uma nova modalidade de tratamento para doenças cardíacas, assim, uma avaliação na distribuição e quantificação do número de células por diferentes vias de infusão tornam-se importantes, pois o microambiente e interação célula/célula interferem no processo de transdiferenciação e/ou fusão. Foram utilizados nove cães, com peso entre 25 e 30kg e hípidos, no qual foi realizada punção, separação, marcação e infusão de células mononucleares da medula óssea pelas vias intracoronariana, transendocárdica e venosa retrógrada. Pôde-se observar a presença de células por todo tecido cardíaco em todas as vias, contudo o padrão de distribuição das mesmas difere, no qual há um predomínio de células em tecido conjuntivo, principalmente em epicárdio nas vias transendocárdica e venosa retrógrada e um padrão intersticial muscular intracoronariana. Há diferenças significativas na quantidade de células nas regiões apical, basal, medial e apical quando relacionada à via de infusão ($P < 0,01$).

Palavras-chave: Células mononucleares. Medula óssea. Vias de infusão. Coração. Cães.

ABSTRACT

SAMOTO, V.Y. **Cardiac cellular therapy: pathway of mononuclear stem cell infusion in mongrel dogs**. [Terapia Celular Cardíaca: Vias de Infusão de Células Mononucleares em Cães SRD]. São Paulo, 2006. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2006.

The adult stem cells have a capacity to transform in different kinds of tissue. It is emerges like a new treatment modality of cardiac diseases, so, an evaluation in cell distribution and quantification by different routes of infusion in heart are necessary, because the microenvironment and the interaction cell/cell age in the transdifferentiation and fusion process. It was used 09 healthy mongrel dogs, with 25 -30kg of weight, which was performed a puncture of iliacal crest, bone marrow mononuclear cells separation by Ficoll density, stained with Hoechst and infusion by intracoronary, transendocardial and retrograde routes. The marked cells was observed in all cardiac tissue, however, the pattern of distribution of the same ones differs, however in the transendocardial and retrograde route the cells could be founded mainly into the connective tissue – epicardium and sub-epicardic connective tissue and in the intracoronary route, the cells was observed mainly in the muscular interstice. It was observed a significant number of cells in the atrial, basal, medium and apical cardiac region when related with the route of infusion.

Keywords: Mononuclear cells. Bone marrow. Routes of infusion. Heart. Mongrel dogs.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
2	OBJETIVOS	24
2.1	OBJETIVOS GERAIS	24
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
4	MATERIAL E MÉTODO.....	38
3.1	<i>Obtenção das células mononucleares da medula óssea</i>	38
3.2	<i>Separação das células mononucleares da medula óssea</i>	39
3.3	Protocolo de marcação do dna celular: <i>Hoestch</i> [®]	40
3.4	Vias de Infusão	40
3.4.1	Transplante intracoronariano	40
3.4.2	Transplante transendocárdico.....	41
3.4.3	Transplante retrógrado por via venosa coronariana.....	41
4.5	Coleta do material	42
4.6	Quantificação celular.....	44
4.6.1	Quantificação por estereologia	44
4.6.2	Análise Estatística	44
5	RESULTADOS.....	46
5.1	Resultados referentes à coleta e coloração células mononucleares da medula óssea.....	46
5.2	Resultados referentes aos procedimentos de infusão células mononucleares da medula óssea pela via intracoronariana ou anterógrada à confecção de lâminas	47
5.3	Resultados referentes à infusão de células mononucleares da medula óssea pela via transendocárdica.....	56
5.4	Resultados referentes à infusão de células mononucleares da medula óssea pelo seio venoso ou via retrógrada.	66
5.5	Resultados referentes a processos de reendotelização ou adesão Celular..	76
5.6	Resultados referentes à análise dos cortes semi-fino e microscopia eletrônica de transmissão.....	77
5.7	Resultados morfométricos por quantificação do número de células através de métodos estereológicos.	88
6.	DISCUSSÃO	82
7.	CONCLUSÕES	86
	REFERÊNCIAS	88
	ANEXO	96

1 Introdução

As células tronco, também conhecidas como “*stem cells*” ou células mãe, foram descritas pela primeira vez por Friedenstein, Gorskajak e Kalajina (1974), os quais caracterizaram estas como *stem cells* fibroblásticas capazes de formar colônias (fibroblastos formadores de colônias: CFU-f). Possuem morfologia fibroblastóide, com alta capacidade para replicação e, após estímulo apropriado podem se diferenciar em todos os tipos celulares (CARDOSO, GONZÁLEZ e EZQUERRA, 2003).

A terapia celular na reparação das células miocárdicas é vislumbrada como uma das estratégias terapêuticas de maior futuro em relação ao tratamento da insuficiência cardíaca, pois têm-se demonstrado que variados tipos de *stem cells* podem se diferenciar em células miocárdicas e outros tecidos necessários para a regeneração do miocárdio lesado, enquanto que outros estudos em animais sugerem que o músculo (mioblasto), a medula óssea (células progenitoras mesenquimais, endoteliais ou hematopoiéticas) e até células do próprio coração, podem ajudá-lo a melhorar a sua contratilidade *in vivo*. O reparo potencial realizado pelas células implantadas ou de células mobilizadas endogenamente é de extrema importância para doenças do coração, no qual a diminuta capacidade de proliferação celular dos cardiomiócitos contribuírem para a irreversibilidade da falência cardíaca (HIDEMASA, 2003). Além da utilização destas em problemas cardíacos, podemos

também citar que a mesma tem grande importância nos casos de doenças hematológicas e degenerativas (ZATS, 2002).

As alterações cardíacas em humanos têm importante relevância na atualidade, seja pelo sedentarismo, pela má alimentação ou mesmo por causas genéticas, podendo-se observar um aumento nos índices da sua ocorrência e, a principal consequência é a interferência na contratilidade e função deste órgão.

Além disso, são escassos os recursos de tratamento para estas afecções, sendo que o tratamento médico e utilização de marcapassos são limitados e há ainda uma escassez de órgãos para transplante (COLINO, 2003), por este motivo, torna-se importante estudos com células-tronco, objetivando tanto o reconhecimento da formação de músculo quanto à formação de novos vasos e Hassink (2003), relata que recentes experimentos e observações clínicas têm sugerido que o transplante de células pode ter valor terapêutico no tratamento de doenças cardíacas. Isto pôde ser baseado na idéia que o transplante de cardiomiócitos poderia se integrar com o miocárdio e contribuir com a função cardíaca. Porém, por motivos éticos ou tecnológicos a infusão de células ainda é limitada, sendo importante realizar correlação da função e adaptação destas células em modelos animais (VILQUIN et al, 2002). Em modelos murinos os resultados específicos da terapia com células-tronco da medula óssea é extremamente difícil de se acessar em relação à diferenciação em miócitos ou vasos e qual a porcentagem destes que contribuem para a melhora da função cardíaca (CAPLICE e GERSH, 2003). Neste estudo pretende-se observar qual a via de infusão de células mononucleares da medula óssea leva a um maior enxerto celular em tecido cardíaco.

2 Objetivos

Neste trabalho pretende-se comparar os métodos de infusão de células mononucleares da medula óssea (CCMO) em coração de cães sem raça definida (SRD) e, mediante resultados obtidos, servirão como base para outras pesquisas em animais e seres humanos.

Objetivos gerais

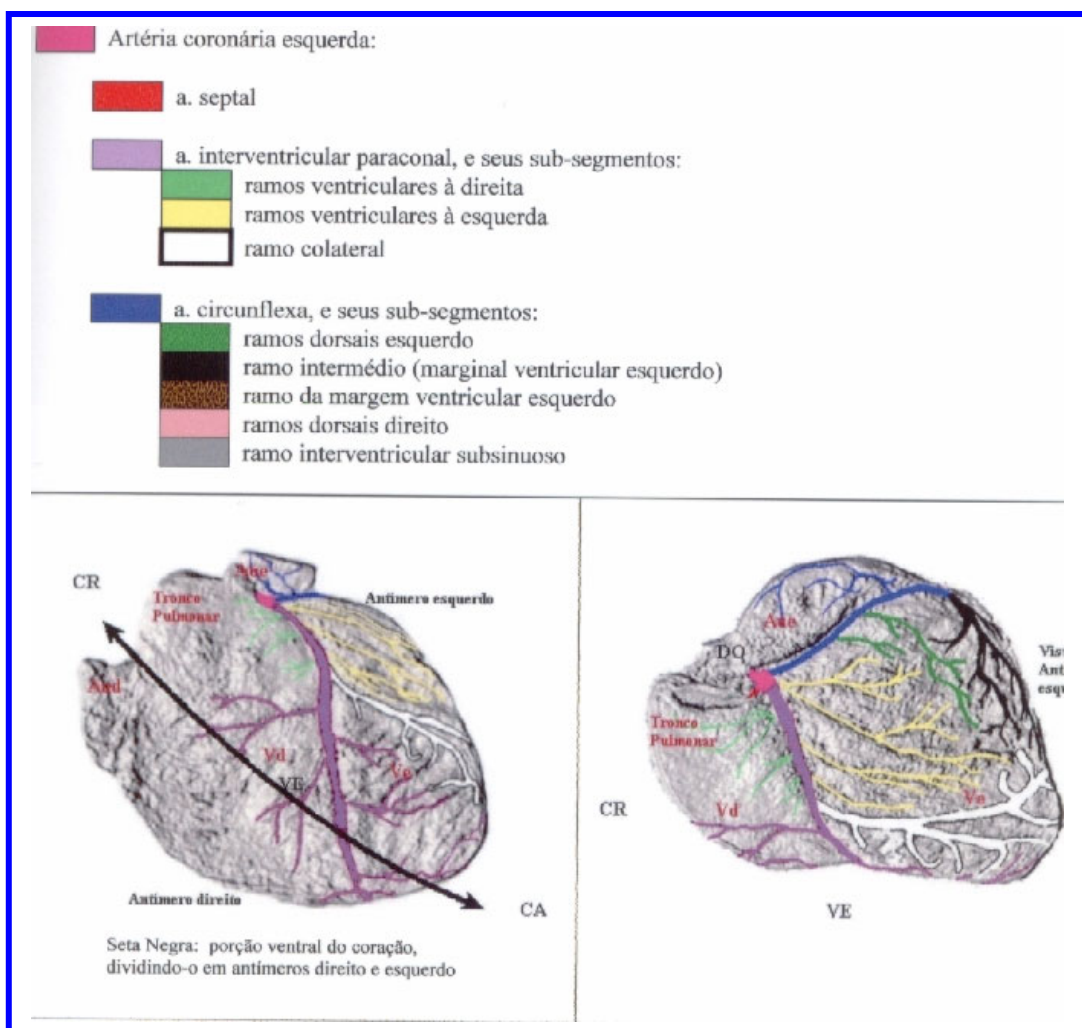
Testar a eficácia e a seguridade dos métodos de infusão de células mononucleares da medula óssea em coração.

2.2 Objetivos específicos

Quantificar e definir qual a via leva a um maior enxerto de células em tecido cardíaco.

3 Revisão bibliográfica

O coração é o órgão central muscular oco que funciona como uma bomba de sucção e pressão, sendo que as diferenças de pressão causadas pela sua contração e relaxamento determinam a circulação do sangue. A vascularização do coração é realizada pelas artérias coronárias direita, esquerda e seus ramos. A drenagem é realizada por numerosas veias que desembocam no seio coronário (GETTY, 1986 e LOURENÇO, 2003) (Quadro 1).



Quadro 1- Demonstração da vascularização cardíaca de cães SRD com ênfase na artéria coronária esquerda e seus segmentos e sub-segmentos (LOURENÇO, 2003).

A maior causa da falência cardíaca resulta da oclusão das artérias, sendo que a perda do fluxo sanguíneo leva a isquemia, infarto, necrose seguida por um

remodelamento tecidual, cicatriz, afetando a função do miocárdio (ORLIC, 2003). A perda de miócitos, arteríolas e capilares da área infartada é irreparável, resultando em formação de tecido cicatricial como dito anteriormente. Por esta razão estudos clínicos e experimentais tem principalmente focado na limitação do tamanho do infarto (ORLIC et al, 2001). A neoangiogênese previne posteriormente o remodelamento cardíaco através do aumento do fluxo no miocárdio, limitando desta maneira a apoptose das células cardíacas (miócitos) e reduzindo a deposição de colágeno e, conseqüentemente a formação cicatricial (ASSUMS et al, 2003). Os miócitos cardíacos são a maior fonte de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) no coração e a perda específica dos mesmos traz profundos efeitos sobre a sua função e vascularização (ABBOTT e GIORDANO, 2003).

As “*stem cells*” embrionárias (ESCs) tem sido isoladas em ratos por há mais de 20 anos, mas somente durante os últimos cinco anos é que as “*stem cells*” humanas foram isoladas com sucesso, sendo que a maioria dos laboratórios que o fazem, encontram-se nos Estados Unidos, Austrália e Suíça (MINKOWSKI, 2003). Estas células são pluripotentes e oriundas da massa interna do blastocisto e podem se diferenciar em qualquer um dos mais de 200 tipos de tecidos do corpo. São encontradas nas fases iniciais de desenvolvimento embrionário e há também células-tronco multipotentes (acredita-se que possuem restrita diferenciação) estão localizadas em tecidos adultos, especializados (HENNINGSON, STANISLAUS e GEWIRTZ, 2003).

Na medula óssea de mamíferos adultos, as células sanguíneas desenvolvem-se dentro de uma rede complexa de fatores de regulação humoral, celular e da matriz (DEXTER et al, 1983). Durante o desenvolvimento pós-natal os locais de atividade de hematopoiese mudam: há um grande decréscimo da atividade do fígado quanto a esta função e um aumento da atividade do baço. Em mamíferos

adultos as *stem cells* hematopoiéticas e células progenitoras residem na medula óssea no qual encontram-se em íntimo contato com o estroma. (SIMINIAK, 2003). Os tipos de células tronco encontradas na medula óssea são as CD34⁺ e CD34⁻ (JACKSON et al, 2001).

As células-tronco adultas da medula óssea consistem em uma série de populações de células pluripotentes. A medula óssea contém células-tronco hematopoiéticas (HSCs) e células tronco mesenquimais (MSCs) que derivam de uma célula primitiva, precursora. Ambos os tipos celulares quando injetadas auxiliam principalmente na vasculogênese (POULSON et al, 2002). Acredita-se que os hemangioblastos são as mais primitivas células da medula. Elas são a fonte das *stem cells* hematopoiéticas e das células precursoras endoteliais no saco vitelínico de embriões, sendo que existem evidências que esta função está preservada na medula óssea (ORLIC, 2004), por isso, deve-se tomar cuidado ao atribuir benefícios a uma célula específica da medula óssea quando a mesma possui células de várias linhagens e fenótipos (CAPLICE e GERSH, 2003).

As vantagens da utilização das células tronco adultas no transplante autólogo são a: fácil obtenção, sem objeções éticas, habilidade de expansão, alta compatibilidade, não há necessidade de imunossupressão, aplicações clínicas já realizadas e podem ser uni, bi, multi ou pluripotentes. Desvantagem: não há marcadores específicos (STRAUER e KORNOWISKI, 2003).

O transplante autólogo de células tronco da medula óssea é seguro e não há evidências de toxicidade sistêmica ou local em fase aguda ou crônica. Também não foram observadas zonas de calcificação, produção de células sanguíneas ou resposta inflamatória como migração de neutrófilos ou linfócitos (HAMANO et al, 2002).

É evidente que existem diferentes tipos de células-tronco, tanto em tecidos embrionários quanto em indivíduos. A vida destas células pode se estender em culturas de tecidos, levando a produção de linhagens de *stem cells* embrionárias (TEMPLE, 2003). Provavelmente as células-tronco obtidas através da medula óssea (MO) são as que têm maior capacidade para se diferenciar em fibras musculares cardíacas ou em células endoteliais e, também vão contribuir para a angiogênese ou vasculogênese, uma vez que nesta são encontradas hemangioblastos, que pode dar origem a hemácias ou promover angiogênese (ORLIC, 2004).

As células tronco hematopoiéticas também conhecidas como células mesenquimais (COVAS et al, 2000) tem uma maior predisposição para se transformar em células endoteliais contribuindo com a vasculogênese (CARDOSO, GONZÁLEZ e EZQUERRA, 2003).

Depois de uma proliferação indiferenciada *in vitro* por 4 – 5 meses, estas células ainda possuem um potencial de desenvolvimento para desenvolver o trofoblasto e derivados de todas as três camadas germinativas, incluindo epitélio (endoderme) epitélio estratificado (ectoderme), cartilagem, osso, músculos estriados (mesoderme), epitélio neural e gânglios.

As *stem cells* podem se diferenciar em outras células de acordo com a presença de moléculas que se encontram no meio e também pelo contato direto de célula-célula atuando no controle do microdesenvolvimento da diferenciação de *stem cells* adultas para cardiomiócitos (RANGAPPA et al, 2003).

Estas linhagens de células podem ser utilizadas em desenvolvimentos biológicos em humanos, descobertas de novos medicamentos e em transplantes (THOMSON et al, 1988). Utiliza-se a citocina LIF (Fator Inibidor de Leucemia) para manter o padrão indiferenciado das células enquanto em cultura (RAMUSSEN, 2003). Este fator (LIF) dirige a renovação das *stem cells* embrionária (ES) pela

ativação do fator de transcrição STAT3. Em culturas séricas, contudo, a LIF é insuficiente para bloquear a diferenciação neural e mantém a pluripotência (YING, 2003).

A utilização de células como estratégia para a regeneração ou reparação de tecidos contribui para uma vasta área de investigação, sendo que a biomedicina tem um grande interesse nesta. O conceito de medicina biorregenerativa encontra-se baseada na utilização das células do próprio organismo (CARDOSO, GONZÁLEZ e EZQUERRA, 2003). Além disso, o transplante celular foi desenvolvido como uma estratégia para melhorar a estrutura e a função cardíaca (HENNINGSON, STANISLAUS e GEWIRTZ, 2003).

A terapia celular surge como um tipo potencial de intervenção terapêutica para o tratamento de doenças cardíacas (HASSINK et al, 2003), pois infelizmente, a necrose miocárdica inicia-se rapidamente após a oclusão arterial. A perda do miocárdio viável inicia um processo adverso de remodelamento, levando a dilatação da câmara cardíaca e disfunção na contratilidade (WOLLERT et al, 2004) e (NIR et al, 2003).

Os cardiomiócitos podem ser formados, de diversos tipos de células pluripotentes. A escassa transformação das células hematopoiéticas em cardiomiócitos induz a utilização de infusão de células por injeções intracardíacas ou a mobilização por citocinas. O principal efeito *in vivo* das células indiferenciadas oriundas da medula óssea ou do endotélio é a neoangiogênese, sem especificidade cardíaca, mioblástica esquelética apesar da sua integração e sobrevivência (HIDEMASA, 2003).

A infusão das células tronco mediante injeções intracardíacas possibilita administrar mioblastos de forma percutânea, pois estes são capazes de migrar através da microcirculação e de se integrar no interstício. Um dos principais

inconvenientes das células-tronco musculares é a impossibilidade de adquirir características do músculo estriado cardíaco necessárias para transmitir o estímulo eletromecânico e, portanto a sua função. Podemos citar além da injeção intracardíaca outras formas de implantação de células como pelas vias intracavitária ou intramiocárdica.

A mobilização de “*stem cell*” a partir do “*stem cell factor*” (SCF) e fator de estimulação granulocítico (G-CSF) resultou em regeneração miocárdica, melhora da função ventricular e diminuição da mortalidade em ratos com infarto agudo do miocárdio (ARAI, 2003).

As células estriadas esqueléticas apresentam mais capacidade de regeneração dos que as células cardíacas e são menos suscetíveis às injúrias isquêmicas o que sugere a possibilidade de introduzir células esqueléticas no coração para reparar alterações patológicas e funcionais do órgão. O potencial destas células esqueléticas realizarem trabalho das células cardíacas foi confirmado pela plasticidade bioquímica e fisiológica do músculo esquelético induzido por despolarização elétrica e cardíaca. Entretanto o transplante de células estriadas esqueléticas intracardíaca revelou uma restauração limitada do miocárdio proveniente da função ventricular (HASSINK et al, 2003).

As células-tronco mesenquimais da medula óssea são extremamente hábeis em se diferenciar em diversos tipos celulares e, quando são expostas a 5-azacytidine, durante o cultivo, elas se diferenciam em cardiomiócitos. Posteriormente se regeneram e ocupam 68% da área infartada em nove dias depois do infarto agudo do miocárdio. O novo tecido inclui artérias, arteríolas e capilares (AL-RADI et al, 2003 e HASSINK et al, 2003 b).

Barbash et al, (2003) também utilizando células mesenquimais da medula óssea de ratos, verificaram através de estudos histológicos, que após uma semana da infusão, havia a presença confirmada de células do doador na área infartada.

A plasticidade das células-tronco refere-se à habilidade da mesma em adquirir o fenótipo de outra célula de um tecido ou órgão diferente. Há pelo menos quatro explicações para esta plasticidade: a) transdeterminação – relata que a célula-tronco encontra-se programada para gerar certas linhagens de células; b) transdiferenciação – neste processo a célula se diferencia e ganha o fenótipo de outra célula diferenciada; c) dediferenciação – este caso ocorre em células em células progenitoras ou precursoras que se diferenciam em outras células adultas e d) por fusão a uma célula madura (WATT, 2003).

Estudos estão sendo realizados com objetivo de identificar as células-tronco do coração em animais. Um problema fundamental nesta área de pesquisa está em estabelecer qual a melhor fonte das mesmas. As células-tronco não somente se diferenciam em miócitos cardíacos, mas também secretam citocinas como fator de crescimento endotelial, os quais, entre outros, promovem angiogênese e ativam as “*stem cells*” do tecido do qual foi realizado o transplante (KANG, KIM e PARK, 2004).

A diferenciação das células tronco da medula óssea em uma ou várias linhagens celulares, encontra-se em fatores (citocinas, hormônios, moléculas de adesão, etc) do meio no qual se encontra (DENNIS e CHARBORD, 2002).

A infusão de células pela via intracoronária é segura, não havendo evidência de aumento na taxa de re-estenose (WOLLERT, 2004). Por esta via as células ficam acumuladas e concentradas dentro da área infartada, no qual as células passam pela área infartada e peri-infartada já na primeira passagem. Por este motivo, acredita-se que o tecido é embebido por um máximo número de células viáveis

(STRAUER e KORNOWISK, 2003). Pela infusão intracoronariana as células foram encontradas em todas as camadas musculares, aparentemente dentro do lúmen de pequenos capilares e, ocasionalmente no interstício do músculo. Também pôde ser observado histologicamente a formação de pequenas colônias composta de células transplantadas. A via intracoronariana teoricamente é melhor em relação a intramuscular, pois não somente produz menos danos ao miocárdio, mas também dissemina globalmente as células transplantadas. Contudo a taxa de sobrevivência das células por esta via não foi adequada. Isto, segundo os autores, ocorre devido à dificuldade de translocação das células dos vasos para o interstício tecidual (SUZUKI et al, 2000). A infusão de células tronco pela via intracoronariana é uma das mais utilizadas, contudo, foi observado em cães a presença de microinfartos em tecido cardíaco. Os autores atribuem este fato ao diâmetro das células tronco (20 μ m) em relação aos microvasos cardíacos (VULLIET et al, 2004).

A injeção intramiocárdica é o método mais popular de infusão de células dentro do coração. Ela tem grande importância em casos de cardiopatia isquêmica devido à habilidade de entregar as células seletivamente dentro do tecido miocárdico, tanto em áreas normais quanto em infartadas. Contudo, as células por esta via formam pequenas “ilhas”, resultando em uma possível limitação de interação célula/célula (células transplantadas e cardiomiócitos). Esta via é passível de se infundir células e possui eficiência na distribuição das mesmas (SUZUKI et al, 2001). Não foram observadas complicações relacionadas à fase aguda (pós-cirúrgico) ou a seqüelas a longo termo. Além disso, por esta via a infusão de células pode ser realizada no local isquêmico (TSE et al, 2003).

A via transendocárdica tem como principal vantagem realizar a infusão de células através de visualização. Previamente é realizada a identificação anatômica da área, e até a distribuição das infusões. Contudo, pode causar injúria ao

miocárdio, induzir extra-sístoles e até mesmo arritmia ventricular (STRAUER e KORNOWISK, 2003).

A via venosa ou retrógrada é a via de administração considerada a mais fácil de ser realizada. A principal desvantagem, contudo, é que somente 3% do fluxo percorre o ventrículo esquerdo por minuto. Existe ainda a atenuação maior de captura de células pelos pulmões. Outro fator que deve ser levado em consideração é que por esta técnica as células demoram mais para atingir a área infartada (STRAUER e KORNOWISK, 2003). A principal desvantagem da utilização desta via para infusão células é a necessidade da passagem das mesmas nos tecidos, para que elas sejam capazes de se difundirem nas regiões peri-infartada e infartada. Em comparação, na via intracoronariana, as células-tronco entram em contato com o tecido imediatamente na primeira passagem (STRAUER et al, 2002). Contudo, mesmo quando injetadas por via venosa em locais de danos de cardiomiócitos, foi observado que elas contribuíram com desenvolvimento de novos vasos. Com isso fica demonstrado que não é necessário à infusão direta de células no local lesionado (KRAUSE, 2002).

Hou e colaboradores (2005) descreveram que a predominância de células radiomarcadas em modelo de isquemia cardíaca pela via retrógrada encontra-se basicamente na base do coração, átrio e ventrículo direito. Na via intramiocárdica, as mesmas estão localizadas predominantemente em parede antero-lateral do ventrículo esquerdo. Quando utilizada a via intracoronariana ou anterógrada, além das células localizarem-se preferencialmente na parede antero-lateral, algumas das mesmas também são observadas no ventrículo direito. Os mesmos autores relatam que a via que levou a uma maior retenção de células em tecido cardíaco, foi a intramiocárdica, contudo, esta diferença não foi significativa em relação às outras vias também testadas.

As intervenções que visam a revascularização coronariana causam danos à parede endotelial, bem como de sua camada mais profunda, podendo chegar a camada média e adventícia, levando a perda momentânea de suas funções. Assim podemos incluir a função antitrombótica, permeabilidade seletiva de células e macromoléculas e regulação da atividade das células musculares lisas, que se encontram na camada média, auxiliam o tônus vascular. Como resultado, mecanismos moleculares implicados na recuperação funcional do endotélio se iniciam de forma imediata, podendo ser observada proliferação das células da camada média auxiliando na secreção de matriz extracelular e das células endoteliais, que colonizarão as áreas até então sem endotélio. Estudos recentes reportam que reendotelização ativa-se principalmente por fator de crescimento endotelial (VEGF) e fator de crescimento derivado de fibroblastos (FGF), sendo que o primeiro é secretado pelas células musculares lisas, enquanto que o FGF é secretado tanto por estas células quanto pelas células endoteliais (MARTÍNEZ-GONZÁLEZ e BADIMON, 2000).

Mobilização é o termo referido quando as células-tronco ou células progenitoras são recrutadas e colocadas em circulação por processos de quimiotaxia. Este processo mimetiza a mobilização de células da MO quando a mesma é colocada em processos de reposta a injúria, stress ou inflamação.

A proliferação e liberação de células-tronco hematopoiéticas e células progenitoras requer um dinâmico e cíclico processo de destruição e reconstrução da MO, remodelamento ósseo. Nestes casos osteoblastos e osteoclastos estão interagindo. Além disso, ambos os processos parecem estar orquestrados pelos mesmos fatores. Por exemplo, a administração de G-CSF para o tratamento de neutropenia, pode induzir a osteoporose em alguns pacientes jovens. Um aumento no número de osteoclastos é observado após tratamento com G-CSF, estimulando a

reabsorção óssea durante a mobilização das “*stem cells*”, havendo também a liberação de cálcio. Os osteoclastos secretam altos níveis de IL-8 uma quemonina que mobiliza células (COTTLER-FOX et al, 2003).

Esta liberação pode ser induzida clinicamente, como uma resposta a uma injúria/inflamação, ou por uma gama de moléculas ou medicamentos: dano ao DNA, drogas quimioterápicas como a ciclofosfamida ou uma associação de medicamentos como a isosfamida, carboplatina e etoposide (ICE), citocinas como G-CSF, GM-CSF granulocyte-macrophage colony-stimulating factor e Flt-3 ligand e quemoninas como a IL-8 e SDF-1. A maioria dos componentes citados acima diferem no modo de administração, tempo para que se observe a mobilização. Destes a mais utilizada é a G-CSF (COTTLER-FOX, 2003).

A medula óssea secreta fatores pró-angiogênicos com efeito parácrino. Outro fator que leva a adesão e migração das *stem cells* na medula óssea, governando processos de remodelamento ósseo, são as proteínas Rho GTPases, sendo que especificamente a Rac e a Cdc42 parecem estar envolvidas especificamente na adesão, migração e proliferação as células tronco hematopoiéticas (ROSSI et al, 2005).

O SDF-1 (stromal derived factor-1) é uma quemonina que mobiliza as células mononucleares da medula óssea através de quimiotaxia (HATTORI, HEISSIG e RAFII , 2003). Seu receptor CXCR4 também auxilia no recrutamento destas células (ABBOTT et al, 2004). São cruciais para a mobilização das SC sendo que estudos ressaltam que as CD34+ são dose dependentes (VANDERVELDE et al, 2005) e a ausência dos receptores CXC4R e SDF-1 promove a morte peri-natal, pois os neonatos apresentam severos defeitos das stem cell presentes no fígado e que migram para a MO para o estabelecimento da hematopoiese.

Além de mobilizar as células por quimiotaxia ela também ativa a matriz metaloproteinase 9 (MMP9) na MO, que induz a liberação do kit-ligant permitindo a liberação de células hematopoiéticas de nichos quiescentes para nichos proliferativos (HATTORI, HEISSIG e RAFII, 2003) e (VANDERVELDE et al, 2005).

O SDF-1 é liberado mesmo em condições de homeostasia pela MO, endósteo, endotélio, adipócitos, entre outros (KOLLET et al, 2005). Contudo, é secretado principalmente por osteoblastos imaturos e são altamente expressados pelas células endoteliais. Além do SDF-1 o CXCL12, a interleucina 8 (IL-8/CXCL8) age em múltiplos ciclos de inativação e degradação de componentes proteolíticos da MO, como enzimas. Elastase, catepsina G, proteinase3, CD26 e várias metaloproteinases (MMPs) estão relacionadas como os principais agentes na mobilização de células progenitoras O SDF1 induz a liberação de enzimas, MMP2 e MMP9, por células CD43 imaturas e IL8 por mastócitos. O estímulo à liberação de IL8 leva a um aumento na concentração de neutrófilos, que tem papel importante na liberação de MMP9 (Petit et al, 2005). A expressão de SDF-1 é induzida por IL-1, PDGF, bEGF, G-CSF e é induzida por TGF e glicocorticóides (VANDERVELDE et al, 2005).

O CXCR4 é expresso por muitos tipos celulares como neurônios, células epiteliais e endoteliais, células linfóides, mielóides, hematopoiéticas maduras e imaturas.

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória que é secretada rapidamente após injúrias isquêmicas, é liberada por monócitos, macrófagos, mastócitos, fibroblastos cardíacos e cardiomiócitos. Quando liberada possui ação de recrutamento celular (CHRISTOPHERSON et al, 2004).

A interleucina também conhecida como CX ou CL8 é expressa por monócitos e células endoteliais, sendo fortemente liberada em situações inflamatórias. Possui

como ações: quimiotática para neutrófilos, mobilização de *stem cells*, está relacionada com a liberação de G-CSF e da enzima MMPS (matriz metalo proteinase 9).

O VEGF é um grupo protéico produzido por vários tipos celulares. Os receptores são VEGFA: VEGFR1 (Flt-1) e VEGF-R2 (Flk-1 ou KDR) é produzido e liberado por cardiomiócitos. São importantes para a diferenciação endotelial, migração e proliferação e remodelamento vascular. Possui como ação básica a angiogênese (VANDELVERDE, 2005).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 09 cães machos e fêmeas, SRD, saudáveis, para testar qual a melhor via de infusão de células mononucleares da medula óssea (CMMO) no coração. Para tal procedimento, as células foram marcadas previamente com marcador de DNA (Hoestch[®] – Sigma) objetivando verificar qual das vias propiciam maior e melhor aderência destas no tecido cardíaco.

Após obtenção dos animais no CCZs (Centros de Controle de Zoonozes) foi determinado o estado de higidez de cada animal. Para isso, realizaram-se exames físicos (parâmetros de frequência cardíaca, respiratória, estado de hidratação, aferição da temperatura e linfonodos), bioquímicos (função renal e hepática) e verificação do *status* cardíaco (eletrocardiografia e ecocardiograma). Todos os animais foram colocados sob fluidoterapia que estará complementada de Ornitagin, Complexo B, Vitamina C e glicose, objetivando melhorar o estado de saúde dos mesmos, caso tivesse sido detectada esta necessidade durante o exame de rotina. Também foi administrado vermífugo (Drontal Plus[®]). Ivermectina[®] e Imisol[®] com Atropina, nos casos de detecção de enfermidade hematológica.

4.1 Obtenção das Células Mononucleares da Medula Óssea

Posteriormente à assepsia da região da crista ilíaca, foi realizada analgesia da pele, tecido subcutâneo e periósteo, seguido de uma incisão de 3mm na pele para a realização da punção. A agulha foi introduzida na medula e, através de pressão negativa foram aspiradas aproximadamente 40ml de medula óssea foram aspiradas utilizando agulha (Jamishidi[®] - HS MEDICAL) acoplada a uma seringa previamente

“lavada” com heparina - Actiparin[®]:heparina sódica Bergamo (CROW e WALSHAW, 2000).

Todo o procedimento de coleta foi realizado com animal em fluidoterapia e em plano anestésico. Para isto, utilizou-se Propovan[®] (Propofol - Cristália) na dosagem de 5 mg/kg intravenoso.

4.2 Separação das Células Mononucleares da Medula Óssea

Do total coletado, frações de 20ml de medula óssea foram separadas e colocadas em dois tubos Falcon, adicionando-se aos mesmos solução fisiológica 0,9% na proporção de 1:1. Em dois outros tubos foram colocados 20 ml de Ficoll-Paque[™] Plus[®] (Amersham Pharmacia) em cada um. Com auxílio de uma pipeta, esta solução foi adicionada à medula óssea diluída, de modo que esta caísse gota à gota na parede do tubo. Depois esta nova solução (medula +solução fisiológica + Ficoll) foi colocada em uma centrífuga (Centrífuga[®]) por 25 minutos, com uma velocidade de 1600rpm e à temperatura de 20°C. A partir deste momento pode-se observar a formação de uma halo de células mononucleares. Estas foram coletadas com uma pipeta Pasteur e colocadas em um outro tubo adicionando-se ao mesmo uma solução de soro fetal bovino adicionado de solução fisiológica à 0,9%, em uma proporção de 5 ml de soro fetal e 30ml de solução fisiológica. Novamente o material foi colocado em centrífuga por sete minutos, com uma velocidade de 1200rpm e à temperatura de 27°C. Despreza-se o sobrenadante e, o *pelet* formado é diluído na solução acima citada e, então filtrado em uma malha de Nylon[®] com poros de 150µm. Este novo pelet foi diluído na solução de soro fetal e solução fisiológica e

colocadas em centrifugação na mesma temperatura, velocidade e tempo citados anteriormente. Retirou-se uma pequena alíquota e fez-se a contagem de células com azul de tripan. Esta objetivou observar o grau de viabilidade das células e conseqüentemente, quantificar o número das mesmas para infusão. Após esta etapa as células estavam prontas para a realização da marcação com fluorescência. Em 10ml desta solução deveria haver 100 milhões de células (STRAUER et al, 2001).

4.3 Protocolo de Marcação do DNA Celular: Hoechst®

Para a marcação do DNA das células tronco mesenquimais o corante Hoechst® (Sigma-Aldrich) deve ser diluído na seguinte proporção:

- 1µl Hoechst® Sigma;
- 10ml de PBS;
- Incubação em banho-maria (Banho-maria®) por 30 minutos à temperatura de 37°C, agitando de cinco em cinco minutos;

Após incubação as células foram colocadas em uma seringa acoplada em uma torneira de três vias (Tri-way®). Este material permaneceu protegido da luz, pois o corante perde a fluorescência quando em contato com a mesma. A mistura deve também ficar acondicionada em local fresco, de preferência, em contato com gelo até o momento da infusão.

4.4 Vias de Infusão

4.4.1 Transplante Intracoronariano

Com animal em plano anestésico (Propofol[®] utilizado como medicação pré-anestésica e indução e manutenção do plano com Isoforine[®] (Isoflurano Cristália) utilizando-se para isso Shoogun Evolution 2700[®] (Takaoka), realizou-se a dissecação da artéria femural. Pela canulação da mesma (para este procedimento faz-se necessário a utilização de uma fita cardíaca[®] Ethicon – Johnson& Johnson para ancoragem do mesmo), um cateter guia foi levado até a artéria coronária e para a verificação da efetiva localização da mesma. Assim foi injetada uma solução de contraste Tebex[®] - Guerbet, cuja imagem foi observada através de fluoroscopia (Fluoroscópio OEC PLUS 2400[®] - GE Medical System). Após o posicionamento do balão, foram infundidos 10ml da suspensão de células mononucleares, em frações de 2 à 3ml com intervalo de três minutos aproximadamente (STRAUER et al, 2002).

4.4.2 Transplante Transendocárdico

O animal foi anestesiado seguindo o mesmo protocolo anestésico citado acima. Quando em plano anestésico, realizou-se então, a dissecação da artéria femural e conseqüente canulação para posterior cateterização.

Para tal técnica também foi utilizado um cateter para a infusão das células mononucleares, marcadas com Hoechst[®], diretamente na parede cardíaca. Um cateter guia é levado até a câmara cardíaca. Posteriormente um outro cateter (cateter Noga[®] - Biosense) realizou o mapeamento da câmara cardíaca. Eram localizados os pontos nos quais foram realizadas infusões fracionadas de células-tronco mononucleares (TSE et al, 2003 e KAWAMOTO et al, 2003).

4.4.3 Transplante retrógrado por via venosa coronariana

Com animal em plano anestésico realizou-se a cateterização da artéria femoral como descrito anteriormente. Além disso, a veia jugular superficial também sofreu este procedimento para que assim as células mononucleares da medula óssea fossem transplantadas através do seio venoso. Na altura da veia cava cranial e o átrio direito, o cateter guia era então direcionado para o óstio do seio coronário, passando pelo mesmo. Com auxílio do cateter arterial inserido e já posicionado no local, infundiu-se contraste para observar a localização do mesmo, e comparar com o cateter venoso. Após este procedimento, realizou-se então a infusão das CMMO (SUZUKI et al, 2004).

Após a infusão das células-tronco nas diferentes vias, esperou-se uma hora. Passado este período, o animal então foi eutanasiado com Cloreto de Potássio® (Equipex) intravenoso. A partir deste momento diferentes órgãos foram coletados para avaliação através da microscopia de luz, microscopia com epifluorescência e microscopia de transmissão.

4.5 Coleta do Material

Posteriormente foram coletados fragmentos de diversos órgãos como: coração, fígado, baço, diafragma, língua, rins e pulmão para serem processados para histologia, crioscopia e microscopia de transmissão.

Para a microscopia óptica de luz, o material foi fixado em solução de Paraformaldeído. Foi processado em técnica rotineira de inclusão em Paraplast®, desidratado, por passagens em álcoois que variam de 70% ao absoluto, diafanização em xilol (dois banhos) e finalmente a incluído em paraplast. Após este procedimento realizou-se secção do material em um Micrótomo Leica®. Os cortes foram obtidos com espessura de 5µm e corados em Hematoxilina-eosina e Tricromo de Masson (BEHMER, TOLOSA e FREITAS NETO, 1976).

Para a crioscopia os fragmentos foram embebidos em uma solução de Tissue-tek® (Sakura) e colocados em freezer -20°C e depois -40°C. O corte deste material foi realizado em um criostato Leica à -20°C, sendo que as lâminas foram silanizadas previamente para posterior implantação dos cortes.

Para a fixação do material já seccionado, foi utilizada uma solução de acetona PA previamente colocada em freezer. Logo após este procedimento, as lâminas foram imersas nesta solução e colocadas novamente no freezer por cinco minutos. Perdurado este período, retirou-se as lâminas deixando-as escorrer à temperatura ambiente sobre um papel absorvente. Depois de secas as lâminas foram guardadas em uma caixa apropriada e armazenadas no freezer à temperatura de -40C° (JIANG et al, 2002). Utilizou-se para este material a coloração de Azul de Evans. Este consiste em deixar o material imerso em PBS por 10 minutos (dois banhos), seguidos por lavagem em água destilada por cinco minutos, sendo imersas logo após em solução de Azul de Evans por mais cinco minutos. Novamente as lâminas foram banhadas com água destilada por 10 minutos, para retirar o excesso. Foi adicionada na cuba água destilada para montagem do material. Este consiste na colocação de lamínula, que foi previamente limpa com detergente, álcool 70% e secas uma gaze. Estas lâminas foram observadas em microscópio de epifluorescência da marca Leica.

Para a microscopia eletrônica de transmissão, pequenas amostras fixadas em glutaraldeído 2,5%, tampão fosfato 0,1M e pH 7, 4, foram lavadas em tampão fosfato e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% (osmium tetroxide 4% solution in water, Polyscience, Inc. USA) por uma hora e desidratados em concentrações crescentes de etanol (70 a 100%). Na seqüência os fragmentos foram lavados com óxido de propileno (Propylene oxide EM Grade – Polysciences, Inc. USA).

Durante 12 a 16 horas os fragmentos permaneceram sob agitação em uma mistura de 3:1 de etanol e resina Araldite® (Spurr's kit – Electron Microscopy Sciences, Co. USA). Em seguida a mistura foi substituída por 1:3 de resina pura onde o material permaneceu por 5 horas.

Os fragmentos foram colocados em moldes de silicone contendo resina pura. Os moldes contendo os fragmentos permaneceram em estufa 60° C por 72 horas, para que ocorresse a adequada polimerização da resina. Para a identificação e análise da região analisada foram realizados cortes semi-finos e ultra-finos, com cerca de 60 nanômetros, contrastados pelo acetato de uranila 2% em água destilada (5 minutos) e pelo citrato de chumbo 0,5% em água destilada (10 minutos). A observação ultra-estrutural e a documentação fotográfica do material preparado foi analisada em microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1010.

4.6. Quantificação Celular

4. 6.1 Quantificação por Estereologia

Para a realização da quantificação do número de células através de metodologia estereológica, primeiramente foi realizada a medição do material em comprimento. O resultado foi dividido para se obter uma fração do número de cortes.

Estes foram utilizados para a realização da quantificação, na qual foi utilizada uma tabela com números aleatórios para dar início a seqüência de cortes. Este número esteve entre 1 e a fração. Após a confecção das lâminas as imagens dos cortes foram capturadas utilizando um Microscópio Leica DMR[®] acoplado a uma câmera digital DFC 300FX[®] Leica. A cada imagem capturada foi utilizada uma frame que é constituída de quatro quadrantes os quais existem linhas de inclusão e exclusão. Somente quando as células se encontravam dentro deste quadrante, e não tocavam nas linhas de exclusão foram consideradas (GAGLIARDO et al, 2005).

4.6.2 Análise Estatística

Para avaliação dos números de células marcadas segundo as diferentes vias de infusão e as regiões avaliadas, utilizou-se o procedimento PROC MIXED do programa *Statistical Analysis System*, versão 8.0 (SAS, 1995), considerando as mensuração de cada animal como medida repetida. Foram considerados os efeitos principais de via de infusão, as regiões de avaliação, bem como a interação entre os efeitos principais Via *versus* região. Nestas análises adotou-se o seguinte modelo estatístico:

$$y_{ijk} = \mu + V_i + R_j + VR_{ij} + e_{ijk}$$

y_{ijk} = é o número de células marcadas no animal k , na região j e que recebeu a via de infusão i ;

μ = constante inerente a todas observações;

V_i = efeito da i -ésima via de infusão, sendo $i = 1$ (Intracoronariana), 2 (Transendocárdica) e 3(Retrógrada) ;

R_j = efeito da j -ésima região de avaliação, sendo $j = 1$ (Atrial), 2(basal), 3 (medial) e 4 (apical);

VR_{ij} = efeito da interação da Via i com a região j ;

e_{ijk} = efeito aleatório residual associado número de células marcadas no animal k , na região j e que recebeu a via de infusão i .

5. RESULTADOS

5.1 Resultados Referentes à coleta e coloração células mononucleares da medula óssea

Todos os procedimentos de coleta, separação e marcação de células mononucleares já mencionados no material e métodos, foram passíveis e serem realizados. Ressalta-se que após a coloração com marcador de DNA, o material deve ficar refrigerado e acondicionado de forma a ficar protegido da luz até o momento da infusão, uma vez que este corante degrada-se quando atingido pela mesma (Figura 1).

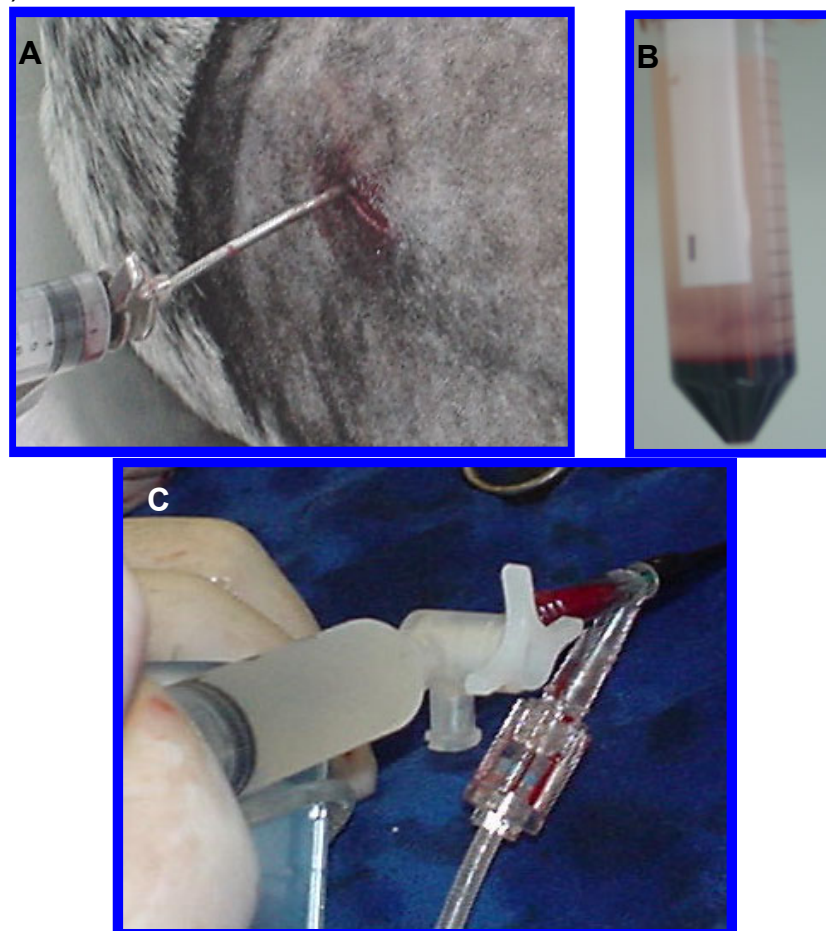


Figura 1 - Fotografias demonstrando a seqüência de procedimentos realizados desde a coleta de medula óssea através da punção da crista ilíaca (A), separação das células mononucleares através de gradiente de densidade (B) e finalmente a infusão (C).

5.2. Resultados referentes aos procedimentos de infusão células mononucleares da medula óssea pela via Intracoronariana ou Anterógrada à confecção de lâminas.

Foi realizada cateterização da artéria femoral, para isso, foi utilizado processos de divulsão e ancoragem do vaso com um cateter “J” e fita cardíaca. Inseriu-se um cateter guia o qual chegou ao arco aórtico que pode ser observado dorsalmente às valvas semilunares. Introduziu-se o cateter balão através da artéria circunflexa esquerda até atingir a artéria marginal ventricular esquerda, que se encontra no sulco longitudinal. Constatada presença do cateter na mesma, com a infusão de contraste, realizou-se com sucesso a infusão de CMMO de modo fracionado, três injeções com intervalos de três minutos, infundindo um total de 10mL de solução contendo 1×10^8 células (Figura 2). Após coleta de material e análise com auxílio de microscopia de epifluorescência pôde-se observar a presença de células coradas com marcador fluorescente em todo tecido cardíaco, desde átrio ao ápice do cardíaco (Figuras 3,5 e 7), bem como nos pulmões e fígado (Figura 9).

Através das colorações de hematoxilina e eosina (HE) e Tricrômio de Masson pudemos observar células mononucleares no tecido conjuntivo presente entre as fibras musculares cardíacas, na região átrio-ventricular direita, esquerda e septo cardíaco. Isto também pode ser observado em regiões próximas a vasos (Figuras 4, 6 e 8). Uma menor quantidade de células foram observadas no epicárdio e endocárdio, sugerindo portanto, um padrão intersticial de distribuição celular.

Não foram observadas alterações patológicas tais como morte celular (áreas com células apresentando núcleo picnótico ou degeneração nuclear ou qualquer aumento do número de neutrófilos, que indicaria rejeição das células transplantadas)

em tecido cardíaco através de análise ao microscópio. Manteve-se o padrão de distribuição de tecido conjuntivo e cardiomiócitos.

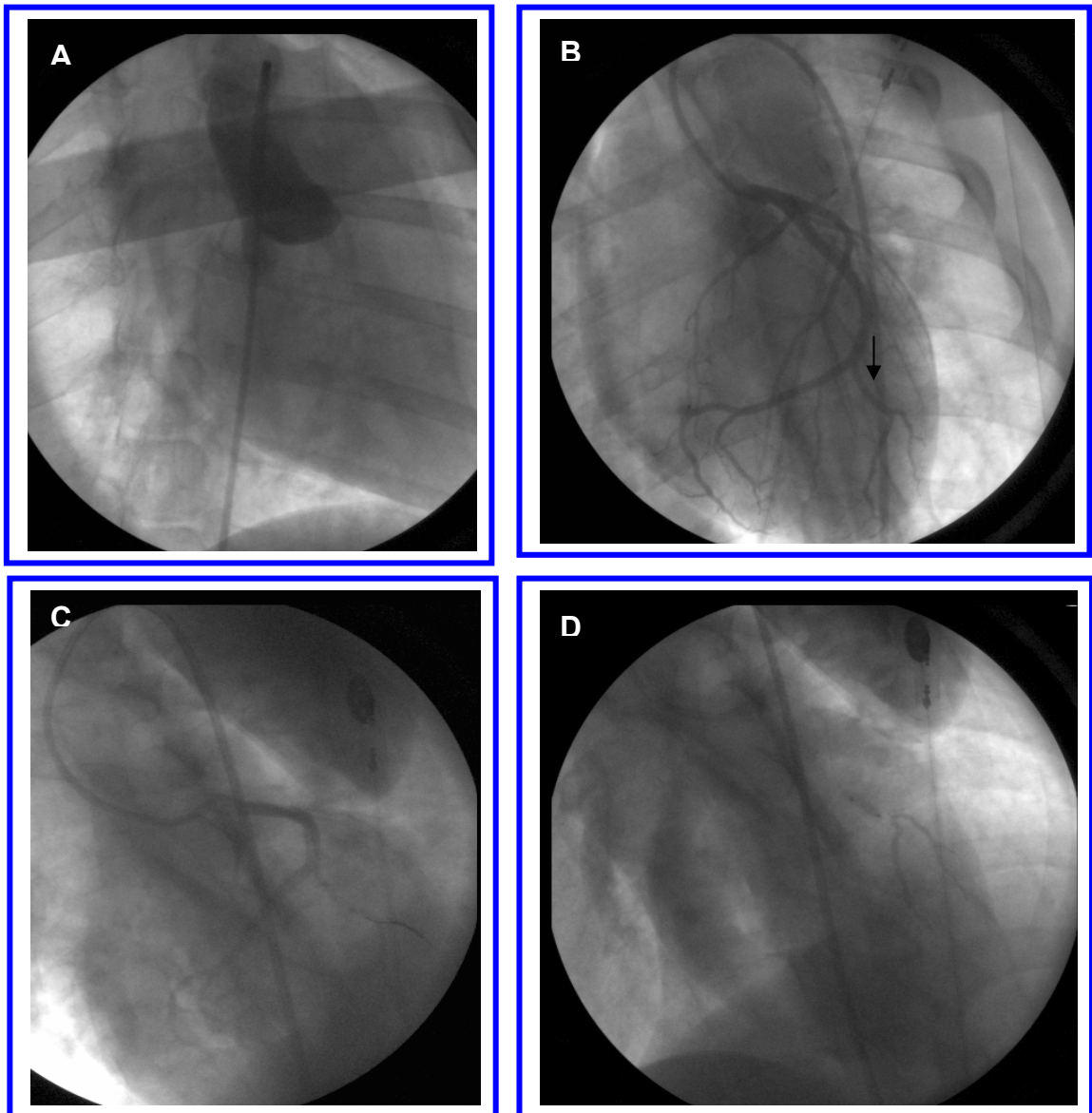


Figura 2 - **(A)** Cateter injetando contraste na região do seio aórtico, observe o refluxo de contraste no arco aórtico; **(B)** artéria circunflexa esquerda com o sub-ramo marginal ventricular esquerda (seta); **(C)** Cateter guia e cateter balão na artéria marginal ventricular esquerda e **(D)** Cateter balão insuflado e injeção de contraste.

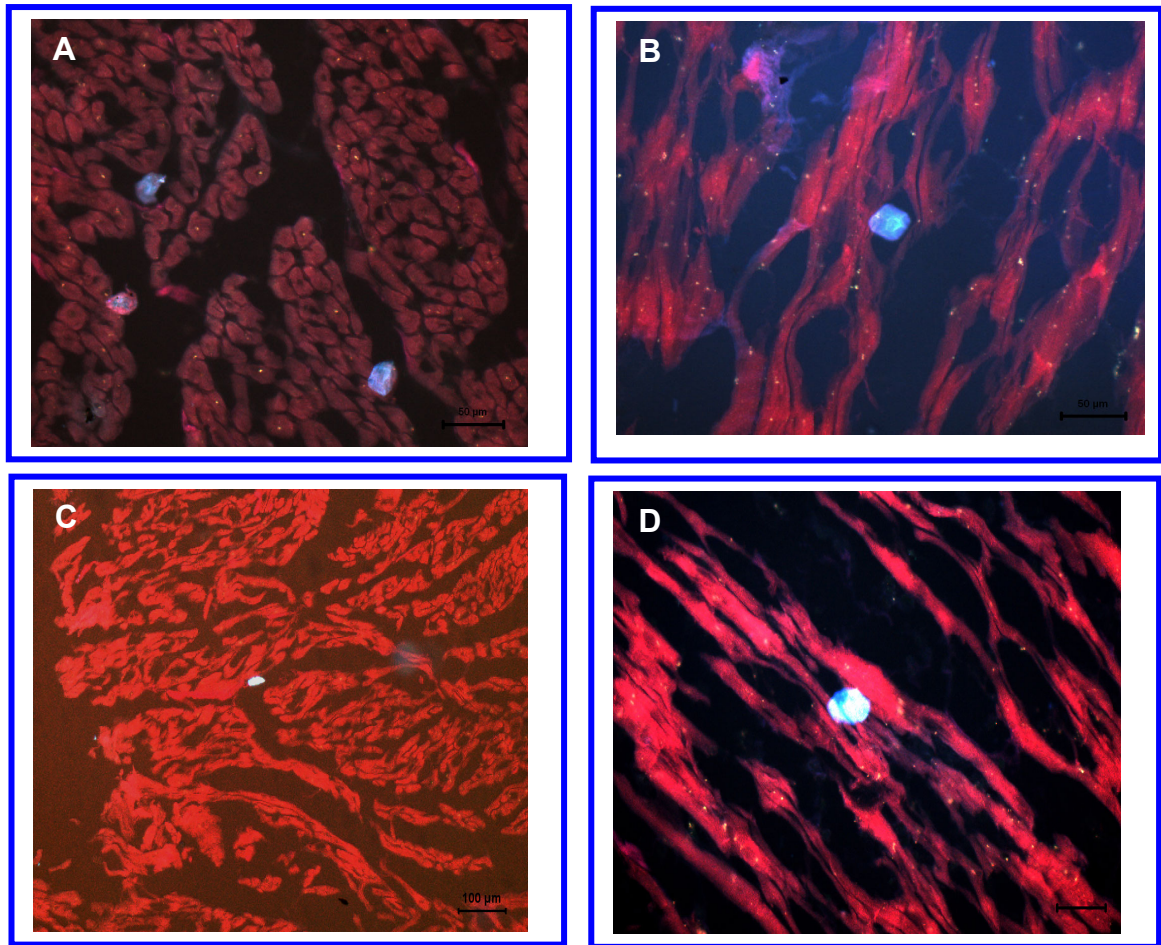


Figura 3 - Fotomicrografias demonstrando a presença de células mononucleares (seta) em: (A) átrio esquerdo - 50 μ m, (B) transição átrio/ventrículo esquerdo - 50 μ m, (C) abaixo da bifurcação da artéria marginal do ventrículo esquerdo - 100 μ m, (D) ápice do coração - 50 μ m. Coloração: Evans Blue.

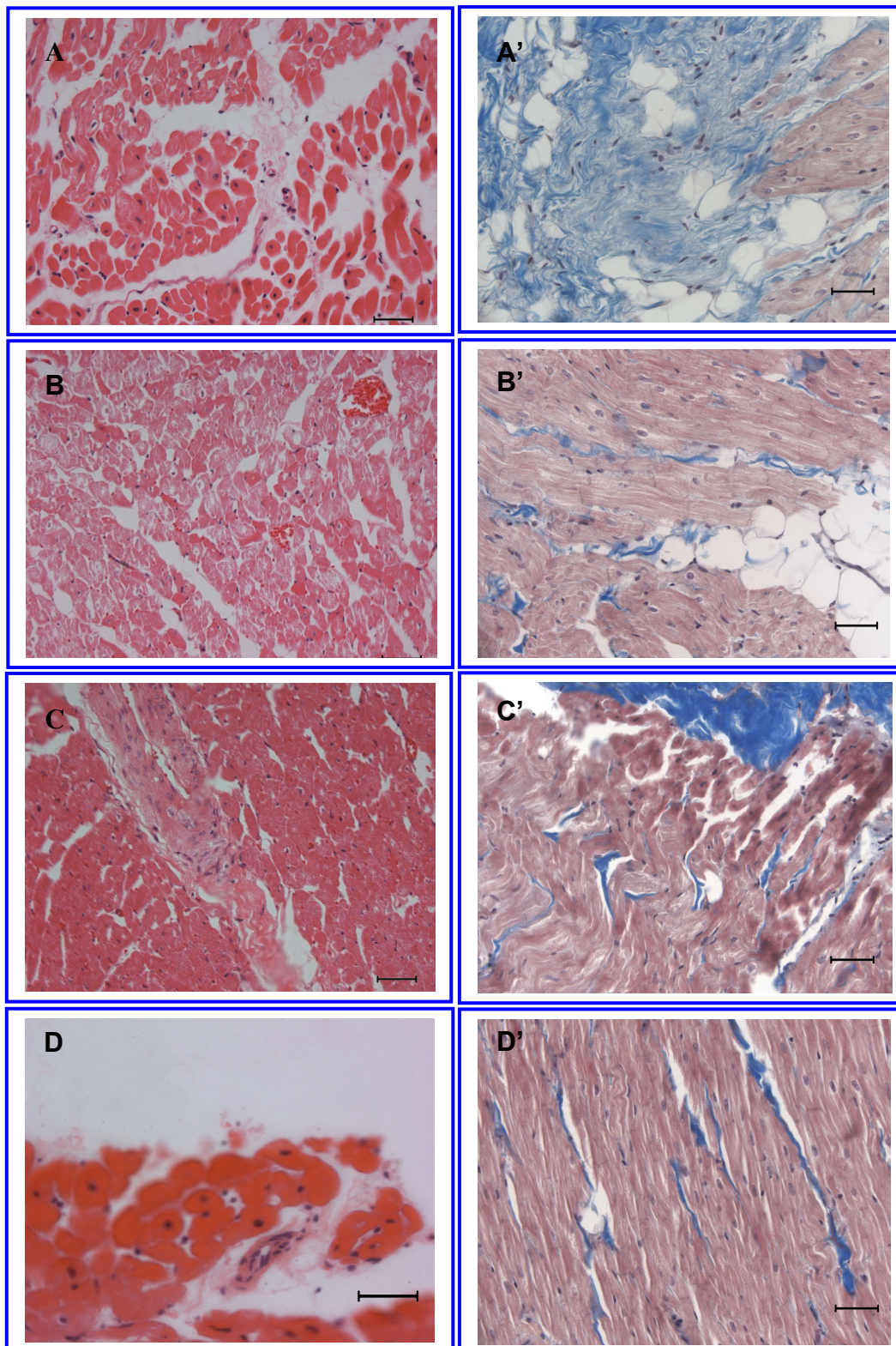


Figura 4 - Fotomicrografia da região átrio-ventricular esquerda. As figuras A e A' correspondem a região atrial, B e B' transição átrio/ventrículo, C e C' abaixo do ramo marginal ventricular e D e D' região apical. Colorações: HE (A-D) e Tricromo de Masson (A' - D'); Barras: 40 μ m (A-C).

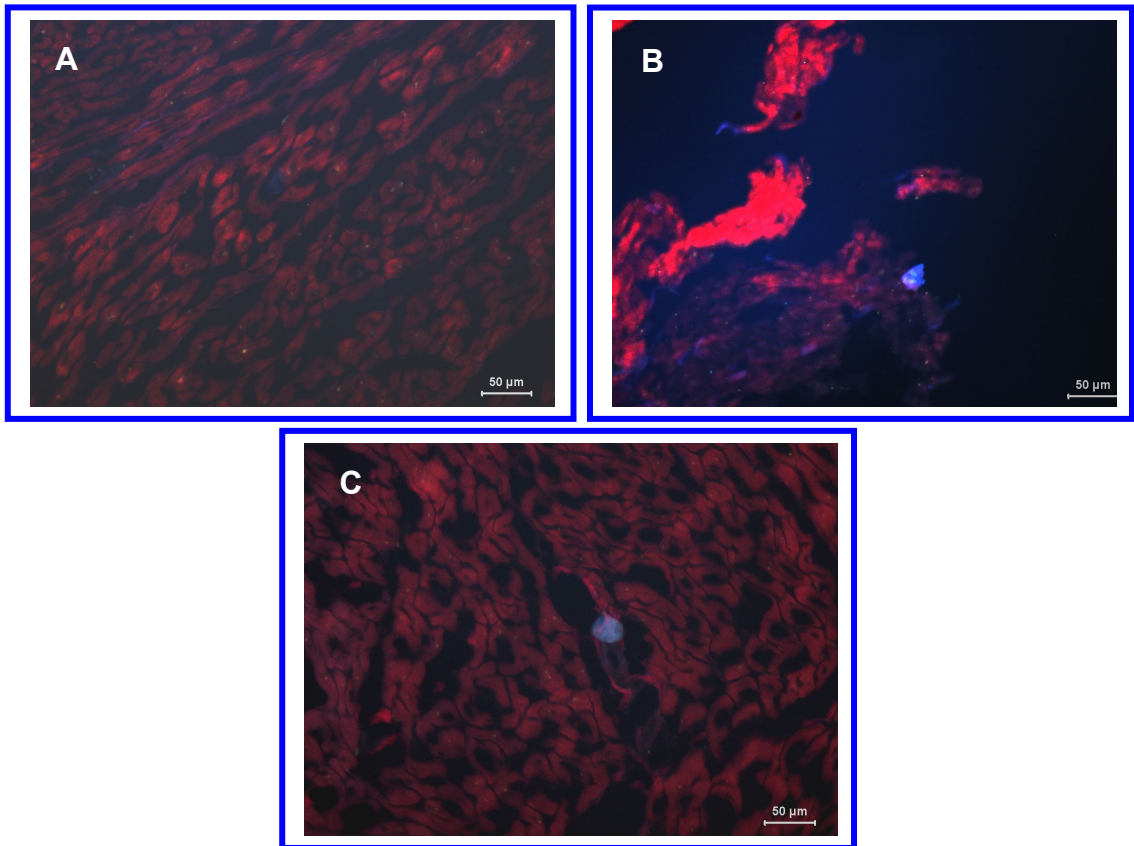


Figura 5 - Fotomicrografia de septo. Septo cardíaco em região proximal (A), média (B) e distal (C). Coloração: Evans Blue; Bssras: 50μm.

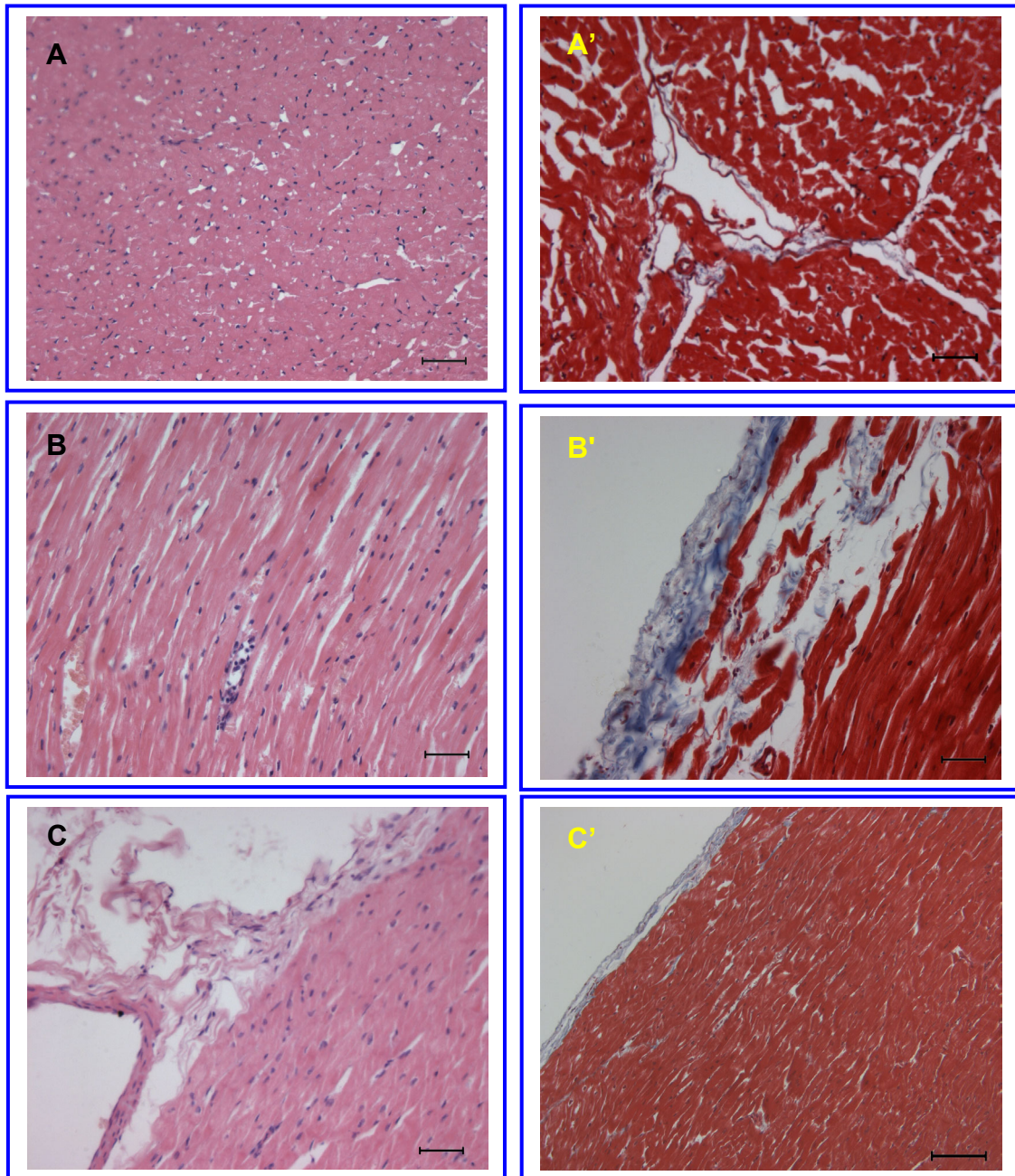


Figura 6- Fotomicrografias da região septal, correspondendo A/A' à região -proximal, B/B' região média e C/C' a região distal. Observar a presença de células mononucleares em região muscular intersticial é maior em relação à quantidade em tecido conjuntivo. Colorações: HE – (A/C) e Tricromo de Masson (A'-C'); Barras: 40 μ m (A, B, B', C e C') e 100 μ m (A' e C').

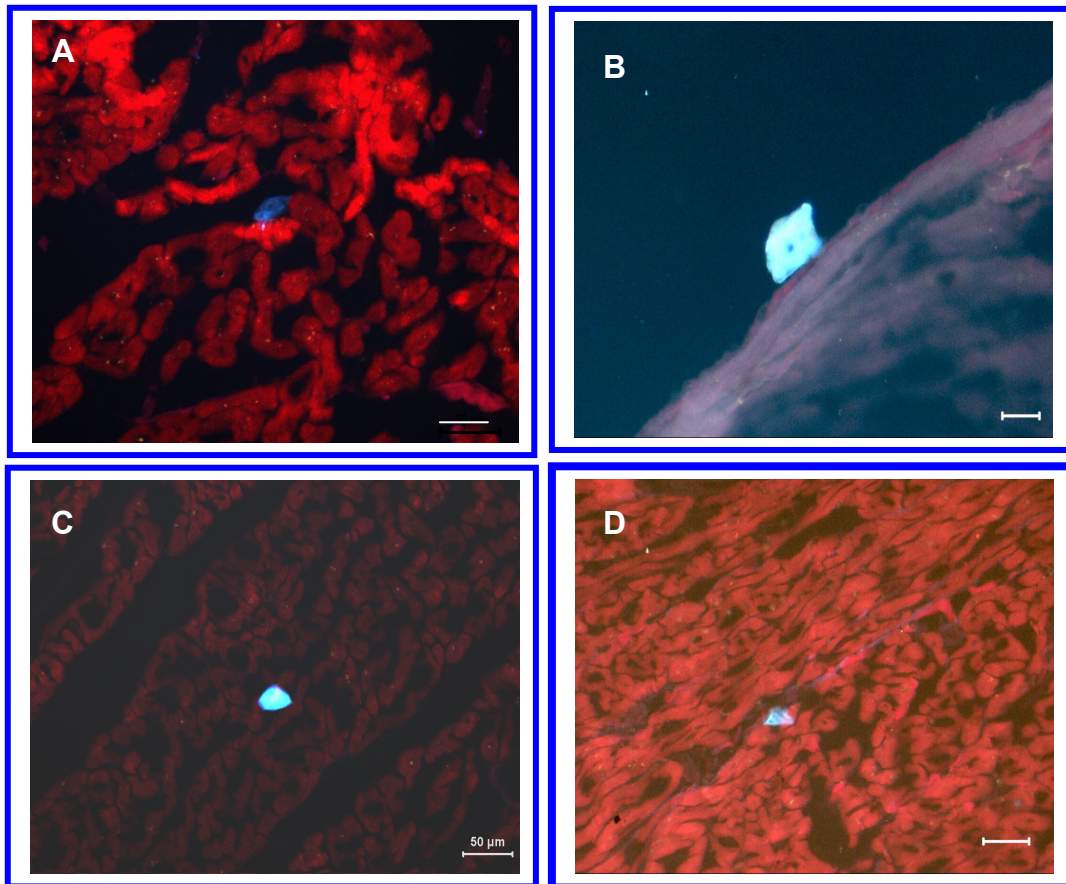


Figura 7- Fotomicrografia de átrio e ventrículo direito. Em (A) região de átrio direito; (B) transição átrio/ventrículo direito; (C) região ventral à bifurcação da artéria marginal ventricular e (D) ápice ventricular direito. Coloração: Azul de Evans; Barras:50 μ m (A, C e D) e 20 μ m (B).

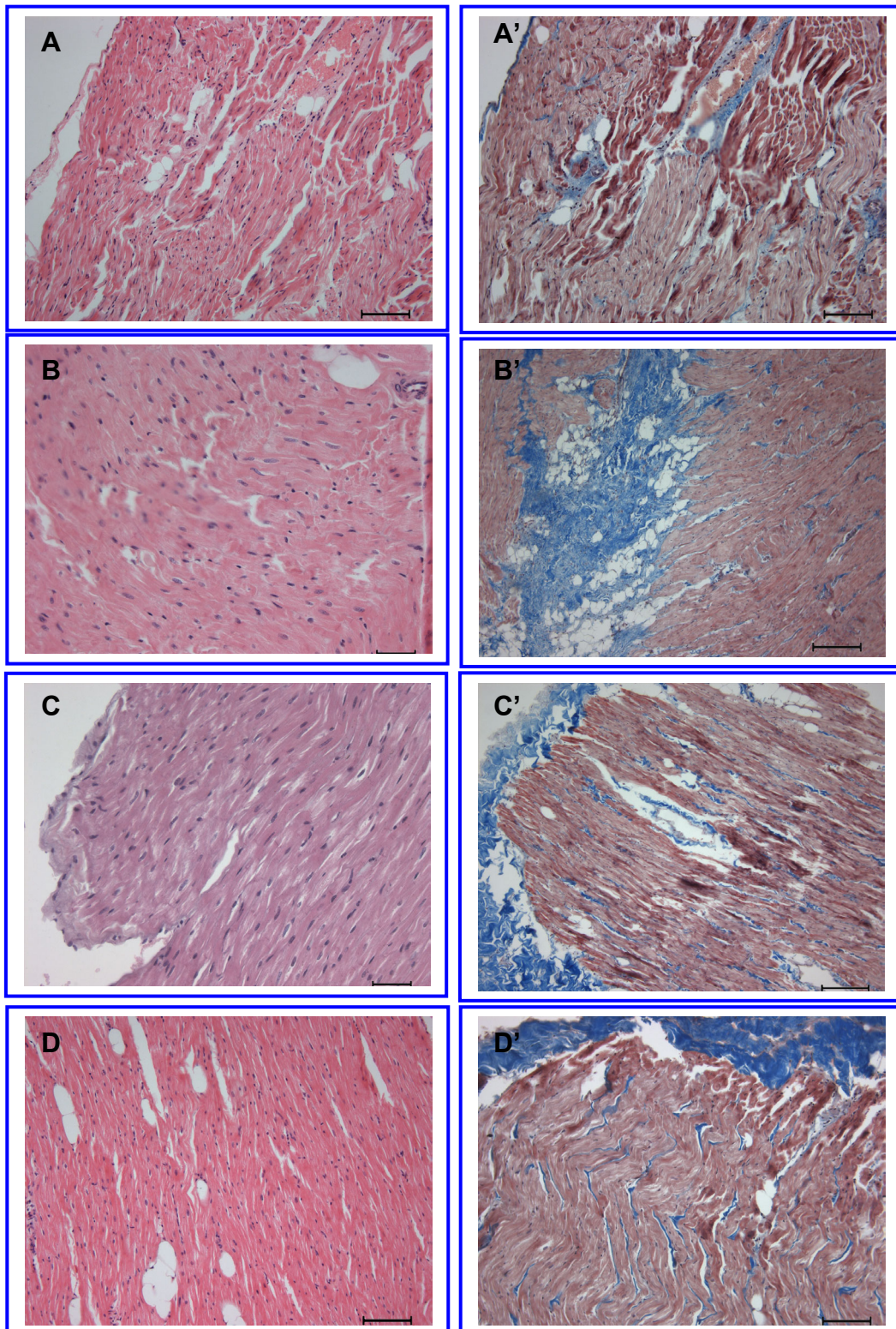


Figura 8- Fotomicrografias da região átrio-ventricular direita. Observar a normalidade do tecido cardíaco. Colorações: A à D - HE e A' à D' - Tricromo de Masson. Barras 100 μ m (A, A', B'e D) 40m (B, C, C' e D').

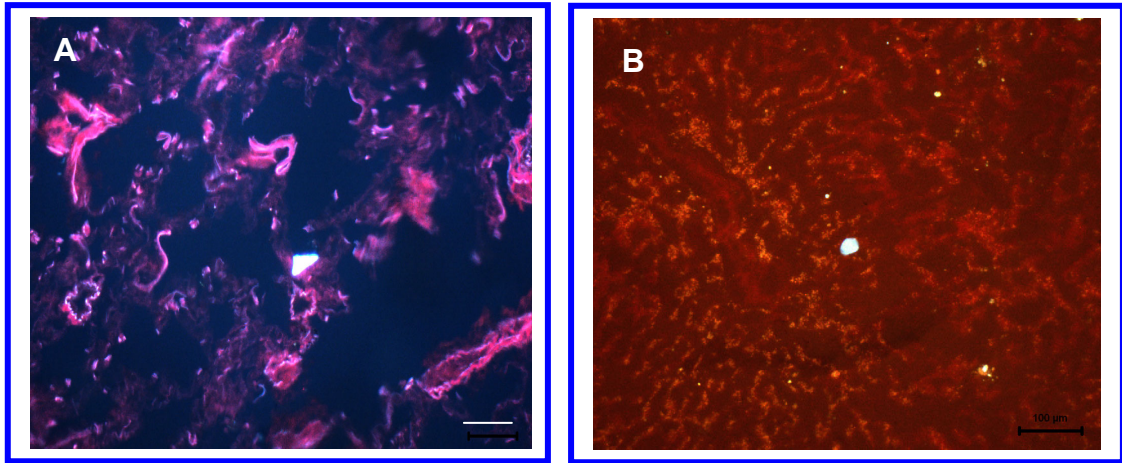


Figura 9- Presença de células mononucleares em tecido pulmonar (A) pulmão e hepático (B). Coloração: Evans Blue. Bsras: 100 μ m

5.3. Resultados referentes à infusão de células mononucleares da medula óssea pela via transendocárdica.

Após cateterização da artéria femoral, um cateter Noga foi inserido no coração, mais precisamente no ventrículo esquerdo com o auxílio do Fluoroscópio (Figura 10). Neste foi realizado o mapeamento da câmara cardíaca (Figura 11) para posterior infusão de CMMO. Foram injetadas 1×10^8 células em três mL de PBS em um total de 18 infusões em média. Este procedimento foi realizado com sucesso, embora o tempo gasto durante a cirurgia fosse maior, sendo necessário também à presença de mais de um cirurgião para a realização desta manobra.

No mapeamento cardíaco, pequenos pontos brancos mostraram-se relacionados aos pontos de intersecção dos planos. A figura que se encontrava na parte superior projeta a câmara cardíaca de formato tridimensional, e a que se encontra na parte inferior retratavam a mesma câmara cardíaca, em uma visão bidimensional. Além do mapeamento cardíaco, o Noga também nos permitiu fazer o Mapeamento Cardíaco de Voltagem Máxima, auxiliando-nos no momento da infusão, pois com o resultados dos mesmos, pode-se contornar intercorrências durante a infusão.

Durante a infusão, ou seja, quando a agulha do cateter penetra na musculatura cardíaca, pôde ser observado que houve alterações na condutância do impulso cardíaco (Figura 11), contudo após o momento da infusão o traçado voltou ao normal (Figura 11).

As células infundidas por esta via encontravam-se localizadas principalmente no local da infusão e septo cardíaco (Figuras 12, 13, 14 e 15). Ocasionalmente encontravam-se na parede lateral do ventrículo direito (Figuras 16 e 17).

O padrão de distribuição das células em tecido cardíaco estava relacionado principalmente à distribuição do tecido conjuntivo, ou seja, ao contrário dos resultados encontrados para a via intracoronariana. Por esta via, as células eram contadas em maior número, em locais nos quais havia maior concentração de tecido conjuntivo, especialmente na região de epicárdio. Nichos de células mononucleares também foram observados (Figura 13C). Eventualmente algumas células podem ser encontradas em fígado (Figura 18).

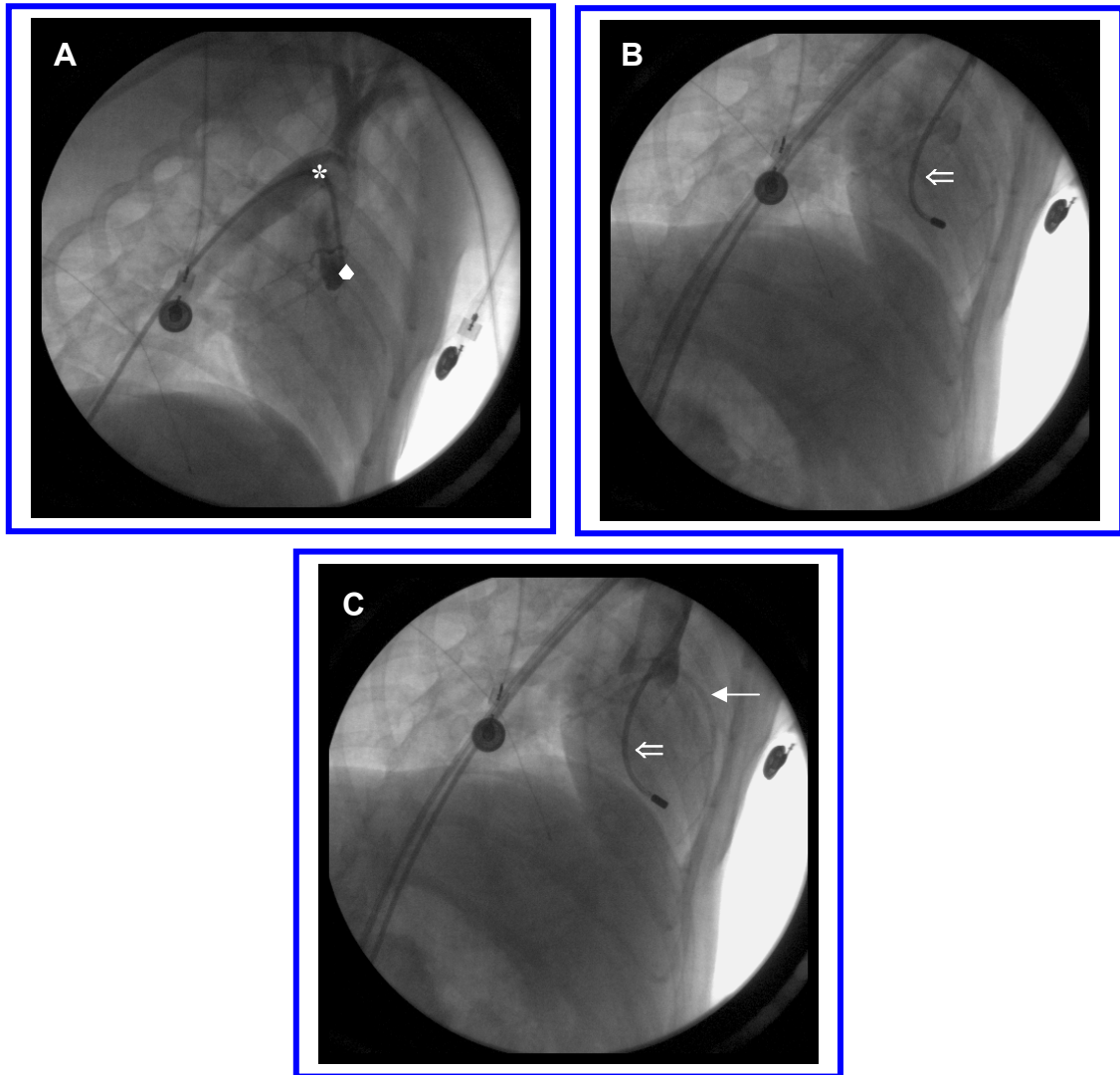


Figura 10- (A) Fluoroscopia demonstrando arco aórtico (*) e região de seio coronário ingurgitados com contraste (◆); (B) presença do cateter Noga (seta dupla) no ventrículo esquerdo; (C) cateter Noga (seta dupla) no ventrículo esquerdo e infusão de contraste em seio coronariano (seta simples).

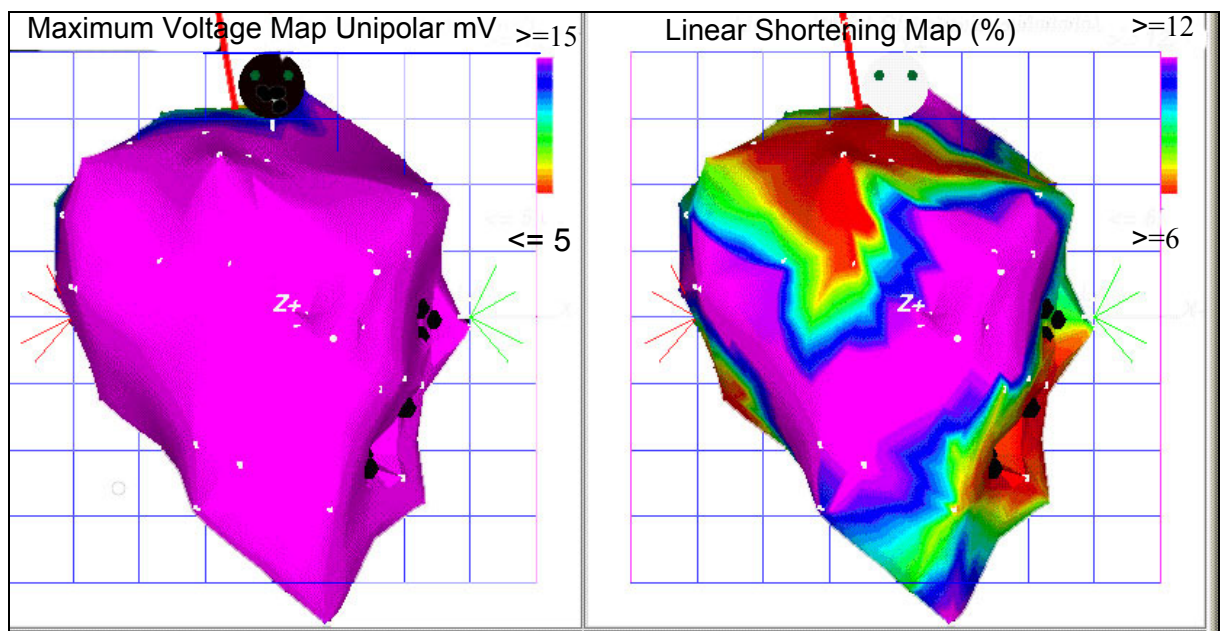


Figura 11- Mapeamento cardíaco (NOGA). Os pontos pretos referem-se aos locais de infusão de células. Na figura a esquerda observe a máxima voltagem do tecido cardíaco praticamente como um todo, com exceção à base do coração. Já na figura à direita, a condutância do impulso cardíaco tornou-se normal, despolarização atrial, seguindo para região das fibras de Purkinje.

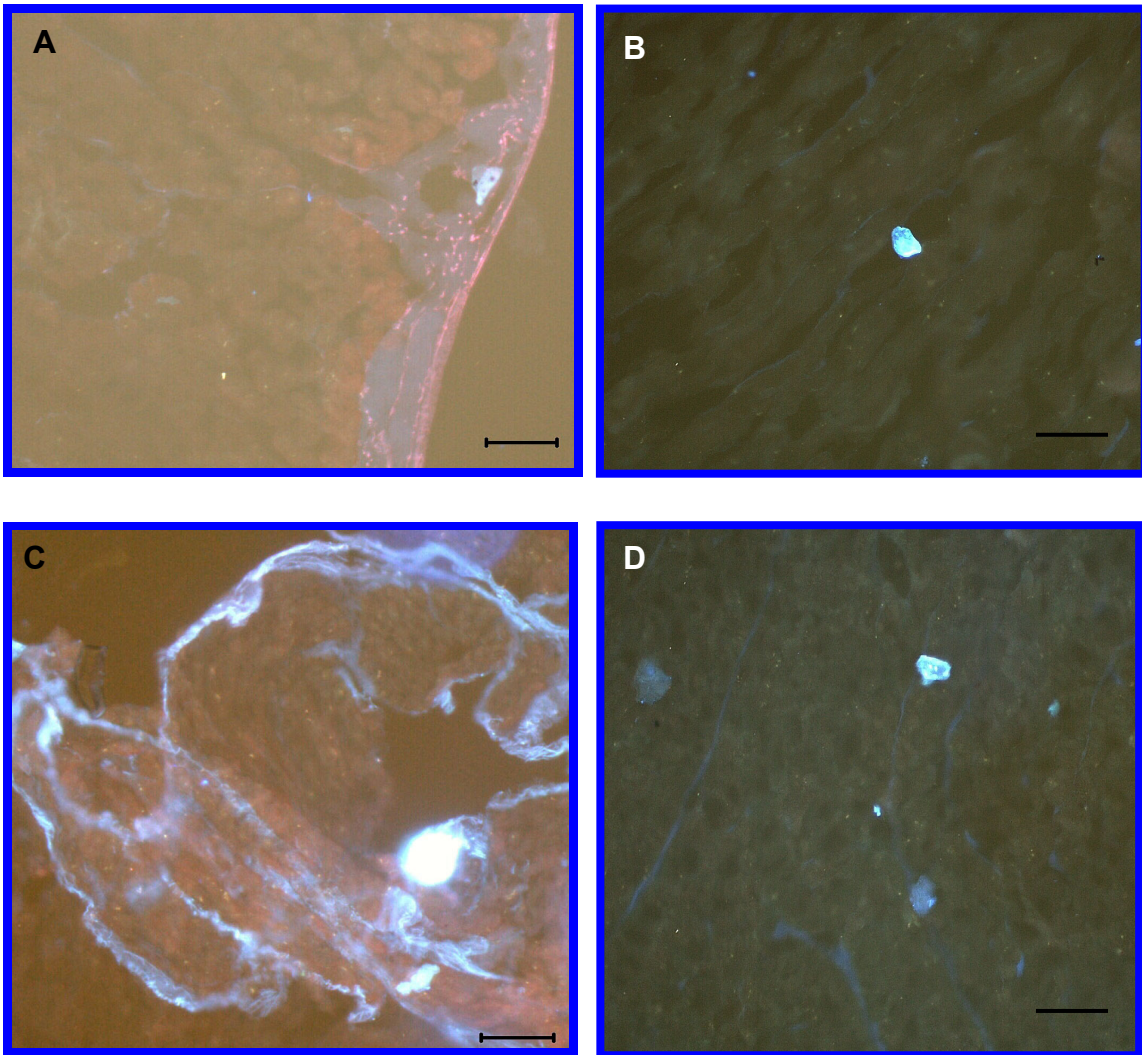


Figura 12- Fotomicrografias de átrio e ventrículo esquerdo no qual pode-se observar a presença de células em todas as porções, sendo elas: (A) átrio esquerdo, (B) transição átrio/ventrículo esquerdo, (C) abaixo da bifurcação da artéria marginal do ventrículo esquerdo, (D) ápice do coração. Coloração: Evans Blue. Barras: A, B e D (50 μ m) e C (20 μ m).

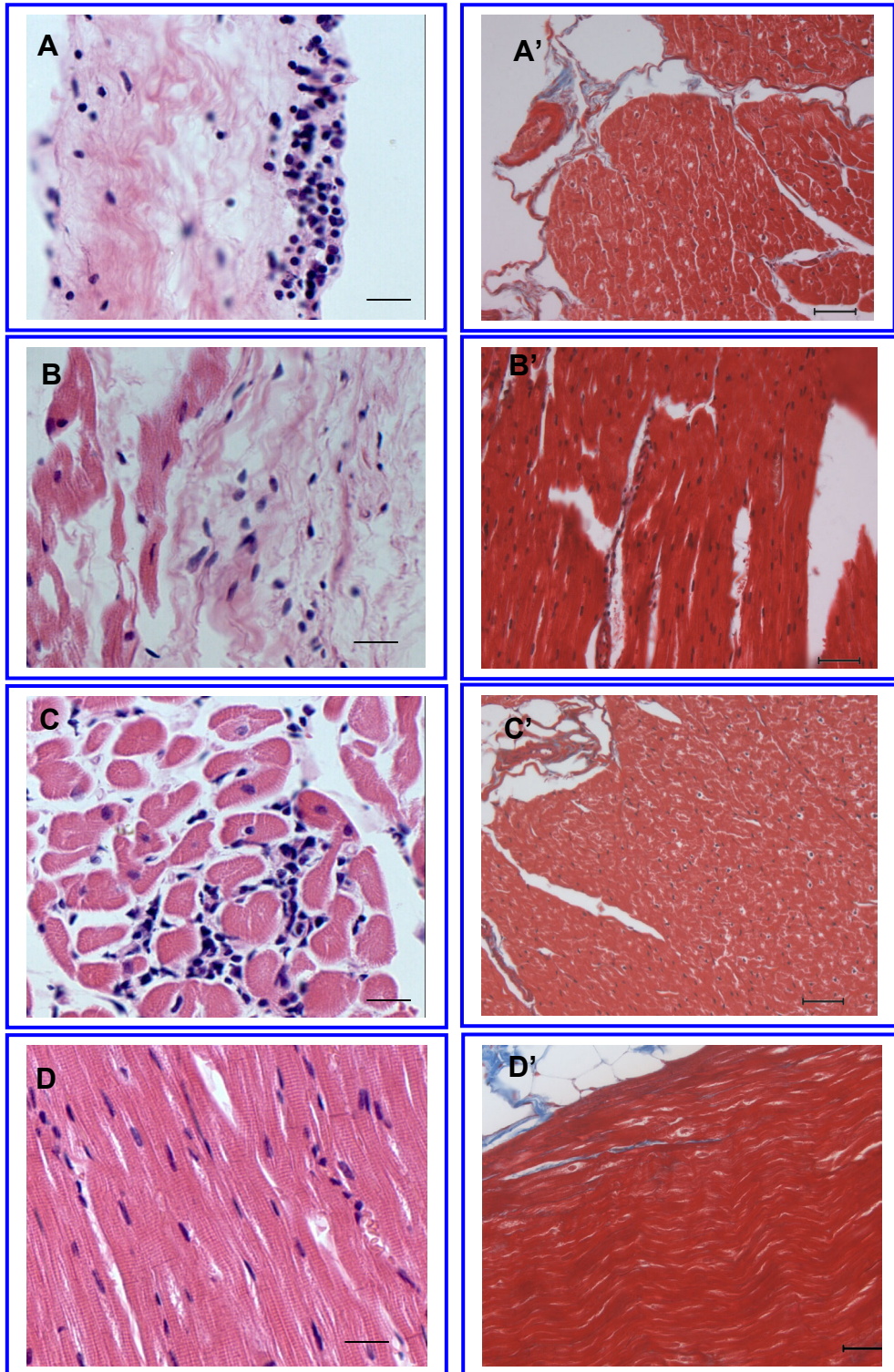


Figura 13- Fotomicrografias da região átrio-ventricular esquerda, sendo A/A' região atrial, B/B' transição átrio-ventricular, C/C'abaixo da região de artéria marginal ventricular e D/D' ápice cardíaco. Colorações: HE (A-D) e Tricromo de Masson (A' – D'). Barras: 20 μ m (D), 40 μ m (A,B,C e D') e 80 μ m (A', B' e C').

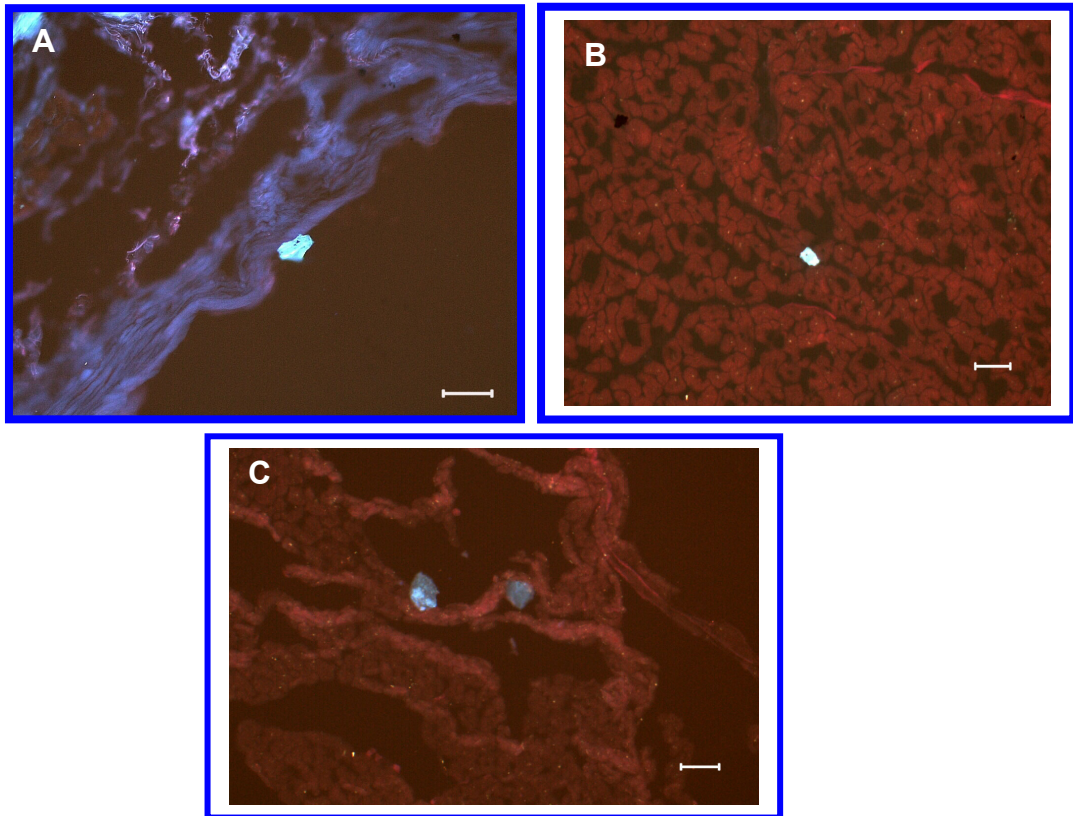


Figura 14- Fotomicrografias da região de septo cardíaco em porções proximal (A), média (B) e distal (C). Sendo que em todas as porções foram observadas presenças de células mononucleares. Coloração Azul de Evans. Barras: 20 μ m (A) e 50 μ m (B e C).

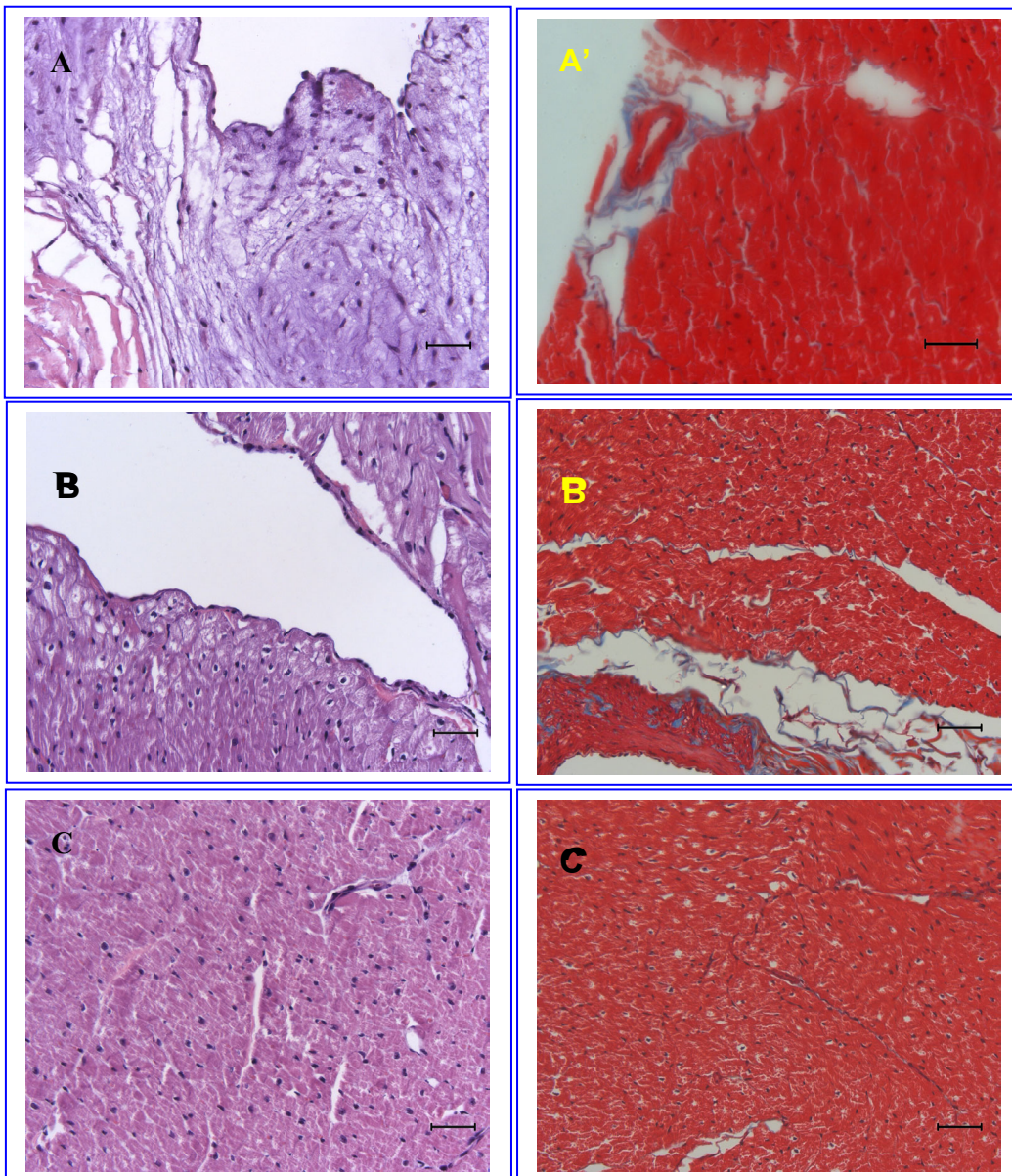


Figura 15- Fotomicrografias da região septo cardíaco. Sendo A/A' região proximal, B/B' média e C/C' distal. Colorações: HE (A- C) e Tricromo de Masson (B' – D'). Barras: A-C e B' – D' (40 μ m) e A' (80 μ m).

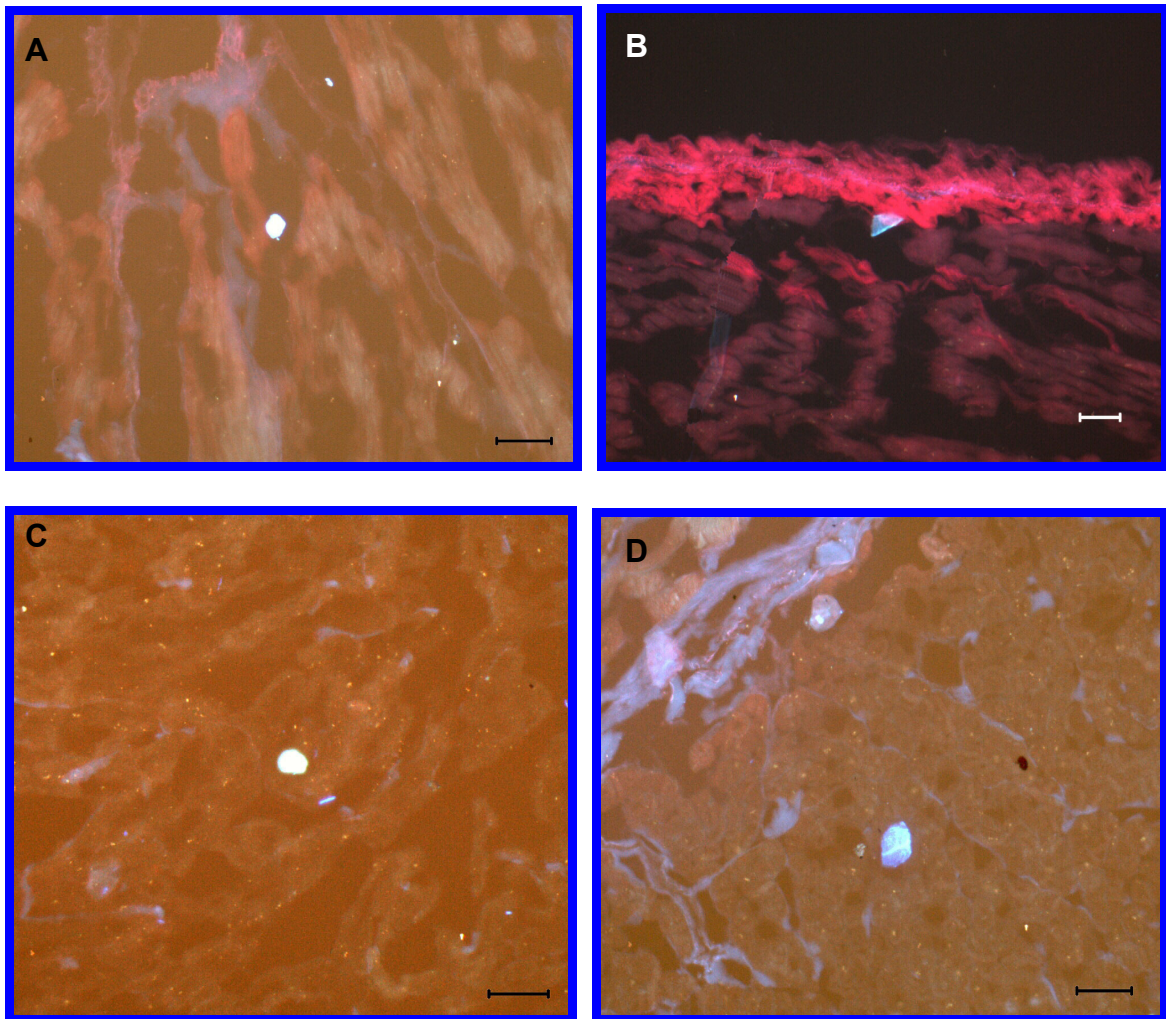


Figura 16- Fotomicrografia de átrio e ventrículo direito. Em (A) região de átrio direito; (B) transição átrio/ventrículo direito; (C) região ventral à bifurcação da artéria marginal ventricular e (D) ápice ventricular direito. Coloração: Azul de Evans. Barras: 100µm (A) e 40µm (B, Ce D).

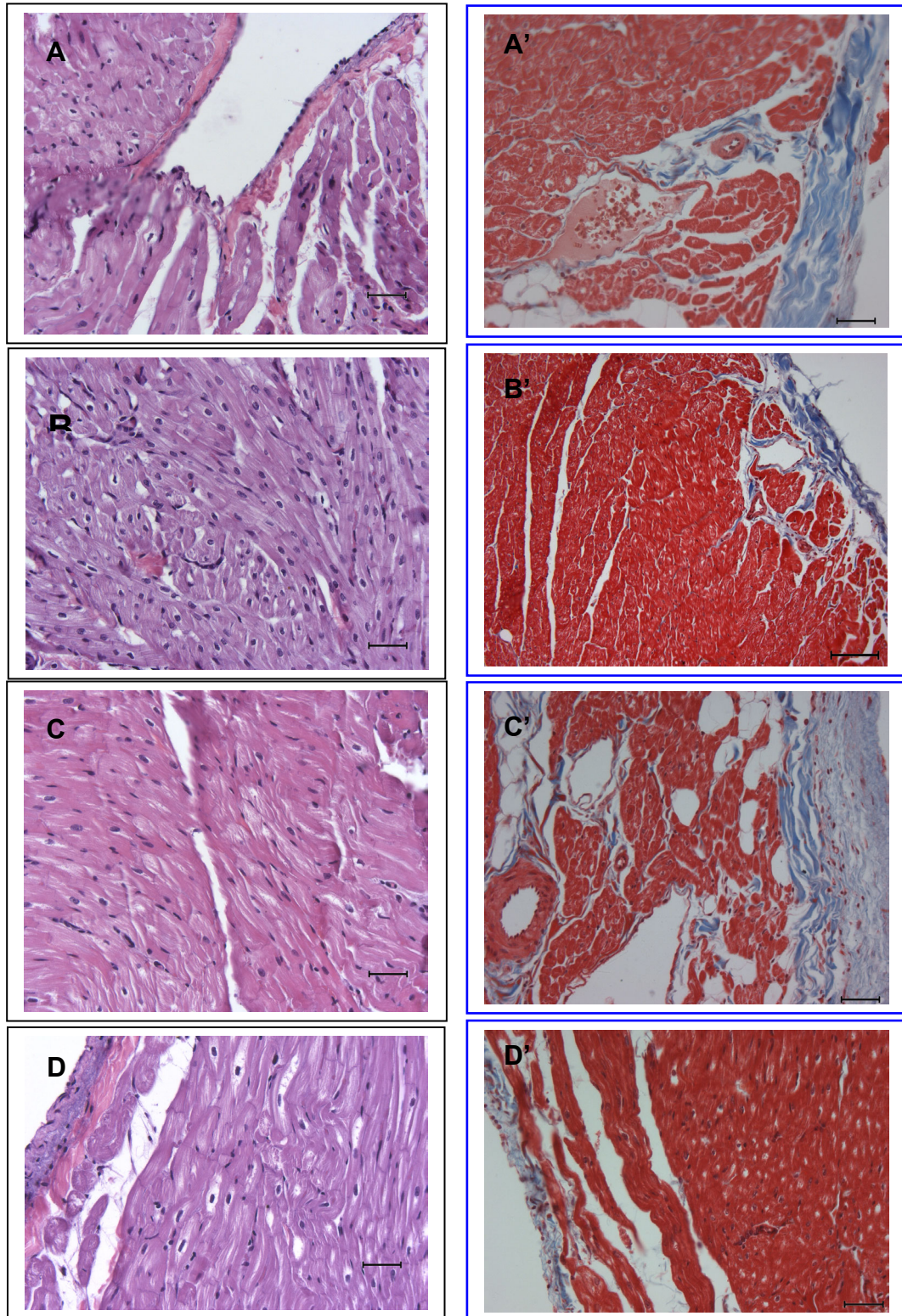


Figura 17-. Fotomicrografias da região átrio-ventricular direita. Os segmentos A/A' referem-se a região atrial, B/B' transição átrio-ventricular, C/C' região abaixo da artéria marginal ventricular e D/D' ápice. Observar a grande quantidade de células entremeadas ao tecido conjuntivo. Barras 40 μ m. Colorações (A -D) HE e (A' - D') Tricromo de Masson.

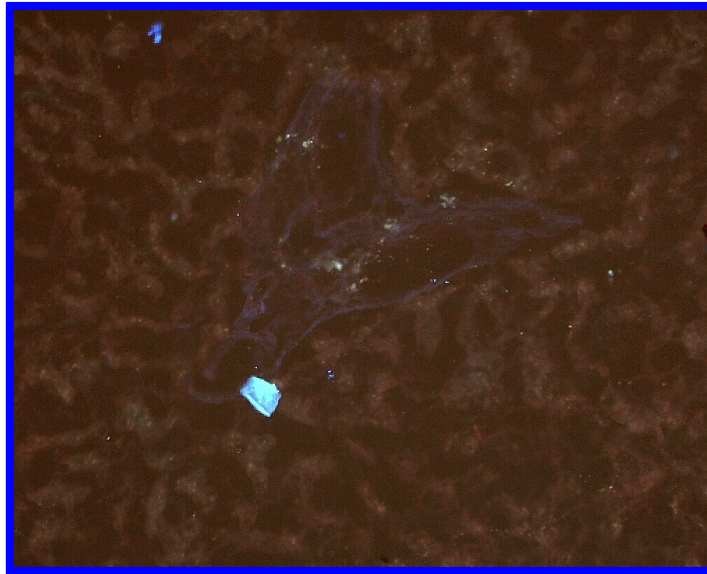


Figura 18- Fotomicrografia no qual uma célula mononuclear encontra-se em região periportal. Coloração: Azul de Evans. Aumento de 40 μ m.

5.4. Resultados referentes à infusão de células mononucleares da medula óssea pela via retrógrada venosa coronariana.

Para a realização da infusão por esta via foi necessário realizar tanto a cateterização pela artéria femoral quanto pela veia jugular. Esta última escolha ocorreu em virtude da forma pela qual a veia realizava sua trajetória (Figuras 19 e 20).

Foi possível realizar este procedimento e a infusão de células. Contudo, ressaltou-se a necessidade de haver duas canulações, uma em artéria e outra em veia, para garantir o sucesso da infusão, garantindo desta forma, a entrega de células no local afetado. Do material coletado para verificação da presença de células mononucleares, elas foram encontradas em todas as amostras tecido cardíaco (Figuras 31, 23 e 25).

O padrão de distribuição de CMMO por esta via, também estava relacionada à distribuição de tecido conjuntivo, como observado na via transendocárdica. Contudo, além de haver grande quantidade de células em epicárdio, há uma marcada quantidade da mesma, no interstício de células musculares cardíacas (Figuras 22, 24 e 26). A profundidade de distribuição destas células atingiu ocasionalmente o endocárdio. Algumas células foram também encontradas em baço, pulmões e língua (Figura 27).

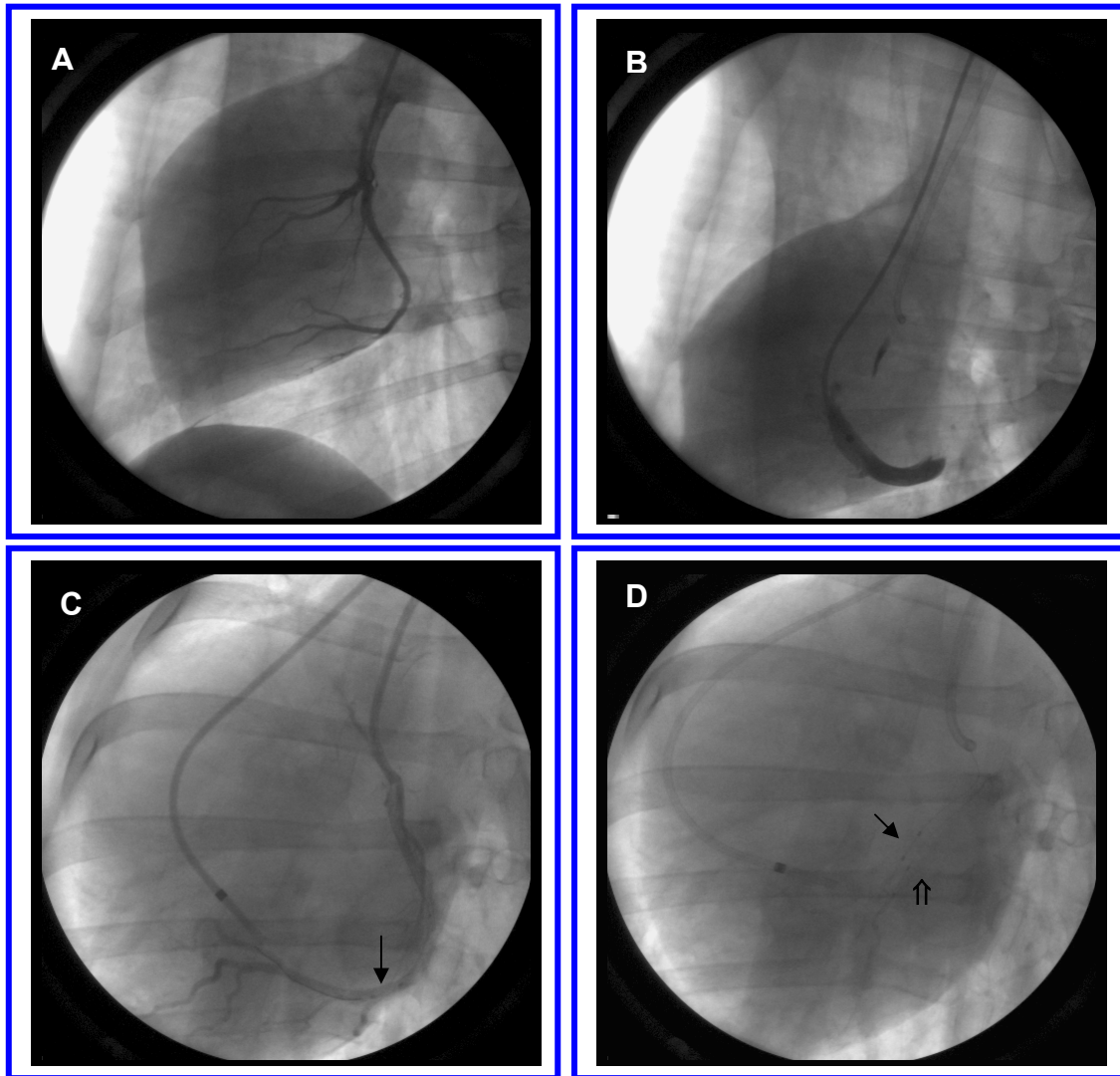


Figura 19- (A) localização do arco aórtico e do óstio do seio coronário, observar pela infusão de contraste; (B) catéter em veia cava cranial; (C) observe o catéter na artéria preenchida com contraste (seta simples); (D) presença do catéter em artéria e veia (seta dupla).

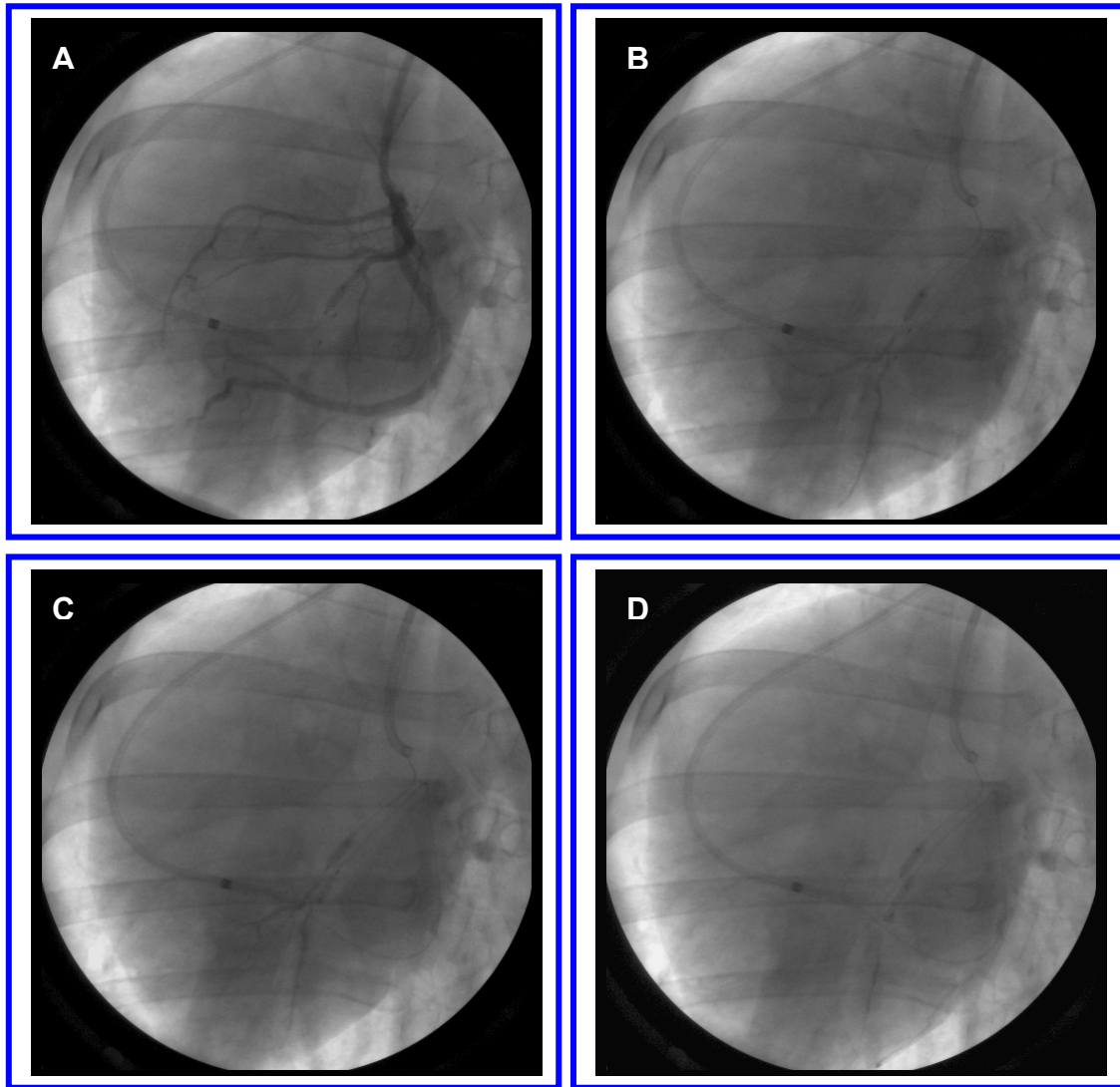


Figura 20-. (A) infusão de contraste em artéria; (B) catéter balão arterial insuflado com injeção de contraste; (C) cateter balão arterial e catéter venoso com infusão de contraste; (D) catéter arterial e venoso insuflados com infusão de células mesenquimais em veia.

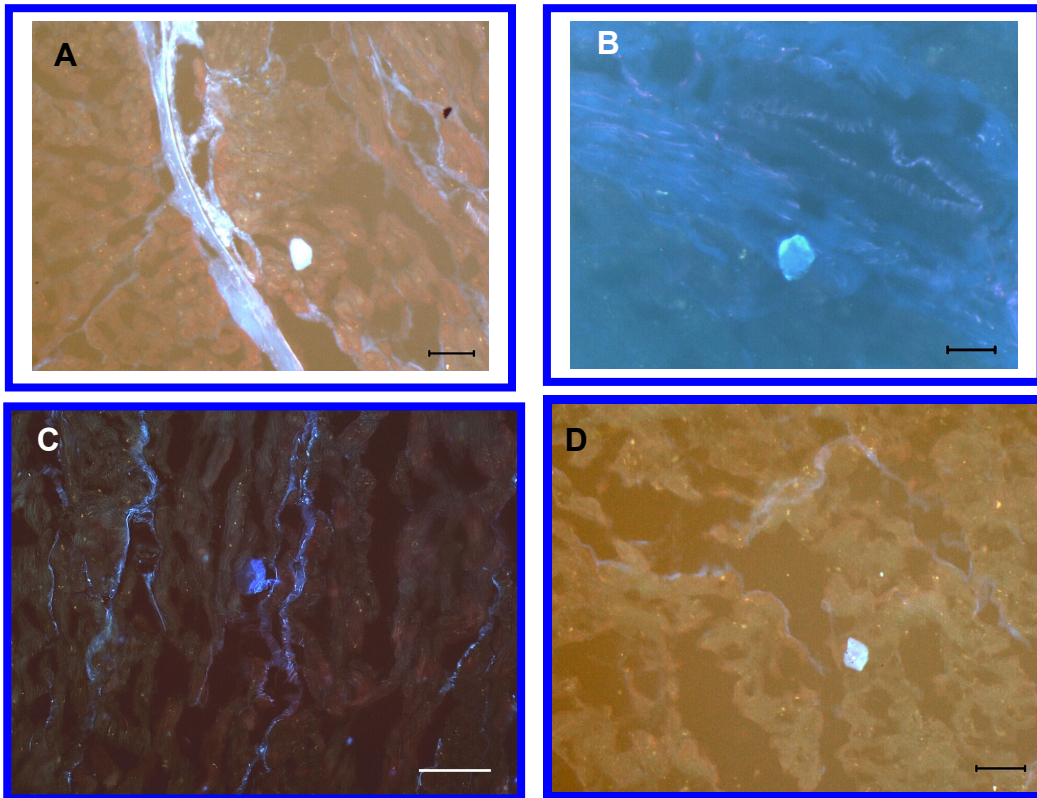


Figura 21- Fotomicrografias de átrio e ventrículo esquerdo no qual pode-se observar a presença de células em todas as porções, sendo elas: (A) átrio esquerdo, (B) transição átrio/ventrículo esquerdo, (C) abaixo da bifurcação da artéria marginal do ventrículo esquerdo, (D) ápice do coração. Coloração: Evans Blue. Barras: 20 μ m (A, C e D) e 40 μ m (B).

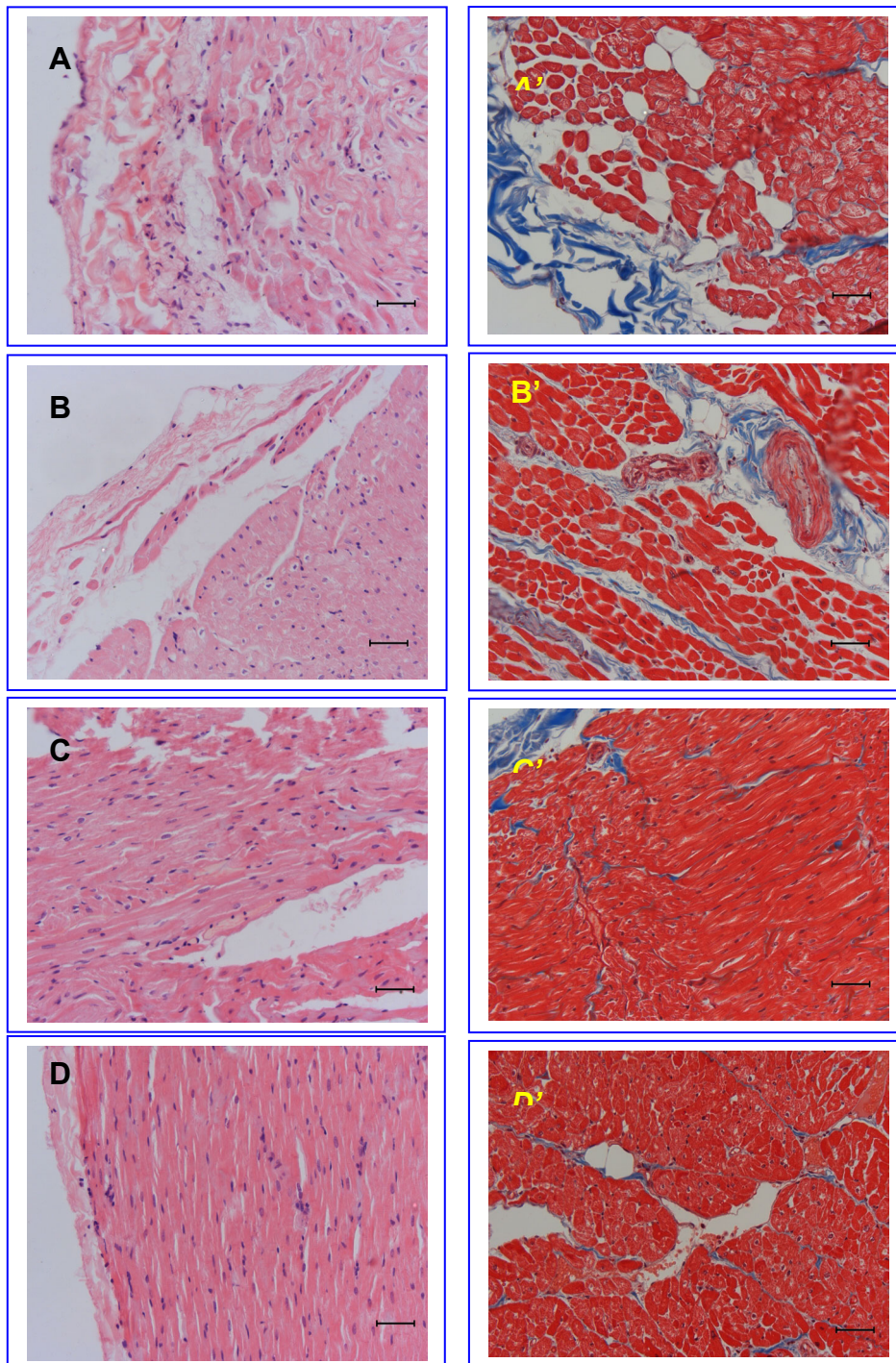


Figura 22- Fotomicrografia de luz no qual podemos observar a presença de células mononucleares em todo tecido cardíaco em (A e A') região atrial, (B e B') região átrio-ventricular, (C e C') região média e (D e D') região apical. Colorações: HE e Tricromo de Masson. Barra 40 μ m.

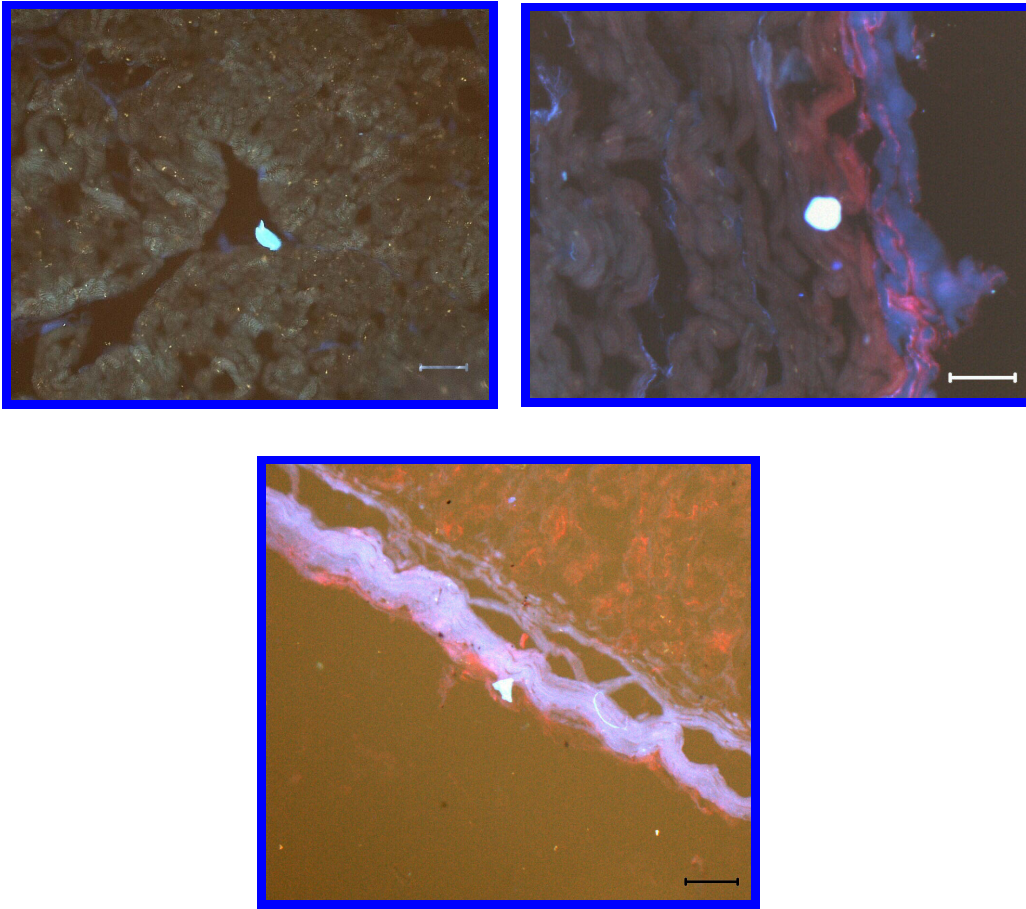


Figura 23- Fotomicrografias da região de septo cardíaco em porções proximal (A), média (B) e distal (C). Sendo que em todas as porções foram observadas a presença de células mononucleares. Coloração Azul de Evans exceto em A. Barras: 20 μ m (A e C) e 40 μ m (B).

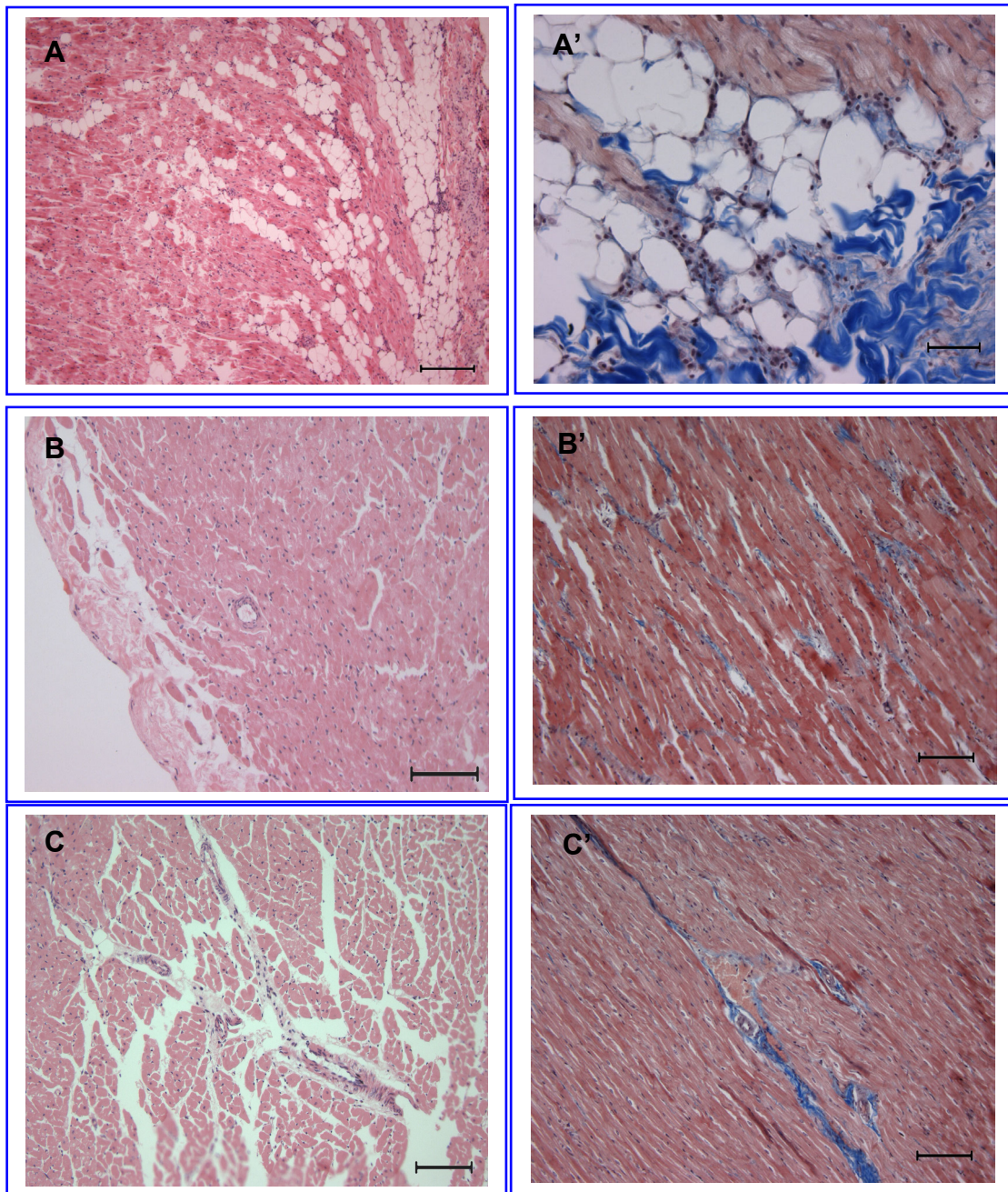


Figura 24- Fotomicrografias da região de septo cardíaco no qual A e A' referem-se à região proximal, B e B' região mediana e C e C' à região distal. Em todas as áreas podem ser observadas grandes quantidades de células mononucleares, principalmente em locais em que há tecido conjuntivo. Figuras de A à C: coloração HE, Barras de 50 μ m, 200 μ m, 100 μ m e 100 μ m respectivamente. Figuras A' à C': Coloração Tricrômio de Masson e Barras de 40 μ m, 100 μ m e 100 μ m respectivamente.

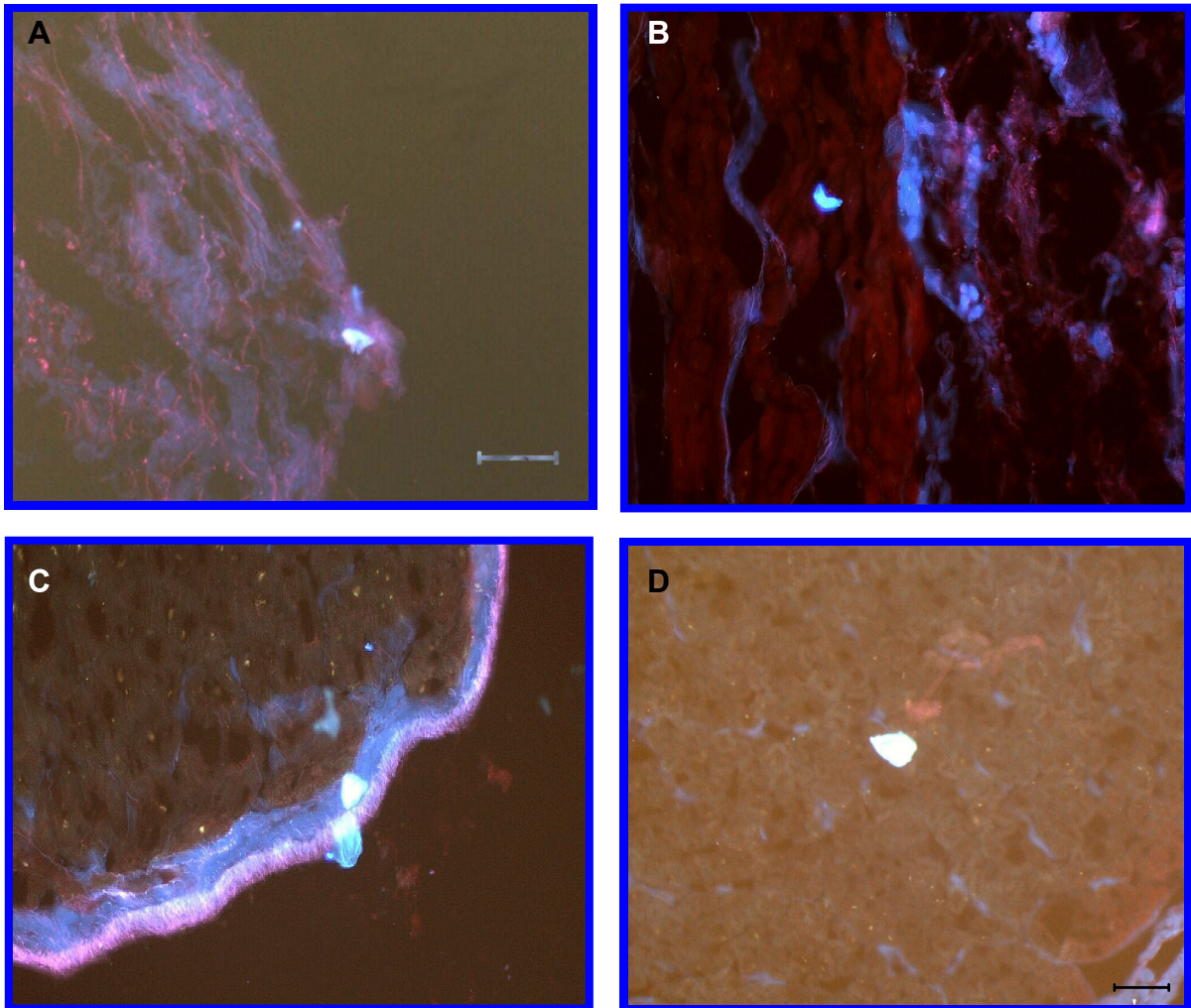


Figura 25- Fotomicrografias de átrio e ventrículo direito no qual pode-se observar a presença de células em todas as porções, sendo elas: (A) átrio esquerdo, (B) transição átrio/ventrículo esquerdo, (C) abaixo da bifurcação da artéria marginal do ventrículo esquerdo, (D) ápice do coração. Coloração: Evans Blue. Aumento de 20 μ m.

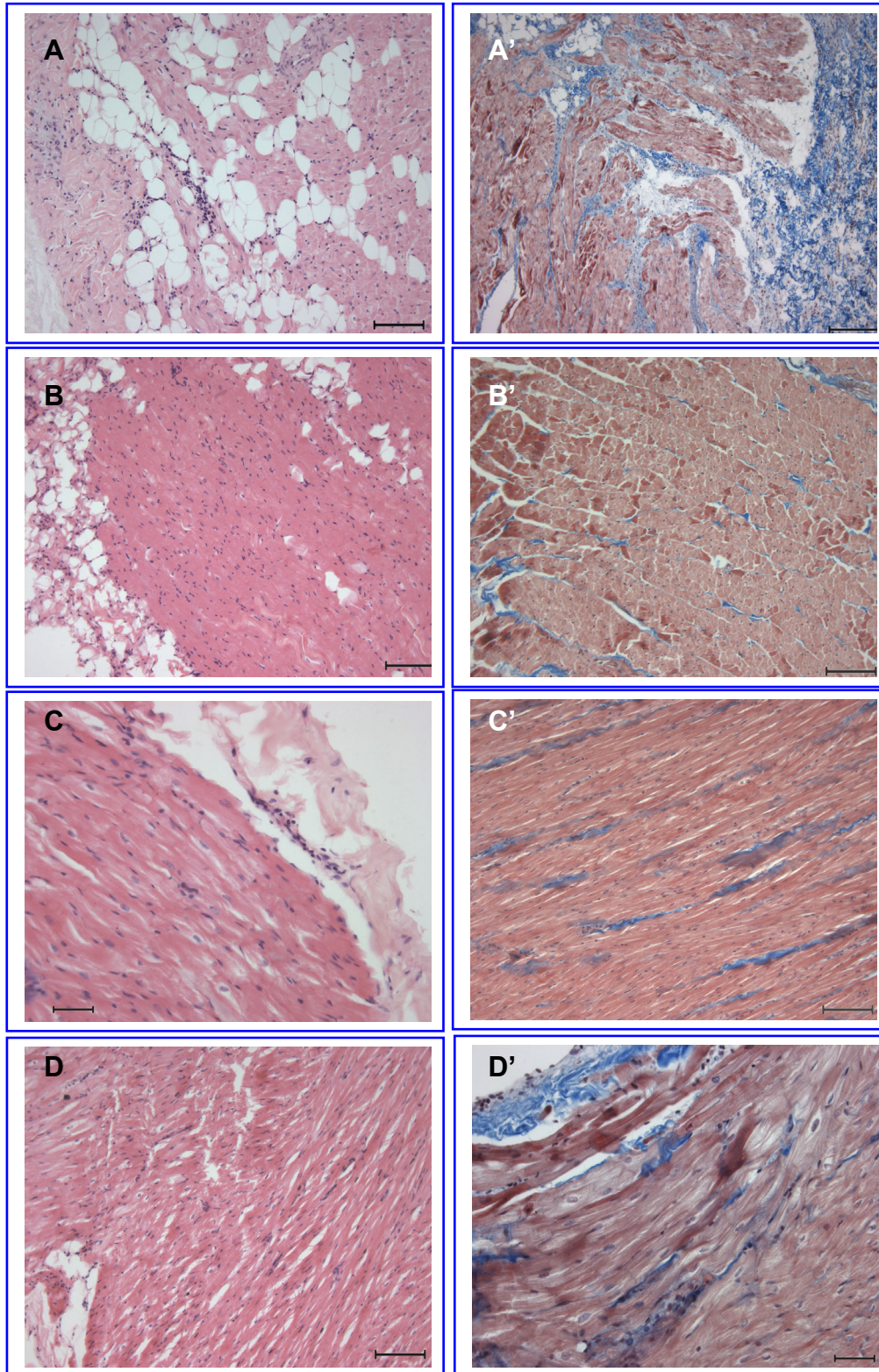


Figura 26- Fotomicrografias no qual podemos observar presença e células em todas as porções, atrial, basal, média e apical. Coloração: A-D (HE) e A'-D' (Tricromo de Masson); Barras: 40 μ m (C,D'), 100 μ m (A, A',B, B', C' e D).

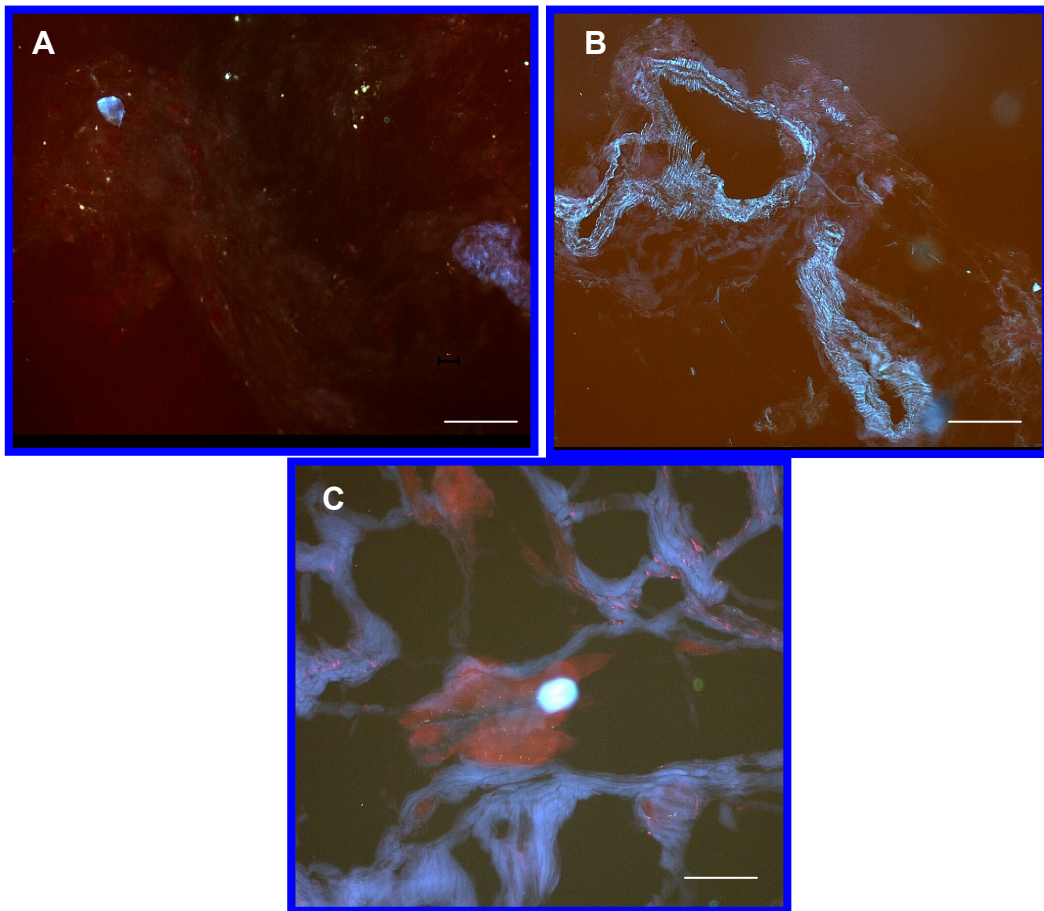


Figura 27- Fotomicrografias de epifluorescência no qual pode-se observar a presença de células mononucleares em (A) baço, (B) pulmão e (C) língua. Coloração: Azul de Evans. Barras: 20 μ m (A e B) e 40 μ m (C).

5.5 Resultados Referentes a Processos de Reendotelização ou Adesão Celular

Ao analisarmos as fotomicrografias de luz através das colorações de HE e Tricromo de Masson pudemos observar processo inicial de reendotelização ou adesão de células mononucleares, uma vez que o endotélio de vasos de grande e pequeno calibre, via retrógrada e anterógrada, em sua maioria apresentam-se altos. No caso da via transendocárdica, somente os vasos de médio à pequeno calibre apresentam-se desta forma (Figura 28). Pela análise de microscopia de fluorescência também pudemos observar que algumas células marcadas também encontravam-se aderidas ao endotélio, mas muitas delas encontravam-se em tecido conjuntivo adjacente ao vaso (Figura 29) em todas as vias testadas.

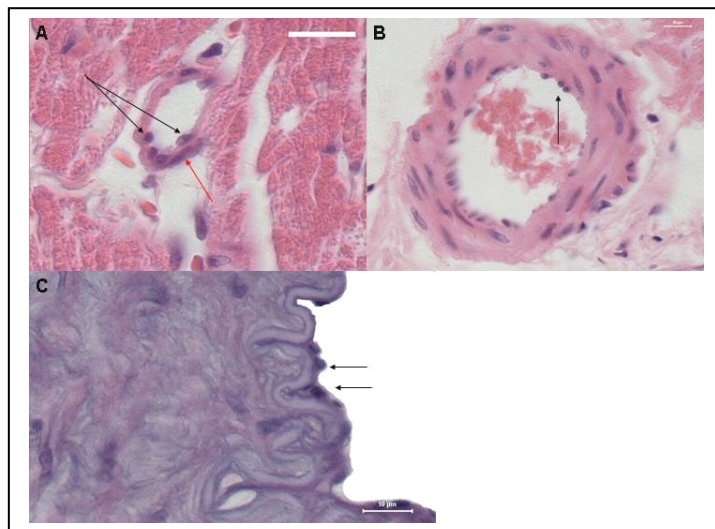


Figura 28- Fotomicrografias vasos em tecido cardíaco, no qual podemos observar células aderidas ao endotélio (setas pretas) em diferentes vias de infusão de células mononucleares. A) via transendocárdica – célula endotelial (seta vermelha); B) Via anterógrada ou intracoronariana e C) via retrógrada. Coloração HE, Barras 10 μ m.

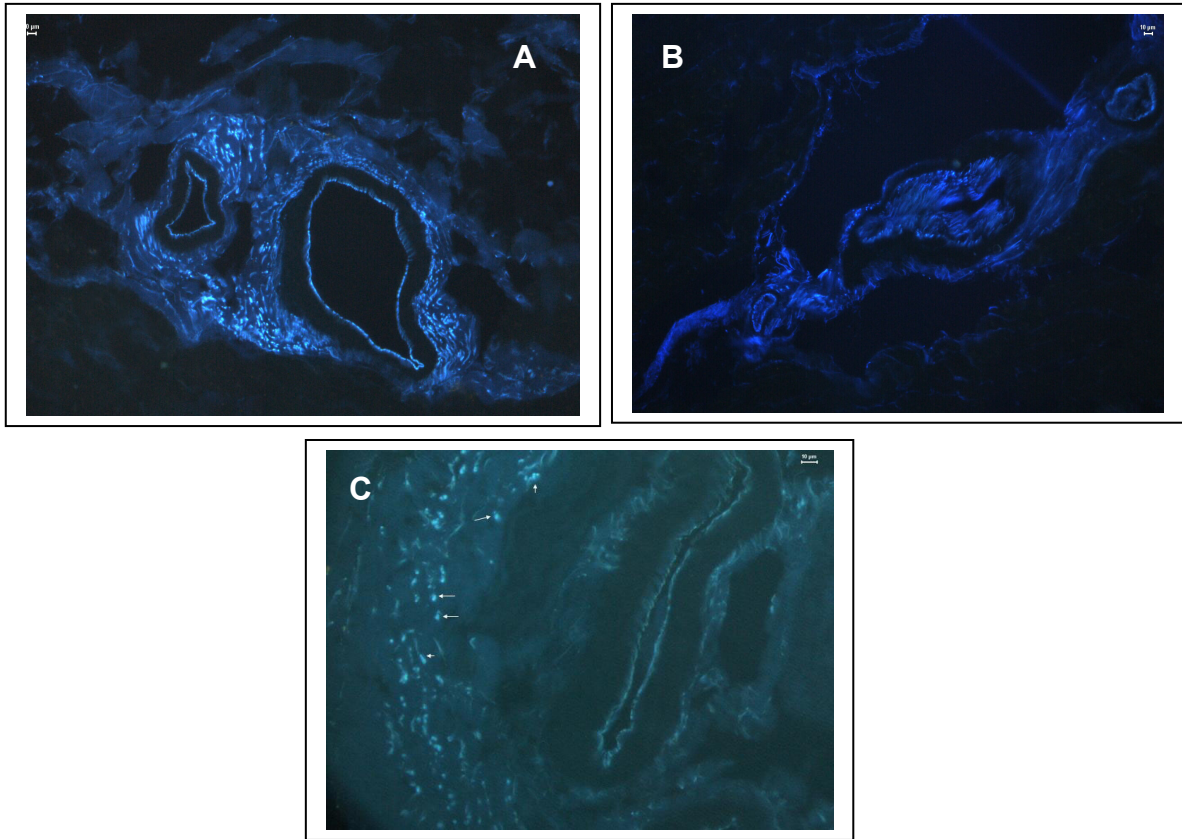


Figura 29.- Fotomicrografias de fluorescência, no qual podemos observar células marcadas com Hoechst® (azul) em tecido conjuntivo peri-vascular. A) via anterógrada; B) via Transendocárdica e C) via retrógrada. Barras 10 μ m.

5.6. Resultados Referentes à Análise dos Cortes Semi-finos e Microscopia Eletrônica de Transmissão

Através de análise de material e cortes semi e ultra-finos não foram constatadas alterações teciduais que levassem à implicações como rejeição das células infundidas e obstrução de vasos sanguíneos com conseqüente isquemia tecidual. Pôde-se observar a presença de uma célula mononuclear imatura, pré-monócito em tecido cardíaco (Figuras 30 e 31).

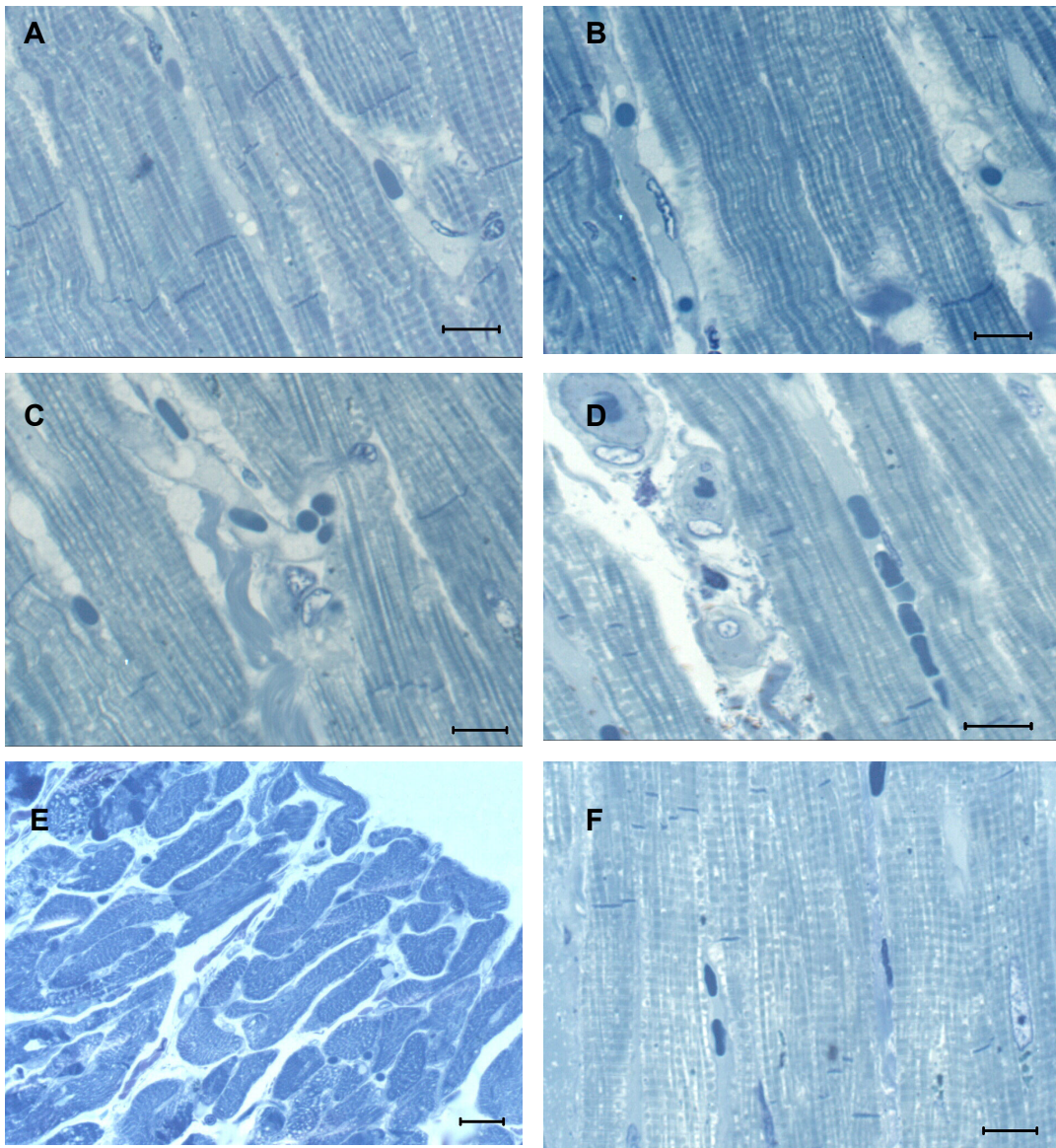


Figura 30- Fotomicrografias de cortes semi-finos de musculatura cardíaca. Observe que não há alterações no tecido após infusão. Observe a grande vascularização no tecido, bem como a disposição das fibras aos discos intercalares separando-as. Coloração: Azul de Toluidina. Barras: (A, B, D e F) 10 μ m e (E) 20 μ m.

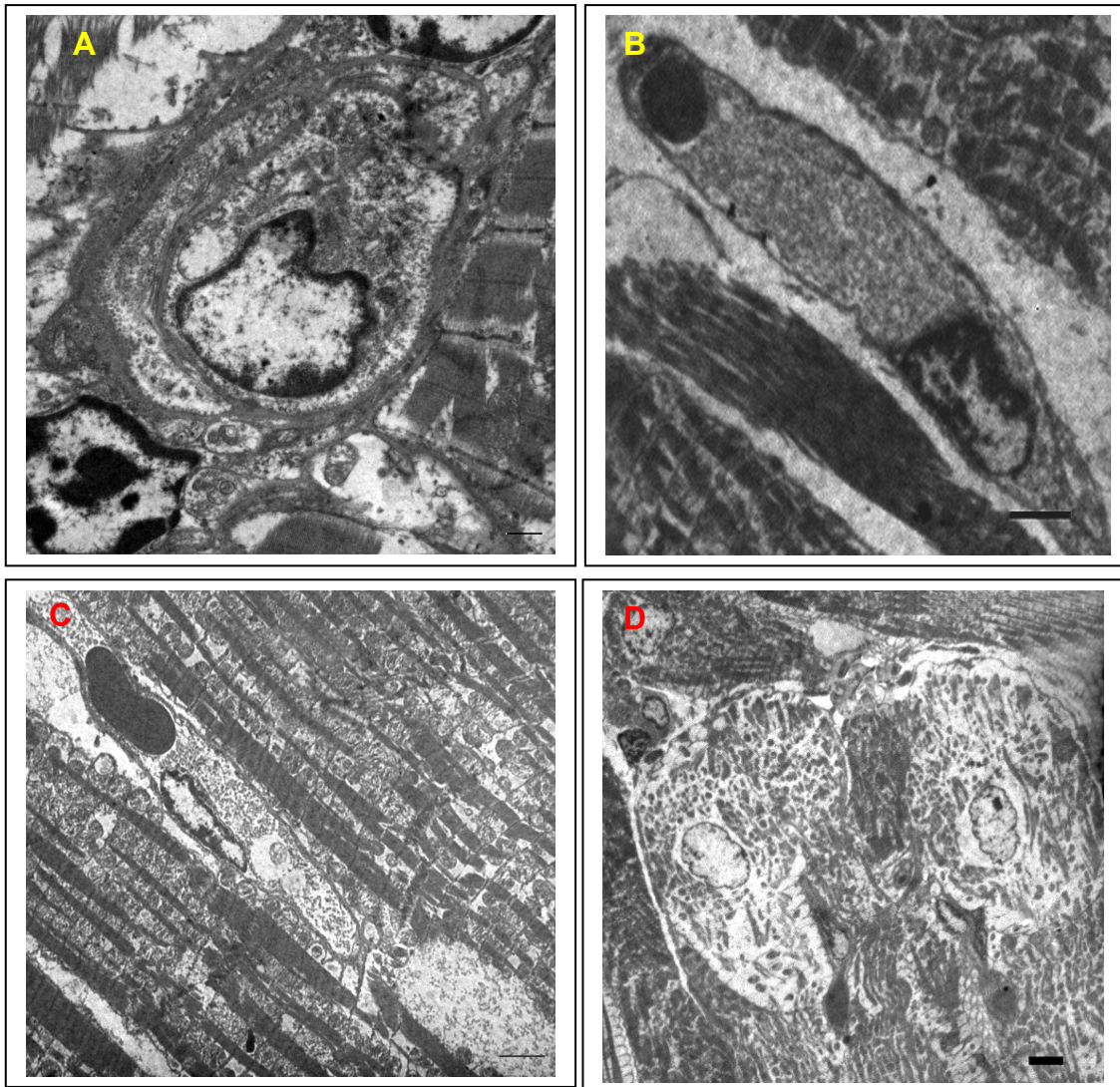


Figura 31- Fotomicroscopia eletrônica de transmissão de cães no qual foram infundidas células mononucleares da medula óssea por diferentes vias de infusão. Observe a normalidade do tecido, sendo que em (A) evidencia-se a presença de uma célula imatura, em (B) vaso apresenta-se entremeado a musculatura cardíaca, em (C) corte longitudinal de fibra cardíaca e em (D) corte transversal da fibra cardíaca. Barras: (A) 5nm; (B e C) 5 μ m; (D) 4,98 μ m.

5.7 Resultados Morfométricos por Quantificação do Número de Células através de Métodos Estereológicos.

Verificando o comportamento das regiões dentro de cada via de infusão avaliada (nas linhas), observa-se que na via intracoronariana, os números de células marcadas no átrio diferiram estatisticamente ($P < 0,01$) em relação a regiões basal, medial e apical. Entretanto para esta via de infusão, as menores quantidades de células marcadas foram observadas nas regiões medial e basal. Para a via de infusão retrógrada, as regiões atrial e apical não apresentaram diferenças significativas entre si e foram as de maiores números de células marcadas. Menores quantidades de células marcadas foram verificadas nas regiões basal e medial. Para a via de infusão transendocárdica, maiores quantidades de células marcadas foram observadas para as regiões atrial e medial. Entretanto as regiões atrial, basal e apical, não apresentaram diferenças significativas entre si ($P > 0,05$). O comportamento das regiões avaliadas segundo as vias de infusão, pode ser verificado no Gráfico 1 e Tabela 1. O número médio de células marcadas segundo as vias de infusão, dentro de cada região avaliada, encontra-se no Gráfico 2 e Tabela 2.

Tabela 1- Médias de quadrados mínimos do comportamento das regiões dentro de cada via de infusão.

Vias de Infusão	Regiões			
	Atrial	Basal	Medial	Apical
Intracoronariana	14739 a	5417,33 c	1036b	8306,67 b
Transendocárdica	10507 a, b	8132,67 b	12439 a	8894,67 b
Retrógrada	7423,67 a. b	1736,67 c	4653,33 b, c	84866 a

Médias em uma mesma linha, seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo Teste t de Student

Tabela 2- Médias de quadrados mínimos do comportamento das regiões dentro de cada via de infusão.

Vias de Indução	Região			
	Atrial	Basal	Medial	Apical
Intracoronariana	14739 a	5417,33 a	10363 a	8306,67 a
Transendocárdica	10507 b	8132,67 a	12439 a	8894,67 a
Retrógrada	7426,67 b	1736,67 b	4 53,33 b	8486 a

Médias em uma mesma coluna, seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo Teste t de Student

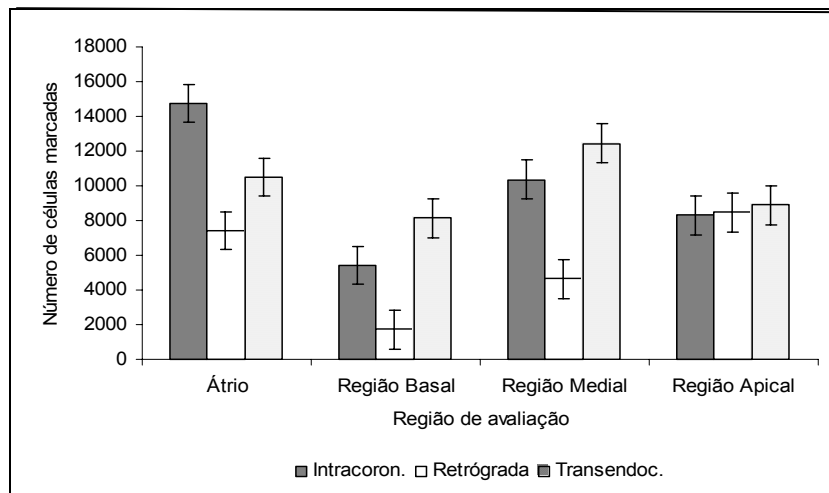


Gráfico 1- Quantificação do número de células em relação às regiões atrial, basal, medial e apical.

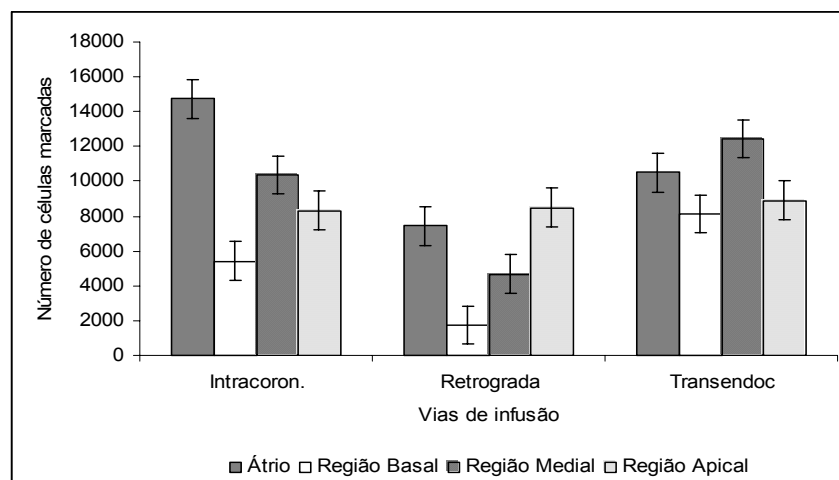


Gráfico 2- Quantificação do número de CMMO em relação às vias de infusão. Observar que a via transendocárdica apresenta um maior número de células em relação às vias intracoronariana e retrógrada.

6 DISCUSSÃO

A infusão de células mononucleares da medula óssea pela via intracoronariana no cão, leva a uma distribuição de células em tecido cardíaco de uma forma global, ou seja, as células quando injetadas podem ser encontradas em todas as câmaras cardíacas, dispostas do epicárdio ao endocárdio. Assim há uma melhor distribuição destas células em interstício celular, ficando desta forma expostas ao contato com os cardiomiócitos. Esta correlação de distribuição foi inicialmente descrita por (STRAUER e KORNOWISK, 2003) e (SUZUKI et al, 2000). Sugere-se que este padrão de distribuição esteja relacionado pelo próprio padrão vascularização do coração.

Entretanto não foi observada no cão a presença de colônias de células, tais como as descritas por Suzuki et al (2000). Ao nosso ver, isto pode ser explicado uma vez que a infusão de células foi realizada apenas em animais saudáveis. Esta via de distribuição de células tem importante relevância em patologias cardíacas causadas por obstruções (infarto). Sabe-se que a distribuição de sangue no coração não é homogênea, sendo que a área sub-endocárdica é a menos perfundida, devido ao gradiente de pressão que leva a compressão de seus vasos. Uma vez que as células se encontram nesta área, podem auxiliar na regeneração desta patologia diminuindo a área de infarto e/ ou restringindo a área de remodelamento cardíaco (tecido cicatricial). Isto ocorre devido aos seus efeitos sobre o tecido cicatricial, seja pela neoformação de vasos e/ou pela formação de cardiomiócitos.

Ressalta-se, neste caso, a importância da recuperação sub-endocárdica, pois a repolarização do impulso cardíaco ocorre em sentido epicárdio a endocárdio e, como há um tecido cicatricial, observa-se um prolongamento do tempo de repolarização, alterando desta forma, a contratilidade cardíaca.

Não foram observadas áreas de microinfartos tais como atestados por Vulliet et al, 2004, uma vez que existem leucócitos na circulação. Em casos nos quais há uma maior demanda de células brancas imaturas na circulação, estas também poderiam provocar infartos em pequenos vasos, e isto não ocorre.

A maior quantidade de células observadas nos cães na microscopia de luz em relação a microscopia de epifluorescência, pode estar relacionada a liberação de citocinas, que vão mobilizar mais células mononucleares para o tecido em questão.

Os resultados obtidos pela via transendocárdica mostram uma entrega seletiva de células infundidas em local no qual foi detectado infarto além da presença das mesmas em áreas normais, tais resultados também foram descritos por SUZUKI et al (2001).

Mediante análise histológica também foi observado no cão a formação de pequenos grupamentos de células no local da infusão. Se de uma parte uma maior quantidade de células em tecido cardíaco é benéfica, pois haveria provavelmente, uma maior formação de vasos e cardiomiócitos, por outro lado um acúmulo de células pode interferir na diferenciação das mesmas, uma vez que, a diferenciação celular é influenciada pelo microambiente, citocinas e pela interação “célula nativa e célula transplantada”.

A importância da infusão de células pela via transendocárdica está correlacionada com os infartos denominados de intramurais ou sub-epicárdicos pois, como observado no cão, há uma maior quantidade de células no epicárdico, e, os nichos de células em interstício celular podem favorecer o reestabelecimento do tecido lesionado, apesar de haver uma marcada quantidade de células também dispostas no endocárdico.

O maior número de células aderidas pela via transendocárdica em relação às vias intracoronariana e retrógrada pode ser explicada devido a entrega seletiva de células que esta via promove.

Há restrições para a realização de infusão por esta via transendocárdica, pois, quando ocorre a penetração da agulha no músculo cardíaco, esta interfere na condução do estímulo cardíaco, ou seja, ocorre hiperestimulação o que pode resultar em extra-sístoles ou em casos mais graves fibrilação cardíaca, como relata STRAUER & KORNOWSKI (2000) e FUCHS et al (2003). Por ser esta uma via de entrega seletiva de células, a pouca quantidade de células marcadas em ventrículo, átrio direito e em outros órgãos é explicável.

A distribuição de células mononucleares está relacionada principalmente com a disposição do tecido conjuntivo no coração, isto porque, ao realizar a infusão, a agulha penetra de endocárdio a epicárdio, sendo que as mesmas são difundidas em região próxima ao epicárdio e, por realizar infusões dentro do miocárdio, há formação dos nichos celulares.

A via retrógrada por seio venoso promove no cão, quando utilizada, uma relativa aderência de células mononucleares em tecido cardíaco. Isto pode ocorrer devido à interferência na passagem das células pela parede das veias. As células que permanecem no espaço intravascular não sobrevivem. Além disso, o efeito de primeira passagem pela circulação pulmonar também pode desfavorecer o processo (STRAUER & KORNOWSKI, 2003). A via venosa é a via de eleição para infusão nos pulmões, além disso, uma grande quantidade de células foram observadas em outros órgãos como baço. Embora Suzuki et al (2001) relataram a presença de células somente na parede do ventrículo esquerdo, pudemos observar a presença da mesma tanto no ventrículo direito quanto no septo cardíaco dos cães. Os mesmos autores relatam a presença de células no espaço extracelular, no chamado

interstício celular, como observado em nosso estudo. A dificuldade de passagem das células para o espaço celular pode influenciar na distribuição das células no tecido cardíaco. Isto explicaria, ao nosso ver, a presença marcante das células no epicárdio. O calibre dos vasos desta região também pode interferir neste processo. A utilização de medicamentos promotores do aumento da permeabilidade vascular, poderia incrementar o número destas células no tecido. Contudo, devemos salientar que em casos de doença coronariana, esta via tem grande importância, como uma alternativa para infusão de células, diminuindo a área de lesão.

A maior quantidade de células observadas pela da microscopia de luz em relação à microscopia de fluorescência, pode ter ocorrido devido a processos de recrutamento celular. Estes fatores podem ter sido liberados pelo “*stress*” causado pelo cateter, quando o mesmo encontrava-se dentro do lúmen vascular, ou devido à estímulos das CMMO sobre o tecido cardíaco levando a de liberação de fatores de recrutamento. Como no caso da via intramiocárdica-transendocárdica, a agulha no momento da infusão age como um copo estranho. Isto estimula o tecido a liberar citocinas que agem sobre diferentes células, incluindo as mononucleares não marcadas, e então elas permanecem no tecido. A presença de CMMO marcadas em outros órgãos como fígado e baço está relacionada com liberação de fatores de recrutamento celular liberados pelo tecido mesmo em homeostasia, este resultado também foi observado por Vanderverde et al (2005), Christopherson et al (2004) e Hattori, Hessig e Raffi (2003).

7 CONCLUSÕES

Com relação as vias de infusão de células tronco mononucleares coletadas da medula óssea concluímos que:

Todas as formas de infusão são factíveis de serem realizadas no cão. Entretanto em relação à análise comparativa entre elas podemos citar:

1. A via intracoronariana é uma via de fácil acesso e requer somente de uma equipe para realizar a infusão das células, contudo, em casos de diagnóstico de doença coronariana, torna-se inviável a utilização da mesma.

A via transendocárdica é necessário equipamento (NOGA) para a realização do mapeamento da câmara cardíaca, para localização da área infartada, e, conseqüentemente, localização da região de infusão de células. Com isso, há um aumento do tempo de cirurgia e do número de cirurgiões para a realização do procedimento.

A via retrógrada por seio venoso é uma via que deve ser utilizada em casos no qual se detecta doença coronariana. Contudo, para o procedimento da mesma é necessária a realização de cateterização arterial e venosa.

2. Com relação à disposição das células em tecido cardíaco podemos afirmar que:

A via intracoronariana sugere um padrão intersticial de distribuição das células mononucleares, isto é, as células identificadas encontram-se intimamente ligadas ao músculo cardíaco.

Pela via Transendocárdica as células preferencialmente encontram-se distribuídas em locais com grande quantidade de tecido conjuntivo, nos quais há uma marcada quantidade delas no epicárdio. Podem ser observadas em tecido cardíaco, formações de pequenos nichos de células s mononucleares.

Pela via retrógrada por seio venoso podemos afirmar que a distribuição das células também está ligada à distribuição do tecido conjuntivo. Nesta é observada uma grande quantidade de células em epicárdio, podendo estas adentrar o miocárdio, porém, ocasionalmente atingem o endocárdio.

3. Com relação aos resultados morfométricos podemos afirmar que:

A análise estatística nos permitiu observar que a interação via de infusão quando comparada à quantidade de células em tecido cardíaco, demonstrou diferenças significativas ($P < 0,01$). A via transendocárdica leva a um maior enxerto de células no ventrículo esquerdo.

4. Com relação à liberação de fatores de recrutamento celular:

A liberação de fatores de recrutamento celular, que envolve a liberação principalmente de citocinas e fatores de crescimento, promovem a adesão de CMMO tanto no tecido alvo, quanto em outros tecidos que também os liberam em homeostasia.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, J. D.; GIORDANO, F. J. Stem cell and cardiovascular disease. **Journal of nuclear Cardiology**, v.10, p. 403-412, 2003.

ABBOTT, J. D.; HUANG, J.; LIU, D.; HICKEY, R.; KRAUSE, D. S.; GIORDANO, F. J. Stromal Cell-Derived Factor-1_ plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. **Circulation**, v. 110, p. 1-6, 2004;

AL-RADI, O. O.; RAO, V.; LI, R.; YAU, T.; WEISEL, R. D. Cardiac cell transplantation: closer to beside. **The annals thoracic surgery**, v. 75, n. 2, p. S674-7, 2003.

ARAI, A. E.; SHEIKH, F.; AGYEMAN, K. O.; HOYT, R.; SACHDEV, V.; YU, X.; SAN, H.; METZGER, M.; DUNBAR, C.; ORLIC, D. Lack of benefit from cytokine mobilized stem cell therapy for acute myocardial infarction in nonhuman primates. **Journal of american college of cardiology**, v. 41 (6Suppl B), p. 371, 2003.

ASAHARA, T.; MUROHARA, T.; SULLIVAN, A.; SILVER, M.; ZEE, R.; LI, T.; WITZENBICHLER, B.; SCHSTTERMAN, G.; ISNER, J. M. Isolation of putative endothelial cells for angiogenesis. **Science**, v. 275, p. 964-967, 1997.

BARBASH, I. M.; CHOURAQUI, P.; BARON, J.; FEINBERG, M. S.; ETZION, S.; TESSONE, A.; MILLER, L.; GUETTA, E.; ZIPORI.; KEDES, L. H.; KLONER, R. A.; LEOR, J. systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium. feasibility, cell migration, and body distribution. **Circulation**, v. 108, p. 863, 2003.

BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M .C.; FREITAS NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: Edart, 1976, p.375.

CAPLICE, N. M.; GERSH, B. J. Stem Cell to Repair the Heart: a clinical perspective. **Circulation**, v. 92, n. 1p. 92-96, 2003

CARDOSO, F. P., GONZÁLEZ, J. H., EZQUERRA, E. A. Utilización de células madre para la regeneración miocárdica en la insuficiencia cardíaca. **Revista española de cardiología**. v. 56(10): 935-939,2003.

CHRISTOPHERSON II, K. W.; HANGOC, G.; MANTEL, C. R.; BROXMEYER, H. E. modulation of hematopoietic stem cell homing and engraftment by CD26. **Science**, v. 305, p. 1000-3, 2004.

COLINO, C. G. Estado actual de la Investigación con células madre. **Anales de pediatría**, 2003.

COTTLER-FOX, M. H.; LAPIDOT, S.; PETIT, I.; KOLLET, O.; DIPERSIO, J. F.; LINK,D.; DEVINE, S. Stem cell mobilization. **Hematology**, p. 419-37, 2003

COVAS, D. T.; SIUFI, L. L. C.; SILVA, A. R. L.; ORELLANA, M. D. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. **Brazilian Journal of Medicine Research**, v. 36, n. 9, p. 1179-1183, 2003.

CROW, S. E.; WALSHAW, S.O. **Manual de Procedimentos Clínicos em Cães, Gatos e Coelhos**. São Paulo: Artmed, 2000.p. 279.

DENNIS, J. E.; CHARBORD, P. Origin and differentiation of human and murine stroma. **Stem Cells**, v. 20, p. 205-214, 2002.

DEXTER, T. M., SPOONCER, E., VARGA, J., ALLEN, T. D., LANOTTE, M. Stromal cells and diffusible factors in the regulation of haemopoietic cell development, 1983. In: KILLMAN, SV. A. A., CRONKITE, E. P., MULLER-BERAT, C. N., **Haemopoietic Stem Cells**, A.BenzoSymposium, Munksgaard, Copenhagen, pp. 303-322.

FRIEDENSTEIN, A. J. GORSKAJA, J. F.; KALAJINA, N. N. Fibroblast Precursor in Normal end Irradiated Mouse. **Hematopoietic Organs**. Experimental Hematology, v. 4, p. 267-274, 1974.

GAGLIARDO, K. M.; BALIEIRO, J. C. C.; SOUZA, R. R.; RIBEIRO, A. A. C. M. Postnatal- Related Changes in the size and Total Number of Neurons in the Caudal Mesenteric Ganglion of Dogs: Total Number of Neurons Can Be Predicted from Body Weight and Ganglion Volume. **The Anatomical Record**, Part A, p. A286-929, 2005.

GETTY, R. **Sisson/ Grossman Anatomia dos Animais Domésticos**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1986. p.153-152.

HAMANO, K.; LI, T. S.; KOBAYASHI, T.; HIRATA, K.; YANO, M.; KOHNO, M.; MATZUZAKI, M. Therapeutic Angiogenesis Induced by Local Autologous Bone Marrow Cell Implantation. **The Annals of thoracic surgery**, v. 73, p. 1210-1215, 2002.

HASSINK, R. J.; BRUTEL de la RIVIERE, A.; MUMMERY, C. L.; DOEVENDANS, P. A. Transplantation of cells for cardiac repair. **The Journal of American College of Cardiology**, v. 41, n. 5, p. 711-7, 2003. a

HASSINK, R. J.; DOWELL, J. D.; de la RIVIÈRE, A.B.; DOEVENDANS, P. A.; FIELD, L.J. Stem Cell Therapy for Ischemic Heart Disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 9, n. 10, p. 436-41, 2003. b

HATTORI, K.; HEISSING, B.; HAFFI, S.; The Regulation of hematopoietic stem cell and progenitor mobilization by chemokine SDF-1. **Leukemia & Lymphoma**, v. 44, n. 4, p. 575-82, 2003.

HENNINGSON, C. T JR, STANISLAUS, M. A, GEWIRTZ, A. M. Embryonic and adult stem cell therapy allergy. **Clinical immunology**, v. 111(2 Suppl), p. S745-53, 2003.

HIDEMASA, O.; BRADFUTE, S. B.; GALLARDO, T. D.; NAKAMURA, T.; GAUSSIN, V.; MISHINA, Y.; POCIUS, J.; MICHAEL, L. H.; BEHRINGER, R. R.; GARRY, D. J.; ENTMAN, M. L.; SCHNEIDER, M. D. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: Homing, differentiation, and fusion after infarction. **PNAS online**, v. 100, n. 21, p. 12313-18, 2003.

HOU, D.; YOUSSEF, E. A. S.; BRINTOS, T.; ZHANG, P.; ROGERS, P.; PRICE, E. T.; YEUNG, A. C.; JOHNSTONE, B. H.; YOCK, P. G.; MARCH, K. L. Radiolabeled cell distribution after intramyocardial, intracoronary, and interstitial retrograde coronary venous delivery – implications for clinical trials. **Circulation**, [Suppl I], p. I-150-I156, 2005.

JACKSON, K. A.; MAJKA, S.; WANG, H.; POCIUS, J.; HARTLEY, C. J.; MAJESKY, M. W.; ENTMAN, M. L.; MICHAEL, L. H.; HIRSCHI, K. K.; GOODELL, M. A. regeneration of inschemic cardiac muscle and vascular endothelium by adults stem cells. **Journal of Clinical Investigation**, v. 107, n. 11, p. 1355-6, 2001.

JIANG, W.; JAHADIAR, N. B.; REINHARDTT, R. L.; SCHWARTZ, R E.; KEENE, C. D.; ORTIZ-GONZALEZ, X. R.; REYES, M.; LENVIK, T.; LUND, T.; BLACKSTAD, M.; DU, J.; ALDRICH, S.; LISBERG, A.; LOW, W. C.; LARGAESPADA, D. A.; VERFAILIE, C. M. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. **Nature**, n. 418, 2002.

KANG, H. J.; KIM, H. S.; PARK, Y. B. Stem cell therapy for myocardium infarction. **Stem Cell Biology – Canadian Medical Association**, v. 171, n. 5, p. 442-443, 2004.

KRAUSE, D .S. Plasticity of Marrow-derived Stem Cells. **Gene Therapy Nature**, v. 9 , p. 754-758, 2002.

KAWAMOTO, A.; TKEBUCHAVA, T.; YAMAGUCHI, J.; NISHIMURA, H.; YOON, J.; MILLIKEN, C.; UCHIDA, S.; MASUO, O.; IWAGURO, H.; MA, H.; HANLEY, A.; SILVER, M.; KEARNEY, M.; LOSORDO, D. W.; ISNER, J. M.; ASAHARA, T. intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. **Circulation**, v. 107, p. 461-68, 2003.

KOLLET, O.; KALINKOVICH, A.; GOICHBERG, P.; PETIT, I.; KAHN, J.; SPIEGEL, A.; DAR, A.; SHIVTIEL, S. Regulation of stem cell migration and

development by chemokines, adhesion molecules and proteolytic enzymes.

Disponível

em:

http://www.weizmann.ac.il/Biology/open_day/book/author/t_lapidot.pdf.

Department of Immunology, 2005.

LOURENÇO, M. G. **Vascularização Arterial dos Músculos Papilares do Ventrículo Esquerdo de Cães (*Canis familiaris*, L. 1758)**, 2003.

MARTINEZ-GONÇALEZ, J.; BADIMON, L. Reendotelización, engrosamiento intimal y remodelado vascular. ¿Un denominador común? **Revista española de Cardiología**, v. 53, p. 1425 – 1427, 2000.

MINKOWSKI, M. Eurocores on the development of a stem cell tool box. **Journal of cellular molecular medicine**, v. 7, n. 3, p. 336:337, 2003.

NIR, S. G, DAVID, R.; ZARUBA, M.; FRANZ, W. M. ITSKOVITZ-ELDOR, J. Human embryonic stem cells for cardiovascular repair. Human embryonic stem cells for cardiovascular repair. **Cardiovascular research**, v. 58, n. 2, p. 313-23. 2003.

ORLIC, D. Adult Bone Marrow Stem Cell Regenerayte Myocardium in Ischemic Heart Disease. **Annals of New York Academy Science**, v. 996, p. 152-157, 2003.

ORLIC, D. The strength of plasticity: stem cells for cardiac repair. **International Journal of Cardiology**, 2004. Disponível em www.elsevier.com/locate/ijcard.

ORLIC, D. KAJSTURA, J.; CHIMENT, S.; LIMANA, F.; JAKONIUK. I.; QUAINI, F.; NADAL-GINARDI, B.; BODINE, D. M.; LERI, A.; ANVERSA, P. Mobilized Bone Marrow Cells Repair the Infacted Heart, Improving Function and Survival. **PNAS**, v.98, n. 18, p. 10344-10349, 2001.

POULSON, R.; ALISON, M .R.; FORBES, S. J.; WRIGHT, N. A. Adult Stem Cell Plasticity. **Jounal of Pathology**, v. 197, p. 441-456, 2002.

RAMUSSEN, T. P. Embryonic stem cell differentiation: a chromatin perspective **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, p. 100, 2003.

RANGAPPA, S., ENTWISTLE, J. W. C., WECHSLER, A. S., KRESH, Y. Cardiomyocyte-mediated contact programs human mesenchymal stem cells to express cardiogenic phenotyp **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 126, 2003.

ROSSI, M. I. D.; BARROS, A. P. D. N.; BAPTISTA, L. S.; . GARZONI, L. R.; MEIRELLES, M. N. ; TAKIYA, C. M.; PASCARELLI, B. M. O.; DUTRA, H. S.; BOROJEVIC, R. Multicellular spheroids of bone marrow stromal cells: a three-dimensional *in vitro* culture system for the study of Hematopoietic cell migration. 3-D cell culture and hematopoietic cell migration. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 1455-1462, 2005.

SAS. USER'S GUIDE: **Basic and Statistic**. Cary: SAS, 1995. 1686 p

SIMINIAK, T.; KURPISZ, M. Myocardial replacement therapy. **Circulation**, v. 108, n. 10, p 1167-71,2003.

STRAUER, B. E.; BREHM, M.; ZEUS, T.; GATTERMANN, N.; HERNANDEZ, A.; SORG, R. V.; KÖGLER, G.; WERNET, P. Intracoronary, human autologous stem cell transplantation for myocardial regeneration following myocardial infarction. **Deutsche Medizinische Wochenschrift**, v. 126, n. 34-35, p. 932-8, 2001.

STRAUER, B. E.; BREHM, M.; ZEUS, T.; KÖSTERING, M. HERNADEZ, A.; SORG, V .H.; KÖGLER, G.; WERNET, P. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. **Circulation**, v. 106, n. 15, p. 1931, 2001.

STRAUER, B. E.; KORNOWISKI, R. Stem Cell Therapy in Perspective. **Circulation**, v. 107, p. 929-934, 2003.

SUZUKI, K.; MURTUZA, B.; SUZUKI, N.; SMOLENSKI, R. T.; YACOUB, M. H. Intracoronary infusion of skeletal myoblasts improves cardiac function in doxorubicin-induced heart failure. **Circulation**, v. 104 (Supl I), p. I-213-I217, 2001.

SUZUKI, K.; MURTUZA, B.; FUKUSHIMA, S.; SMOLENSKI, R. T.; VARELA-CARVER, A.; COPPEN, S. R.; YACOUB, M. H. Target cell delivery into infarcted rat hearts by retrograde intracoronary infusion: distribution, dynamics and influence in cardiac function. **Circulation**, v. 110[Suppl], p. II-225-II230, 2004.

SUZUKI, K.; BRAND, N. J.; SMOLENSKI, R. T.; JAYAKUMAR, J.; MURTUZA, B.; YACOUB, M. H. Development of a novel method for cell transplantation through the coronary artery. **Circulation**, v. 102 [Suppl III], p. III359-III364, 2000.

TEMPLE, S. Embryonic stem cell self-renewal, analysed. **Cell**, v.115, p. 247-248, 2003.

THOMSON, J. A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S. S.; WAKNITZ, M. A.; SWIERGIEL, J. J.; MARSHALL, V. S.; JONES, J. M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, v. 282, n. 5391, p. 1145-1147, 1998.

TSE, H. F.; KWONG, Y. L.; CHAN, J. K. F.; LO, G.; HO, C. L.; LAU, C. P. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell transplantation. **The Lancet**, v. 361, p. 47-49, 2003.

VANDERVELDE, S.; VAN LUYN, M. J. A.; TIO, R. A.; HARMSSEN, M. C. Signaling factors in stem cell-mediated repair of infarcted myocardium. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 39, p. 363-376, 2005.

VILQUIN, J. T, MAROLLEAU, J. P, HAGEGE, A.; MENASCH, E P.; FISZMAN, M.; SCHWARTZ, K. Cell transplantation for post-ischemic heart failure. **Archives des Maladies du Coeur et des Vaisseaux**, v. 95, n. 12, p. 219-25, 2005.

VULLIET, P. R.; GREEELEY ,S. M.; MACDONALD, K. A.; KITTELSON, M. Intra-coronary arterial Injection of mesenchymal stromal cells and Microinfaction in Dogs. **The Lancet**. V. 363:783-784, 2004.

WATT, S. M. Stem cell plasticity. **British Journal of Haematology**, v. 122, p. 877-891, 2003.

WOLLERT, K. C.; MEYER, G. P.; LOTZ, J.; RINGES-LICHTENBERG, S.; LIPPOLT, P.;BREIDENBACH, C.; FICHTNER, S.; KORTE, T.; HORNIG, B.;MESSINGER, D.; ARSENIIEV, L.; HERTENSTEIN, B.; GANSER, A.; DEXLER, H. Intracoronary autologous bone-marrow cells transfer after myocardial infarction: the boost randomised controlled clinical trial. **The Lancet**. v. 364, n. 9429, p. 141-148.

YING, Q. L.; NICHOLAS, J.; CHAMBERS, I.; SMITH, A. BMP induction of id proteins supress differentiation and sustains embryonic stem cells self-renewal in coloboration with STAT3. **Cell**, v. 115, n. 3, p. 281-92, 2003.

ZATZ, M. a Biologia Molecular Contribuindo para a Compreensão e a Prevenção das Doenças Hereditárias. **Ciência e Saúde**,v. 7, n. 1, p. 85-99, 2002.

ANEXO

Avaliação Histológica da Infusão de Células Mononucleares da Medula Óssea pela Via Transendocárdica

Histological Evaluation of Bone Marrow Mononuclear Cell Infusion by Transendocardial Route

Vivian Yochiko SAMOTO¹, Érika Renata BRANCO¹, Guilherme José Bolzani de Campos FERREIRA¹, André Luiz Silveira SOUSA², Hans Fernando Rocha DOHMANN², Radovan BOROJEVIC³, João Ângelo STOPIGLIA¹, Maria Angélica MIGLINO¹.

Vivian Yochiko SAMOTO

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – USP

Av: Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87 – Butantã/Cidade Universitária.

CEP 05508-900

São Paulo-SP

Fone/Fax: (11) 30917690

Celular: (11) 94754492

e-mail: vysamoto@usp.br

²Hospital Pró-Cardíaco – PROCEP

Rua Gal. Polidoro, 192 – Botafogo/ RJ

³Universidade Federal do Rio de Janeiro – Departamento de Histologia e Embriologia, Laboratório de Patologia Celular

Centro de Ciências da Saúde - bloco F. 2º andar - Ilha do Fundão/RJ

RESUMO

As células tronco adultas possuem capacidade de se transformar em certos tipos de tecidos, sendo então chamadas de multipotentes. Surge desta forma, uma nova modalidade de tratamento para doenças cardíacas, assim, uma avaliação na distribuição destas células por infusão transendocárdica torna-se importante, pois o microambiente e interação célula/célula são importantes no processo de transdiferenciação e/ou fusão. Foram utilizados três cães, com aproximadamente 30kg e hígidos, no qual foi realizada punção, separação, marcação e infusão de células tronco mononucleares pela via transendocárdica. Pôde-se observar a presença de células por todo tecido cardíaco, principalmente em epicárdio e tecido conjuntivo adjacente, havendo também a formação de nichos celulares. Como as células são entregues de forma seletiva, esta é uma importante via para doenças isquêmicas e crônicas, no qual os fatores de mobilização celular estão diminuídos.

ABSTRACT

The adult stem cells, multipotential cells, have the capacity to transform in many kinds of tissues. It's emerges like a new form of cardiac diseases treatment, so, an evaluation in the pattern of stem cell distribution by transendocardial route is important, because the microenvironment and the interaction cell/cell are important in transdifferentiation and/or fusion processes. It was used 03 healthy mongrel dogs with 30kg of weight. The bone marrow was harvest from iliacal crest, separated by densitiy, dyed with a fluorescent marker and infused by transendocardic route. The stem cells could be founded in all cardiac tissue, mainly in epicardic and connective tissue, we also observed the colony formations into the myocardium. The cells are delivered of selective form; this is an important way for ischemic and chronic diseases, in which the factors of cellular mobilization are diminished.

PALAVRAS-CHAVE

Limitação da área de infarto, aderência, células tronco, via transendocardica.

KEYWORDS

Infarction area limitation, engraftment, stem cells, transendocardial route.

INTRODUÇÃO

As células tronco, também conhecidas como “*stem cells*” ou células mãe, foram descritas pela primeira vez em 1974, que as caracterizaram como *stem cells* fibroblásticas capazes de formar colônias - fibroblastos formadores de colônias: CFU-F (1). Possuem morfologia fibroblastóide, com alta capacidade para replicação e, após estímulo apropriado podem se diferenciar em todos os tipos celulares (2).

A terapia celular na reparação das células miocárdicas é vislumbrada como uma das estratégias terapêuticas de maior futuro em relação ao tratamento da insuficiência cardíaca devido à limitada eficácia de tratamento medicamentoso e a escassez de órgãos para transplante (3), por isso, a quantificação das células tronco, o padrão de distribuição e o perfil histológico do tecido cardíaco pós-infusão pela via transendocárdica auxiliam na escolha da via a se realizar o transplante de células em pacientes portadores de cardiopatias. Além da utilização destas em problemas cardíacos, podemos também citar que a mesma tem grande importância nos casos de doenças hematológicas e degenerativas (4).

A maior causa da falência cardíaca resulta da oclusão das artérias, sendo que a perda do fluxo sanguíneo leva a isquemia, infarto, necrose seguida por um remodelamento tecidual – cicatriz- afetando a função do miocárdio (5). A perda de miócitos, arteríolas e capilares da área infartada é irreparável, resultando em formação de tecido cicatricial como dito anteriormente. Por esta razão estudos clínicos e experimentais tem principalmente focado na limitação do tamanho do infarto (6).

Na medula óssea de mamíferos adultos, as células sanguíneas desenvolvem-se dentro de uma rede complexa de fatores de regulação humoral, celular e da matriz (7). Durante o desenvolvimento pós-natal os locais de atividade de hematopoiese mudam: há um grande decréscimo da atividade do fígado quanto a esta função e um aumento da atividade do baço. Em mamíferos adultos as *stem cells* hematopoiéticas e células progenitoras residem na medula óssea no qual encontram-se em íntimo contato com o estroma (8). As células tronco adultas da medula óssea consistem em uma série de populações de células pluripotentes. A medula óssea contém células tronco hematopoiéticas (HSCs) e células tronco mesenquimais (MSCs) que derivam de uma célula primitiva, precursora. Ambos os tipos celulares quando injetadas auxiliam principalmente na vasculogênese (9). A vantagem da utilização das células-tronco da medula óssea são: fácil obtenção, sem

objeções éticas, habilidade de expansão, alta compatibilidade, não há necessidade de imunossupressão, aplicações clínicas já realizadas. A principal desvantagem: não há marcadores específicos (10), portanto, o transplante autólogo de células tronco da medula óssea é seguro e não há evidências de toxicidade sistêmica ou local em fase aguda ou crônica (11).

A injeção intramiocárdica é o método mais popular de infusão de células dentro do coração, tendo grande importância em casos de cardiopatia isquêmica devido à habilidade de entregar as células seletivamente dentro do tecido miocárdico, tanto em áreas normais quanto em infartadas. Contudo, as células por esta via formam pequenas “ilhas”, resultando em uma possível limitação de interação célula/célula (células transplantadas e cardiomiócitos). Esta via é passível de se infundir células e possui eficiência na distribuição das mesmas (10). Não foram observadas complicações relacionadas à fase aguda (pós-cirúrgico) ou a seqüelas a longo termo. Além disso, por esta via a infusão de células pode ser realizada no local isquêmico (12).

A via transendocárdica tem como principal vantagem realizar a infusão de células através de visualização, no qual previamente é realizada a identificação anatômica da área e até a distribuição das infusões, contudo, pode causar injúria ao miocárdio, induzir extra-sístoles e até a arritmia ventricular (13-14).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados três cães sem raça definida (SRD), saudáveis e com peso médio de 30Kg. Com animal em plano anestésico realizou-se a punção da medula óssea da crista ilíaca com auxílio de agulha Jamishid. Procedeu-se então a separação das células através de gradiente de densidade (Ficoll-Paque[®] - Amersham Bioscience), marcação das mesmas com Hoescht[®] (Sigma) e infusão pela via transendocárdica, delimitando a área de infusão através de mapeamento eletromecânico (NOGA - Cordis). Foram injetadas 1×10^8 células em três mL de PBS em um total de 18 infusões em média. Após uma hora de infusão, os animais foram eutanasiados e amostras de tecido cardíaco foram coletados para análise histológica, sendo fixados em solução de formaldeído à 10%, incluídos em técnica rotineira de Paraplast e seccionados com 5 μ m de espessura e corados em hematoxilina e eosina (HE) e tricromo de masson. Outra parte do tecido foi colocada para análise de microscopia de fluorescência, para isso, os cortes foram congelados, cortados em Criostato com 7 μ m de espessura, fixados em acetona, contra-corados com Azul de Evans.

RESULTADOS

Durante a infusão, ou seja, quando a agulha do cateter penetra na musculatura cardíaca, pôde ser observado que houve alterações na condutância do impulso cardíaco, contudo após o momento da infusão o traçado torna-se normal.

As células infundidas por esta via encontram-se localizadas principalmente no local da infusão e septo cardíaco. Ocasionalmente na parede lateral do ventrículo direito.

O padrão de distribuição das células em tecido cardíaco esta relacionado principalmente à distribuição do tecido conjuntivo, ou seja, ao contrário da via intracoronariana, por esta via as células estão em maior número em locais no qual há maior concentração de tecido conjuntivo, especialmente em região de epicárdio. Nichos de células mononucleares também são observados.

DISCUSSÃO

Como no resultado, pela via transendocárdica ocorre uma entrega seletiva de células em local no qual foi detectado infarto e também em áreas normais, com auxílio de aparelho que realiza mapeamento cardíaco (NOGA) como relatado por SUZUKI et al (2001), através de análise histológica também foi observado a formação de pequenas agrupamentos de células no local da infusão, por um lado, uma maior quantidade de células em tecido cardíaco é benéfica, pois haveria provavelmente, uma maior formação de vasos e cardiomiócitos, por outro lado um acúmulo de células pode interferir na diferenciação da mesma, uma vez que, a diferenciação celular é influenciada pelo microambiente, citocinas e interação célula nativa e célula transplantada.

A importância da infusão de células por esta via está correlacionada com os infartos denominados de intramurais ou sub-epicardicos, pois, como observado, há uma maior quantidade de células em tecido epicárdico e os nichos de células em interstício celular podem favorecer no restabelecimento do tecido lesionado, apesar de haver uma marcada quantidade de células também em tecido endocárdico. Esta via também é indicada para casos crônicos de doença cardíaca, no qual a liberação de fatores que realizam o recrutamento das células encontram-se em menor quantidade (15).

O menor número de células aderidas por esta via em relação às vias intracoronariana e transendocárdica pode ser explicada devido a entrega seletiva de células que a via transendocárdica promove. A distribuição de células tronco mononucleares está relacionada principalmente com a disposição do tecido conjuntivo no coração, isto porque, ao realizar a infusão, a agulha penetra de

endocárdio a epicárdio, sendo que as mesmas são difundidas em região próxima ao epicárdio e, por realizar infusões dentro do miocárdio, há formação dos nichos celulares. Por ser uma via de entrega seletiva de células, a pouca quantidade de células marcadas em ventrículo, átrio direito e em outros órgãos é explicável, contudo, em casos de doenças crônicas, no qual há diminuta quantidade de sinalizadores para o recrutamento celular, esta é uma via de infusão que deve ser indicada, uma vez que, a entrega de células é seletiva, contudo, como relatado por (STRAUER e KORNOWISK, 2003) e FUCHS et al (2003) foi observada a presença de extra-sístoles no momento da infusão de células.

CONCLUSÃO

Para a infusão de células por via transendocárdica é necessário equipamento para a realização do mapeamento da câmara cardíaca (NOGA) para localização da área infartada e, conseqüentemente, localização da região de infusão de células. Com isso, há um aumento do tempo de cirurgia e do número de pessoas para a realização do procedimento. Com relação à disposição das células em tecido cardíaco, as células estão preferencialmente distribuídas em locais com grande quantidade de tecido conjuntivo, no qual há uma marcada quantidade de células em epicárdio, podendo ser observado áreas no qual há formações de pequenos nichos de células mononucleares.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos Professores da FMVZ/USP: José Roberto Kfoury Jr, Antônio A. C. M. Ribeiro, Francisco H. Blasquez pelo empréstimo dos laboratórios LTIAM, LSCA e Laboratório de Histologia; à Profa. Maria H. A. Larsson por nos auxiliar na realização e avaliação dos exames cardiológicos; Profa. Dra. Christina Maeda Takiya pelo auxílio oferecido no Laboratório de Patologia Celular do Departamento de Histologia e Embriologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ e à FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e Hospital Pró-cardíaco pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Friedenstein, A.J. Gorskaja, J.F.; Kalajina.N.N. Fibroblast Precursor in Normal end Irradiated Mouse. **Hematopoietic Organs**. Experimental Hematology, 4:267-274, 1974.
2. Cardoso, F. P., González, J. H., Ezquerro, E. A. Utilización de células madre para la regeneración miocárdica en la insuficiencia cardíaca. **Revista Española de Cardiología**. v. 56(10): 935-939,2003.

3. Hidemasa, O.; Bradfute, S. B.; Gallardo, T. D.; et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: Homing, differentiation, and fusion after infarction. **PNAS online**. 100(21): 12313-18, 2003.
4. Zatz, M. A Biologia Molecular Contribuindo para a Compreensão e a Prevenção das Doenças Hereditárias. **Ciência e Saúde**. Coletiva. 7 (1):85-99,2002.
5. Orlic, D. The strength of plasticity: stem cells for cardiac repair. **International Journal of Cardiology**, 2004. Disponível em www.elsevier.com/locate/ijcard.
6. Orlic, D. Kajstura, J.; Chiment, S.; et al. Mobilized Bone Marrow Cells Repair the Infarcted Heart, Improving Function and Survival. **PNAS**. 98 (18): 10344-10349, 2001.
7. Dexter, T. M., Spooncer, E., Varga, J., Allen, T. D., Lanotte, M. Stromal cells and diffusible factors in the regulation of haemopoietic cell development, 1983. In: KILLMAN, S. V. A. A., CRONKITE, E. P., MULLER-BERAT, C. N., **Haemopoietic Stem Cells**, A. Benzo Symposium, Munksgaard, Copenhagen, pp. 303-322.
8. Siminiak T, Kurpisz M. Myocardial replacement therapy. **Circulation**. 108(10): 1167-71,2003.
9. Poulson, R.; Alison, M.R.; Forbes, S.J.; Wright, N.A. Adult Stem Cell Plasticity. **Journal of Pathology**. 197:441-456, 2002.
10. Strauer, B.E.; Kornowski, R. Stem Cell Therapy in Perspective. **Circulation**. 107:929-934.
11. Hamano, K.; Li, T.S.; Kobayashi, T.; Hirata, K., et al. Therapeutic Angiogenesis Induced by Local Autologous Bone Marrow Cell Implantation. **Ann. Thorac. Surg**. V. 73: 1210-1215, 2002.
12. Tse, H.F.; Kwong, Y.L.; Chan, J.K.F.; Lo, G.; Ho, C.L.; Lau, C.P. Angiogenesis in Ischaemic Myocardium by Intramyocardial Autologous Bone Marrow Mononuclear Cell Transplantation. **The Lancet**. V. 361:47-49.
13. Fuchs, S.; Satler, Lowell, F; Kornowski, R, et al. Catheter-Based Autologous Bone Marrow Myocardial Injection in No-Option Patients With Advanced Coronary Artery Disease. A Feasibility Study. **J Am Coll Cardiol** 2003;41:1721-4.
14. Suzuki, K.; Murtuza, B.; Suzuki, N.; Smolenski, R.T.; Yacoub, M.H. Intracoronary Infusion of Skeletal Myoblasts Improves Cardiac Function in Doxorubicin-Induced Heart Failure. **Circulation**. V104 (Supl I):I-213-I217, 2001.
15. Perin, E.C.; Dohmann, H. F.R.; Borojevic, R.; et al. Transendocardial, Autologous Bone Marrow Cell Transplantation for Severe, Chronic Ischemic Heart Failure. **Circulation**. 2003;107:2294-2302.

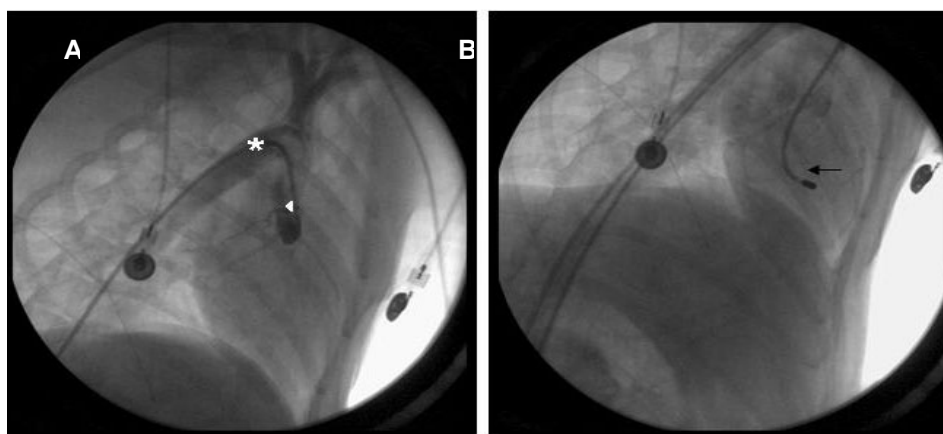


Figura 1. (A) Fluoroscopia demonstrando arco aórtico (*) e região de seio coronário ingurgitados com contraste (♦); (B) presença do cateter Noga (seta dupla) no ventrículo esquerdo.

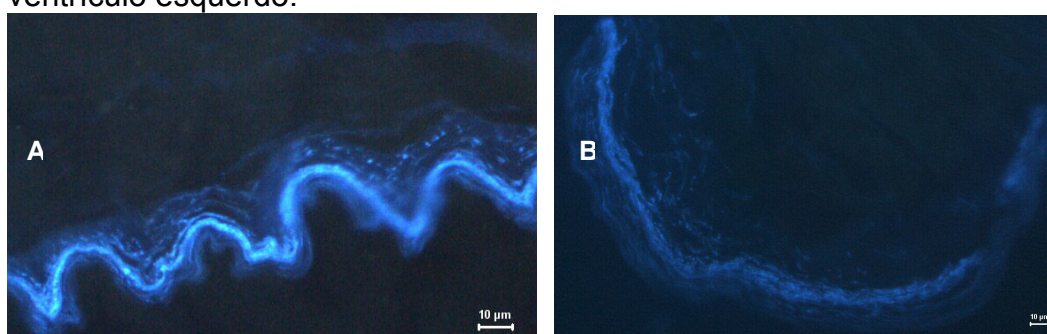


Figura 2. Fotomicrografias de fluorescência no qual podemos observar a presença de células mononucleares em azul, e corados com Hoechst[®], em região de epicárdio (A) e endocárdio (B). Barra 10µm.

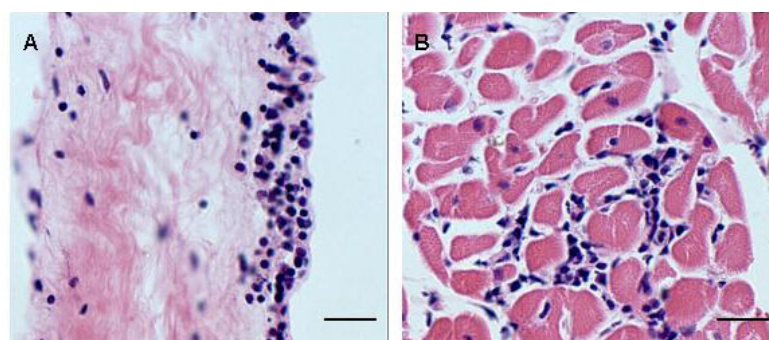


Figura 3. Fotomicrografias de região de epicárdio com a presença de grande quantidade de células mononucleares (A) e em miocárdio podemos observar a formação de nichos celulares (B). Coloração HE. Barras 40µm.

Arquivos Brasileiros de Cardiologia

Artigos Enviados

Avaliação Histológica da Infusão de Células Tronco Mononucleares da Medula Óssea pela Via Transendocárdica	Artigo em Revisão
Enviado em 27/01/2006 - Nº do Artigo: 1152	

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](#)