

**LEONARDO DOS SANTOS**

**EFEITOS DO IMPLANTE DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA-  
ÓSSEA SOBRE A FUNÇÃO CARDÍACA E O REMODELAMENTO DO  
MIOCÁRDIO REMANESCENTE AO INFARTO EM RATOS**

Tese apresentada à Universidade Federal  
de São Paulo para a obtenção do Título  
de Doutor em Ciências pelo programa de  
Pós-Graduação em Cardiologia

São Paulo

2008

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina  
Programa de pós-graduação em Medicina (Cardiologia)

**LEONARDO DOS SANTOS**

**EFEITOS DO IMPLANTE DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA-  
ÓSSEA SOBRE A FUNÇÃO CARDÍACA E O REMODELAMENTO DO  
MIOCÁRDIO REMANESCENTE AO INFARTO EM RATOS**

**Orientador:**

Prof. Dr. Paulo José Ferreira Tucci

**Banca examinadora:**

Prof. Dr. Ângelo Amato Vincenzo de Paola

Prof. Dr. Antônio Carlos Cicogna

Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo

Prof. Dr. José Eduardo Krieger

**Suplentes:**

Profa. Dra. Luciana Venturini Rossoni

Prof. Dr. Antonio Carlos de Camargo Carvalho

***DEDICATÓRIA***

Este trabalho é dedicado

aos meus pais Marcos e Márcia

*pelo amor e dedicação, e pela confiança em todas as minhas escolhas*

e à minha companheira Letícia,

*“Na força dessa beleza é que eu sinto firmeza e paz  
Por isso nunca desapareça, nunca me esqueça, e eu não te esqueço jamais”*

*(Trecho de Dona da minha cabeça - Geraldo Azevedo)*

**AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Paulo Tucci, pelo acolhimento em seu laboratório, paciência e orientação científica (também ética e filosófica!). Certamente, seu caráter e sua paixão pela pesquisa ajudaram a moldar minha postura nestes anos.

Aos Drs. Antônio Carvalho, Ângelo de Paola, e Valdir Moisés, incentivadores da pesquisa básica na cardiologia da UNIFESP.

Às secretárias da Cardiologia: Edileuza, Roseli e Maria Christina, e da Fisiologia Cardiorrespiratória: Kátia Monteiro, pela atenção e dedicação durante meu doutoramento.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia e Fisiopatologia Cardíaca. Em especial a Alexandra e Rodrigo pela direta contribuição a este trabalho. Desculpem-me por não citar todos os nomes, desisti da lista quando chegou aos 20! Todos vocês, junto com o nosso grandioso Ednei (técnico/mestrando/amigo) me auxiliaram imensamente na realização deste e de muitos outros trabalhos, churrascos, festas, e afins. Aos que já saíram e aos que ainda lá estão, obrigado, sobretudo, pela amizade adquirida.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Krieger e Dra. Giovana Gonçalves, pelas discussões, cooperações e pelo auxílio na manipulação das células de medula-óssea, assim como Gustavo, Juliana, Elena e Márcio, colegas do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do INCOR, pelo auxílio na realização das análises histológicas e de PCR.

Aos colegas pós-graduandos do Laboratório de Fisiologia Vascular do ICB/USP, por me acolherem e auxiliarem nos experimentos de Western blotting. Pelo reforço da amizade dos que já conhecia e pela aquisição dos que conheci.

O espírito do cientista deve ser alimentado a toda hora. Mas existe um momento, lá atrás, quando ele foi despertado. São três os responsáveis por esse meu despertar: Junto com o Prof. Pardal (dos gibis), vocês, meus queridos Prof. Dalton Vassallo e Prof<sup>a</sup>. Luciana Rossoni, que, sem nenhuma chance de erro ( $p = \text{zero!}$ ), me inspiraram durante toda graduação e iniciação científica, e continuam, ainda hoje, fazendo parte do meu jeito de indagar e buscar respostas às questões da fisiologia e do corpo humano.

Aos amigos paulistas Laís, Fausto, Maria Alice, Amaral, Rodrigo e tantos outros, por todos os bons momentos, discussões e “causos”, queijos e vinhos.

Aos grandes amigos Silvio e Fabiano, pelo bom humor, sinceridade e companheirismo. Fomos fundadores da já extinta república “*de los tres amigos*” durante minha chegada em Sampa. A vocês, minha eterna amizade.

Aos colegas e grandes amigos de Vitória (ES), das salas de aulas, dos laboratórios, dos bares, e das festas, pelos anos de convivência, aprendizado e diversão.

Ao meu querido irmão Leandro, ao meu mais que amigo Charlie Rees e a toda minha família, pelo apoio, carinho e confiança, mesmo diante de minhas escolhas profissionais nada ortodoxas: “Médico de ratos?”

Às queridas famílias Tabachi, Silva, e seus “agregados”, pelo carinho e consideração, que durante as rápidas folgas no Espírito Santo, ajudavam a relaxar e recuperar as forças para o retorno ao trabalho.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro durante a realização deste trabalho.

Aos animais de experimentação, meu eterno respeito e gratidão!

A todos os amigos cujas importâncias e nomes não caberiam nessas páginas. Vocês que não foram citados estão bem guardados em minha mente!

E a Deus, nome dado ao motivo de tudo, origem primeira e destino último das coisas que sou e sinto.



*“A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro.”*

Albert Einstein (1879-1955)

# Índice

<b>Abreviaturas e símbolos .....</b>	<b>1</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>3</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>7</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
1.1. Infarto do miocárdio.....	11
1.2. Fisiopatologia .....	12
1.3. Terapia celular.....	13
1.4. Objeto de estudo, problematização e formulação da hipótese .....	15
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
2.1. Objetivo geral .....	18
2.2. Objetivos específicos .....	18
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>20</b>
3.1. Animais.....	20
3.2. Produção do infarto do miocárdio .....	21
3.4. Manipulação das células de medula-óssea .....	22
3.5. Eletrocardiograma .....	24
3.6. Estudo morfo-funcional por ecocardiografia Doppler .....	24
3.7. Estudo hemodinâmico da função cardíaca .....	26
3.8. Estudo da função mecânica dos músculos papilares .....	28
3.9. Determinação das massas cardíacas e teor de água no pulmão .....	31
3.10. Western blotting das proteínas relacionadas à cinética do cálcio.....	31
3.11. Estudos morfológicos por histologia.....	33
3.12. Análise estatística .....	35
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>38</b>
4.1. Massa corpórea dos animais .....	38
4.2. Mortalidade perioperatória e durante o seguimento do estudo.....	39
4.3. Isolamento das células e procedimento de transplante .....	39
4.4. Detecção das células mononucleares transplantadas .....	41
4.5. Avaliação por ecocardiografia Doppler antes da terapia.....	42
4.6. Determinação das massas cardíacas e teor de água no pulmão .....	46
4.7. Avaliação por ecocardiografia Doppler após terapia.....	47
4.8. Estudo hemodinâmico da função cardíaca .....	52
4.9. Estudo <i>in vitro</i> da mecânica do miocárdio remanescente ao infarto.....	61
4.10. Western blotting das proteínas relacionadas à cinética do cálcio.....	71
4.11. Estudos morfológicos por histologia.....	75

<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>83</b>
5.1. Aspectos metodológicos .....	83
5.2. Avaliação de controle ou pré-terapia.....	92
5.3. Avaliação terapêutica sobre a função cardíaca global.....	93
5.4. Avaliação terapêutica sobre o miocárdio remoto ao IM .....	104
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>116</b>
6.1. Conclusões específicas.....	116
6.2. Conclusão geral .....	117
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>119</b>
<b>Anexo 1 .....</b>	<b>139</b>
<b>Anexo 2 .....</b>	<b>143</b>

## Abreviaturas e símbolos

AdVE	Área diastólica do ventrículo esquerdo
AS	Área de secção transversa
AsVE	Área sistólica do ventrículo esquerdo
BMC	Células de medula-óssea
DC	Débito cardíaco
DMEM	Meio de cultura ( <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> )
dP/dt	Primeira derivada temporal da pressão intraventricular
dT/dt	Primeira derivada temporal da tensão
ECO	Ecocardiografia Doppler
FC	Frequência cardíaca
FEAT	Fração de encurtamento da área transversa
FKBP	Proteínas de ligação do <i>FK</i>
IC	Insuficiência cardíaca
IM	Infarto do Miocárdio
$L_{máx}$	Comprimento ótimo
MMP	Metaloproteinase de matriz
MO	Medula-óssea
NCX	Trocador $Na^+/Ca^{+2}$
NKA	$Na^+/K^+$ -ATPase
PAS	Ácido periódico de Schiff
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	Reação de polimerização de cadeia ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PDfVE	Pressão diastólica final do ventrículo esquerdo
PLB	Fosfolamban
PLB-Ser <sup>16</sup>	Fosfolamban fosforilado na serina <sup>16</sup>
PSVE	Pressão sistólica do ventrículo esquerdo
RNAm	RNA mensageiro
Sry	Região determinante do sexo ( <i>sex-determining region Y</i> )
TD	Tensão isométrica desenvolvida
TGF- $\beta$ 1	Fator de crescimento e transformação $\beta$ 1
TIMP	Inibidor de metaloproteinase
TPT	Tempo para atingir o pico da tensão
TR	Tensão isométrica de repouso ou diastólica
TR50%	Tempo decorrido para relaxar 50%
TS	Trabalho sistólico
TTC	Cloreto de trifeniltetrazólio
VD	Ventrículo direito
VE	Ventrículo esquerdo
VSE	Volume sistólico ejetado

**RESUMO**

## Resumo

### EFEITOS DO IMPLANTE DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA-ÓSSEA SOBRE A FUNÇÃO CARDÍACA E O REMODELAMENTO DO MIOCÁRDIO REMANESCENTE AO INFARTO EM RATOS

O Infarto do Miocárdio (IM) é uma das principais causas de morte súbita, insuficiência cardíaca (IC) e perda da qualidade de vida. Como o coração tem capacidade limitada de regeneração, terapias como o implante de células-tronco vem sendo desenvolvidas. O objetivo deste trabalho foi estudar o implante de células mononucleares derivadas da medula-óssea no IM experimental em ratos, avaliando seus efeitos sobre o remodelamento miocárdico, função ventricular global e contratilidade do miocárdio remoto ao infarto. Para tanto, utilizou-se injeção intramiocárdica de células da medula-óssea (BMC) de ratos machos Lewis-*inbred*, 48 horas após oclusão da artéria coronária interventricular anterior em ratos da mesma linhagem. Após seis semanas, foi analisada função cardíaca global *in vivo* por ecocardiografia Doppler e avaliação hemodinâmica, seguida do estudo *in vitro* da mecânica contrátil do miocárdio remanescente representado pelo músculo papilar isolado. Posteriormente, realizaram-se estudos histopatológicos dos processos de fibrose intersticial (coloração com *picrossirius red*), hipertrofia (volume nuclear do miócito) e densidade capilar (coloração com ácido periódico de Schiff); e avaliação por Western blotting de proteínas envolvidas na contração no tecido remoto ao infarto: Ca<sup>2+</sup>-ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA2), fosfolamban total (PLB) e fosforilado (PLB-Ser<sup>16</sup>), trocador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> (NCX), e isoformas  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (NKA). Os ratos foram distribuídos em infartos moderados (30-39% do VE = mIM) e grandes ( $\geq 40\%$  do VE = IM), tratados (grupos mIM+BMC e IM+BMC) ou não tratados (grupos mIM e IM), e comparados ao grupo sem infarto nem terapia (SHAM).  $P < 0,05$  foi considerado significativo. A mortalidade durante os procedimentos ou acompanhamento não foi diferente entre os grupos. A análise por PCR identificou cromossomo Y de células de macho implantadas em amostras coletadas de corações de fêmeas desde dez minutos após implante até seis semanas, com intensidade decrescente. Após seis semanas o tamanho do infarto

foi discretamente menor em IM+BMC ( $38 \pm 1\%$ ) que em IM ( $44 \pm 1\%$ ), e também em mIM+BMC ( $31 \pm 1\%$ ) comparado aos mIM ( $34 \pm 1\%$  do VE). IM+BMC cursou com menor dilatação ventricular ( $45 \pm 10\%$ ) que IM ( $86 \pm 7\%$ ) com melhora da fração de encurtamento do VE em  $20 \pm 9\%$  e menor incidência de hipertensão pulmonar, enquanto mIM e mIM+BMC demonstraram comportamento semelhante. O aumento na pressão diastólica final (PDf) somente detectado em IM ( $16 \pm 2$  mm Hg) assim como a depressão da  $+dP/dt_{\text{máx}}$  ( $7.727 \pm 367$  mm Hg/s) foram prevenidos em IM+BMC ( $5 \pm 2$  mm Hg e  $9.035 \pm 345$  mm Hg/s). Os demais parâmetros hemodinâmicos analisados sob condições basais não foram diferentes do grupo SHAM. Entretanto, a sobrecarga pressórica súbita reduziu sensivelmente o volume ejetado em mIM ( $-46 \pm 4\%$ ) e IM ( $-63 \pm 4\%$ ), mas apenas discretamente em mIM+BMC ( $-12 \pm 6\%$ ) e IM+BMC ( $-20 \pm 3\%$ ) semelhante aos  $-9 \pm 4\%$  de SHAM. A correlação estabelecida entre aumento na pós-carga e geração de trabalho sistólico mostrou-se positiva nos SHAM (inclinação média de  $0,75 \pm 0,09$ ) e nos tratados mIM+BMC ( $0,74 \pm 0,12$ ) e IM+BMC ( $0,52 \pm 0,05$ ), mas nitidamente negativa nos grupos infartados sem terapia (mIM: inclinação =  $-0,38 \pm 0,05$ ; e IM:  $-0,97 \pm 0,1$ ). Pelo estudo do músculo papilar, a tensão desenvolvida ( $\text{g}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) foi deprimida em IM ( $2,4 \pm 0,2$ ) e mIM ( $3,8 \pm 0,4$ ) em relação a mIM+BMC ( $5,5 \pm 0,5$ ), IM+BMC ( $5,6 \pm 0,4$ ) e SHAM ( $6,1 \pm 0,3$ ). Ademais, os coeficientes de inclinação das retas da relação estiramento vs. tensão desenvolvida ( $\text{g}\cdot\text{mm}^{-2} / \%$  do comprimento ótimo) estavam deprimidos nos mIM ( $0,19 \pm 0,01$ ) e IM ( $0,13 \pm 0,02$ ) comparados ao SHAM ( $0,29 \pm 0,02$ ), e normais em mIM+BMC ( $0,25 \pm 0,02$ ) e IM+BMC ( $0,26 \pm 0,03$ ) demonstrando integridade do mecanismo de Frank-Starling no músculo remanescente. Os prejuízos, em mIM e IM, da potenciação pós-pausa de de estímulos, manobra indicadora da integridade da cinética do cálcio no miócito, foram parcialmente prevenidos por BMC. As diminuições, identificadas em mIM e IM, da expressão protéica da SERCA2 ( $66 \pm 7$  e  $54 \pm 6\%$  do SHAM), PLB ( $72 \pm 4$  e  $52 \pm 9\%$ ) e PLB-Ser<sup>16</sup> ( $71 \pm 6$  e  $35 \pm 10\%$ ) foram atenuadas em mIM+BMC e IM+BMC (SERCA2:  $84 \pm 11$  e  $94 \pm 10\%$ , PLB:  $83 \pm 7$  e  $89 \pm 7\%$ , e PLB-Ser<sup>16</sup>:  $104 \pm 14$  e  $90 \pm 8\%$ ). O NCX foi superexpresso em IM ( $198 \pm 29$  % do SHAM) e normal nos demais grupos, e enquanto  $\alpha_1$ -NKA não foi diferente em nenhum grupo, a depressão na quantidade de  $\alpha_2$ -NKA (mIM:  $47 \pm 10$  e IM:  $35 \pm 10\%$ ) não foi significativamente prevenida com BMC (mIM+BMC:  $61 \pm 10$  e IM+BMC:  $63 \pm 16\%$  do SHAM). A análise histopatológica mostrou aumento significativo do volume nuclear ( $\mu\text{m}^3$ ) no

miocárdio remodelado de mIM ( $188 \pm 7$ ) e IM ( $219 \pm 9$ ) em comparação ao SHAM ( $129 \pm 8$ ), e prevenção parcial de hipertrofia miocárdica em mIM+BMC ( $147 \pm 8$ ) e IM+BMC ( $165 \pm 8$ ). Já o teor de colágeno intersticial mostrou-se elevado de forma significativa somente nos grandes infartos ( $2,4 \pm 0,1$  % da área analisada), mas aparentemente normal em IM+BMC ( $1,9 \pm 0,06$  %) comparados ao SHAM ( $1,5 \pm 0,1$  %). Na zona de transição entre o infarto e o miocárdio adjacente, além de BMC promover aumento da densidade capilar em mIM+BMC ( $2.805 \pm 109$  vs. mIM:  $1.933 \pm 183$  capilares/mm<sup>2</sup>) e IM+BMC ( $2.702 \pm 81$  vs. IM:  $1.981 \pm 115$ ), também houve aumento na relação capilar/cardiomiócito (mIM+BMC:  $1,68 \pm 0,06$  vs. mIM:  $1,13 \pm 0,02$ ; e IM+BMC:  $1,50 \pm 0,06$  vs. IM:  $1,17 \pm 0,04$ ). A densidade capilar no miocárdio remoto ao infarto mostrou-se significativamente diminuída nos infartos sem terapia (mIM:  $2.924 \pm 120$ ; e IM:  $2.454 \pm 90$  capilares/mm<sup>2</sup>) em relação ao SHAM ( $3.691 \pm 248$ ), mas praticamente preservada nos tratados (mIM+BMC:  $3.379 \pm 103$ ; e IM+BMC:  $3.239 \pm 129$ ); e também relação entre capilar/cardiomiócito menor em mIM ( $1,32 \pm 0,05$  capilar/cardiomiócito) e IM ( $1,28 \pm 0,04$ ) e equivalentes ao SHAM ( $1,71 \pm 0,10$ ) nos grupos mIM+BMC ( $1,57 \pm 0,06$ ) e IM+BMC ( $1,64 \pm 0,02$ ). Finalmente, conclui-se que a terapia com BMC restringe a repercussão pós-infarto observada tanto na função cardíaca global e desempenho ventricular, quanto nos parâmetros de remodelamento estrutural do miocárdio remanescente relacionados à hipertrofia, fibrose e vascularização. Ademais, reduz as alterações moleculares das proteínas relacionadas à cinética intracelular do cálcio preservando, dessa maneira, a função contrátil do miocárdio remoto ao infarto e implante celular. Parece que estes benefícios ocorrem em conjunto com a diminuição da extensão relativa do infarto do miocárdio sem, entretanto, manter dependência a este fenômeno, visto que a maioria dos parâmetros avaliados foi mais eficiente no grupo IM+BMC do que em IM e mesmo em mIM. A reunião destes dados permite sugerir que a terapia com células mononucleares derivadas de medula-óssea pode agir não só sobre o infarto e zona de transição, mas também na melhora da função do miocárdio remoto, provavelmente por ações parácrinas e/ou endócrinas também mediadoras do processo de remodelamento tecidual e celular.

**Palavras-chave:** Infarto do miocárdio, Células-tronco/transplante, Função ventricular, Hemodinâmica, Contração miocárdica, Ratos.



***ABSTRACT***

## Abstract

### EFFECTS OF BONE MARROW-DERIVED CELL TRANSPLANTATION ON THE CARDIAC FUNCTION AND REMODELING OF MYOCARDIUM REMNANT TO INFARTION IN RATS

Myocardium infarction is a major cause of sudden death, heart failure with impaired quality of life. Since the heart exhibits limited regenerative capability, alternative interventions as the stem cell therapy have been developed. Our aim was to study the transplantation of bone marrow-derived mononuclear cells (BMC) in the myocardial infarction in rats, evaluating its effects on the global cardiac function, remodeling and contractility of remnant myocardium. The BMC extracted from male Lewis-inbred rats were intramyocardially injected into the border zone of infarct, 48 hours after coronary occlusion in female rats. After six weeks the *in vivo* global cardiac function was analyzed by Doppler echocardiography and hemodynamics, and the *in vitro* mechanics of the remnant myocardium by the isolated papillary muscle study. Thereafter, the following histopathological evaluations were performed: interstitial fibrosis (picrossirius red staining), hypertrophy (myocyte nuclear volume) and capillary density (PAS staining); and myocardium content of calcium handling proteins by Western blotting: sarco-endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA2), total (PLB) and serine<sup>16</sup> phosphorylated phospholamban (PLB-Ser<sup>16</sup>), sarcolemmal  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger (NCX), and  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$  isoforms of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (NKA). Rats were distributed in moderate (30-39% of left ventricle = mIM) and large MI ( $\geq 40\%$  of left ventricle = IM), and treated with BMC (mIM+BMC and IM+BMC groups) or saline injection (mIM and IM groups), compared to sham-operated and placebo-treated group (SHAM).  $P < 0.05$  was considered for statistical significance. Mortality during surgical procedures and follow-up was not different among the groups. The polymerase chain reaction identified Y chromosome of implanted male cells in samples collected from female hearts 10 minutes, 2 days, 1 and 6 weeks following therapy, with decreasing intensity. After six weeks, infarct size was slightly smaller in IM+BMC ( $38 \pm 1\%$  of left ventricle) than in IM ( $44 \pm 1\%$ ), and also in mIM+BMC ( $31 \pm 1\%$ ) compared to mIM ( $34 \pm 1\%$ ). IM+BMC exhibited less

ventricular dilatation ( $45 \pm 10\%$ ) than IM ( $86 \pm 7\%$ ) with improved fractional ventricular shortening by  $20 \pm 9\%$ , while mIM and mIM+BMC were similar. Increased end-diastolic pressure (PDF) in IM ( $16 \pm 2$  mm Hg) and depressed rate of pressure raise ( $7,727 \pm 367$  mm Hg/s) were totally prevented by BMC ( $5 \pm 2$  mm Hg e  $9,035 \pm 345$  mm Hg/s). Under basal conditions, ejective parameters were not different to SHAM. Notwithstanding, sudden pressure overload expressively reduced stroke volume in mIM ( $-46 \pm 4\%$ ) and IM ( $-63 \pm 4\%$ ) but just minimally in mIM+BMC ( $-12 \pm 6\%$ ) and IM+BMC ( $-20 \pm 3\%$ ) similar to SHAM ( $-9 \pm 4\%$ ). Correlations between afterload stress and stroke work generation were positive in SHAM (mean slope:  $0.75 \pm 0.09$ ) and treated mIM+BMC ( $0.74 \pm 0.12$ ) and IM+BMC ( $0.52 \pm 0.05$ ), but were negative in infarcted untreated groups (mIM:  $-0.38 \pm 0.05$ ; and IM:  $-0.97 \pm 0.1$ ). On the papillary muscles study, developed tension was impaired in IM ( $2.4 \pm 0.2$  g.mm<sup>-2</sup>) and mIM ( $3.8 \pm 0.4$ ) and preserved in mIM+BMC ( $5.5 \pm 0.5$ ) and IM+BMC ( $5.6 \pm 0.4$ ) compared to SHAM ( $6.1 \pm 0.3$ ). In addition, slope of the length-tension relation was depressed in mIM ( $0.19 \pm 0.01$ ) and IM ( $0.13 \pm 0.02$ ) in comparison to SHAM ( $0.29 \pm 0.02$ ), and normal in mIM+BMC ( $0.25 \pm 0.02$ ) and IM+BMC ( $0.26 \pm 0.03$ ) showing preservation of Frank-Starling relationship. The impaired post-rest potentiation in mIM and IM (denoting damaged calcium handling) were partially but significantly prevented by BMC. The decrement, identified in mIM and IM, on the protein content of SERCA2 ( $66 \pm 7$  and  $54 \pm 6\%$  of SHAM), PLB ( $72 \pm 4$  and  $52 \pm 9\%$ ) and PLB-Ser<sup>16</sup> ( $71 \pm 6$  and  $35 \pm 10\%$ ), were attenuated in mIM+BMC and IM+BMC (SERCA2:  $84 \pm 11$  and  $94 \pm 10\%$ , PLB:  $83 \pm 7$  and  $89 \pm 7\%$ , PLB-Ser<sup>16</sup>:  $104 \pm 14$  and  $90 \pm 8\%$ ). NCX was over-expressed in IM ( $198 \pm 29$  % of SHAM) but normal in BMC groups, and while  $\alpha_1$ -NKA remained unchanged in all groups, diminished content of  $\alpha_2$ -NKA (mIM:  $47 \pm 10$  and IM:  $35 \pm 10\%$ ) was not prevented by BMC (mIM+BMC:  $61 \pm 10$  and IM+BMC:  $63 \pm 16\%$  of SHAM). Histological analysis showed significant increase of nuclear volume ( $\mu\text{m}^3$ ) on remodeled myocardium of mIM ( $188 \pm 7$ ) and IM ( $219 \pm 9$ ) in comparison to SHAM ( $129 \pm 8$ ), but partial prevention of the myocyte hypertrophy in mIM+BMC ( $147 \pm 8$ ) and IM+BMC ( $165 \pm 8$ ). Interstitial collagen was significantly increased only in IM ( $2.4 \pm 0.1$  % of analyzed area), but apparently normal in IM+BMC ( $1.9 \pm 0.06$  %) compared to SHAM ( $1.5 \pm 0.1$  %). In the border zone, besides promoting enhanced capillary density in mIM+BMC ( $2,805 \pm 109$  vs. mIM:  $1,933 \pm 183$  capillaries/mm<sup>2</sup>) and IM+BMC ( $2,702 \pm 81$  vs. IM:  $1,981 \pm 115$ ), cell therapy also increased

capillaries/myocyte ratio (mIM+BMC:  $1.68 \pm 0.06$  vs. mIM:  $1.13 \pm 0.02$ ; and IM+BMC:  $1.50 \pm 0.06$  vs. IM:  $1.17 \pm 0.04$ ). In the remodeled myocardium remote to infarct, capillary density was decreased on infarcted untreated groups (mIM:  $2,924 \pm 120$ ; and IM:  $2,454 \pm 90$  capillaries/mm<sup>2</sup>) in relation to SHAM ( $3,691 \pm 248$ ), but almost totally preserved in mIM+BMC ( $3,379 \pm 103$ ) and IM+BMC ( $3,239 \pm 129$ ); capillaries/myocyte ratio was smaller in mIM ( $1.32 \pm 0.05$  capillaries/myocyte) and IM ( $1.28 \pm 0.04$ ), but equivalent to SHAM ( $1.71 \pm 0.10$ ) in mIM+BMC ( $1.57 \pm 0.06$ ) and IM+BMC ( $1.64 \pm 0.02$ ). Thus, the data demonstrates that BMC restrained the post-infarction repercussions concerning global cardiac function and ventricular performance, as well as the structural remodeling in remnant myocardium related to hypertrophy, fibrosis and microvasculature. Furthermore, this therapy reduced the calcium-handling protein changes, thus preserving the contractile behavior of myocardium remote to infarct and cell injection sites. The obtained results suggests that the bone marrow-derived mononuclear cell therapy may act beyond the infarct and border zones, also improving the function of remote tissue, modulating interstitial and cellular remodeling probably throughout paracrine and/or endocrine pathways.

**Key-words:** Myocardial Infarction, Stem cell/transplantation, Ventricular function, Myocardial contraction, Rats.

## **1. INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Infarto do miocárdio

A doença cardíaca isquêmica corresponde à maior parte das mortes por causas cardiovasculares atualmente no Brasil (Ministério da Saúde, 2008). É sabidamente uma doença complexa e multifatorial, que leva a insuficiência cardíaca congestiva, bem como perda da qualidade de vida. Por isso, o infarto do miocárdio (IM) e a insuficiência cardíaca (IC) têm sido considerados como patologias de significantes implicações sociais (Kannel, 2000; Lee *et al.*, 2004), sendo alvo constante de investigações para melhor conhecimento da fisiopatologia e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes.

Apesar dos avanços consideráveis tanto no diagnóstico e prevenção, quanto no tratamento da doença cardíaca isquêmica, a disfunção contrátil e IC conseqüentes ao infarto continuam sendo problemas de saúde em nível mundial e com grande ônus econômico principalmente porque, com o envelhecimento gradual da população, vêm atingindo atualmente a faixa etária economicamente produtiva (Kannel, 2000; Lee *et al.*, 2004). Com o objetivo de restabelecer o fluxo sanguíneo para região miocárdica acometida pela isquemia, o tratamento do infarto agudo do miocárdio é basicamente suportado pela desobstrução coronariana (farmacológica ou cirúrgica) ou composição de anastomoses arteriais. Todavia, em uma parcela considerável dos casos, essas técnicas podem apresentar menor grau de eficiência, cursando muitas vezes com reestenoses e outras complicações (Abbate *et al.*, 2007).

## 1.2. Fisiopatologia

O IM é uma injúria irreversível resultante de isquemia prolongada, conseqüente à oclusão total ou parcial de uma ou mais artérias coronárias. A interrupção do fluxo sanguíneo para o tecido cardíaco dá início a uma série de eventos que culminam na morte dos cardiomiócitos que, gradualmente, são substituídos por fibrose de reparação (Fishbein *et al.*, 1978; Pfeffer *et al.*, 1979). Com a perda de miocárdio contrátil, se inicia um ciclo vicioso de sobrecarga no ventrículo esquerdo (VE) com deterioração da função de bomba e conseqüente progressão para IC (Francis *et al.*, 2001). A oclusão cirúrgica da artéria coronária em animais de experimentação como o rato é um modelo bastante útil e muito freqüente em estudos de fisiopatologia e terapêutica, pois sua evolução para IC se assemelha em muitos aspectos a do infarto observado no homem (Fishbein *et al.*, 1978; Hasenfuss, 1998; Francis *et al.*, 2001). Ademais, os ratos apresentam a vantagem de não apresentarem numerosa circulação colateral, o que permite a ocorrência de amplos infartos transmuralis pela oclusão de um ramo coronário epicárdico (Johns & Olson, 1954; Spadaro *et al.*, 1980).

Devido à necrose isquêmica, na fase aguda do IM, tanto no homem quanto no animal de experimentação, ocorre uma resposta inflamatória aguda com infiltração leucocitária, fagocitose das células necróticas e reabsorção dos componentes celulares e da matriz extracelular comprometida, configurando o início do processo de reparação tecidual (Frangogiannis *et al.*, 2002). A partir desse período, incide a deposição dos componentes da nova matriz extracelular, principalmente o colágeno, no tecido infartado e na zona de transição para o tecido viável culminando na formação da cicatriz do infarto (Anversa *et al.*, 1993; Sun *et al.*, 2000).

Com a sobrecarga do tecido remanescente, o processo inflamatório crônico, e a participação de fatores neuro-humorais presentes no pós-IM, dá-se início ao remodelamento cardíaco. Este é definido como o conjunto de modificações gênicas, moleculares, celulares e intersticiais que ocorrem nos tecidos cardíacos e podem se expressar clinicamente por alterações do tamanho, forma e função deste órgão (Mittmann *et al.*, 1998; Swynghedauw, 1999). No que se refere ao remodelamento do miocárdio sobrevivente, ocorrem alterações na estrutura, forma e função dos cardiomiócitos (hipertrofia e depressão da contração e do relaxamento), da matriz extracelular (fibrose intersticial e perivascular) e dos vasos sanguíneos (redução da

capilaridade, hipertrofia da musculatura lisa, disfunção vascular). Essas alterações, embora sejam algumas vezes consideradas como mecanismos compensatórios, na sua progressão tornam-se substrato da disfunção ventricular, dos sintomas de IC e das mortes relacionadas a essa doença (Mittmann *et al.*, 1998; Swynghedauw, 1999).

### **1.3. Terapia celular**

Inúmeras abordagens terapêuticas foram desenvolvidas para modular ou interferir nas diversas fases e aspectos que envolvem o remodelamento e disfunção ventricular, com sucessos consideráveis na melhora da função cardíaca, redução dos sintomas, melhora da qualidade de vida e aumento da sobrevida. Entretanto, por não existirem medicamentos ou procedimentos capazes de reparar ou substituir a cicatriz fibrótica por tecido contrátil, esforços vêm ocorrendo nos últimos anos para se determinar tratamentos que atuem no campo da reparação e regeneração cardíacas.

Desde a década de 90 estão sendo apontadas novas estratégias em nível celular e gênico para o reparo tecidual do coração acometido (Chien, 1993; Dzau *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1998). No presente trabalho tomaremos como objeto de estudo e discussão, a terapia celular.

Estudos demonstraram a existência de células no próprio coração capazes de se dividir e regenerar o tecido miocárdio (Beltrami *et al.*, 2003; Urbanek *et al.*, 2005; Anversa *et al.*, 2006), e também mobilização de células progenitoras a partir da medula-óssea para corrente sanguínea e para o local de reparação tecidual após injúria (Orlic *et al.*, 2001b; Fukuda & Fujita, 2005; Fukuhara *et al.*, 2005). Todavia, nenhum desses eventos, isoladamente, parece ser eficiente em recuperar o tecido perdido e a função cardíaca, sem que se utilize alguma intervenção coadjuvante. Ainda são necessários maiores avanços no conhecimento destes processos para melhor determinar suas utilidades. Dessa maneira, devido à limitada capacidade auto-regenerativa do coração, e ao transplante cardíaco ser uma opção terapêutica somente indicada em fases avançadas, um método alternativo como o do implante de células progenitoras ou células-tronco surgiu como novo e importante alvo de estudos no fim da década de 90 e início dos anos 2000 (Leor *et al.*, 1997; Taylor *et al.*, 1998; Orlic *et al.*, 2001a; Reffelmann & Kloner, 2003). Tanto que existem registros de terapia celular em estudos experimentais e clínicos envolvendo diversas



doenças cardíacas além do infarto agudo do miocárdio, como a cardiopatia chagásica (Soares *et al.*, 2004; Vilas-Boas *et al.*, 2004), cardiopatia diabética (Nagaya *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2008a), e cardiopatias induzidas por antraciclinas (Agbulut *et al.*, 2003) ou por isoproterenol (Li *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008b).

Nesse aspecto, o uso de vários tipos de células não cardíacas para implante no miocárdio danificado tem sido foco de pesquisas com variadas, mas não excludentes, finalidades terapêuticas: limitar a isquemia e necrose, repovoar o tecido perdido, aumentar a vascularização, diminuir o processo inflamatório, a apoptose e a fibrose no infarto e na zona de transição, e finalmente preservar ou restaurar a função cardíaca (Reffellmann & Kloner, 2003; Segers & Lee, 2008).

Os primeiros resultados positivos em testes experimentais com células precursoras de músculo (Marelli *et al.*, 1992; Murry *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 1998) e posteriormente com células derivadas de medula-óssea (Orlic *et al.*, 2001a), estimularam a composição de ensaios clínicos com transplante autólogo de células no IM (Assmus *et al.*, 2002; Strauer *et al.*, 2002; Herreros *et al.*, 2003; Menasché *et al.*, 2003). A partir de dados sugestivos de segurança e de relativo benefício desta nova terapia, grandes estudos clínicos vêm sendo realizados ao longo dos últimos anos (Wollert & Drexler, 2006; Charwat *et al.*, 2008; Wollert, 2008). Assim com nos estudos experimentais, a análise sistemática dos resultados obtidos nesses diversos estudos clínicos indica que são variados, e até controversos em alguns pontos, na dependência do tipo ou subpopulação de célula utilizada, da etiologia da cardiopatia, do momento na história natural que a doença foi abordada, assim como o mecanismo postulado pelo qual essa terapia se mostra benéfica. O que parece ocorrer é que, assim como proposto em revisões críticas sobre o assunto, a transição entre os resultados experimentais e a utilização em testes clínicos foi provavelmente inadequada e os mecanismos exatos e as potenciais complicações ainda permanecem sob investigação, ocorrendo um desacordo entre o que se estuda experimentalmente e se utiliza na pesquisa clínica (Chien, 2006; Murry *et al.*, 2006; Rosenzweig, 2006).

A terapia celular envolve principalmente a célula-tronco, uma célula indiferenciada, capaz de se auto-replicar e originar células dos diversos tecidos do indivíduo adulto. As células-tronco podem estar presentes no embrião e nos tecidos adultos, como por exemplo, na medula-óssea (MO). O aspirado de MO, uma das fontes mais utilizadas em pesquisas experimentais e clínicas, contém basicamente

dois tipos de células precursoras: as células da linhagem hematopoiética (células-tronco hematopoiéticas), e as células do estroma (células-tronco mesenquimais), e tem a capacidade de se diferenciar em vários tipos não sangüíneos, como músculo, cartilagem, osso, gordura e neurônios (Jiang *et al.*, 2002; Segers & Lee, 2008). Tanto em conjunto, quanto a seleção dos tipos ou subpopulações delas têm demonstrado benefícios como terapia no IM, com particulares referências aos mecanismos de ação propostos (Wollert & Drexler, 2006; Segers & Lee, 2008).

Com o transplante autólogo das células-tronco de MO, além do potencial regenerativo, esse procedimento ultrapassa problemas de rejeição imunológica. Além destes pontos, postula-se também que as células de MO possuam capacidade de produzir e secretar fatores que auxiliariam no recrutamento de novas células-tronco do próprio indivíduo, e/ou ainda, fatores que influenciariam positivamente no microambiente onde se fixaram (Chien, 2006; Murry *et al.*, 2006; Ebelt *et al.*, 2007; Novotny *et al.*, 2008). Os estudos clínicos, em sua maioria, utilizaram a fração mononuclear do extrato da MO, que pode ser separado e implantado em poucas horas, sem necessidade de passagens em cultura celular, embora existam autores que testaram populações selecionadas dessas células (Segers & Lee, 2008; Wollert, 2008).

#### **1.4. Objeto de estudo, problematização e formulação da hipótese**

Independente do uso, isoladamente ou em conjunto, de células-tronco hematopoiéticas ou mesenquimais derivadas da medula-óssea, os benefícios dessa terapia no coração infartado obtidos nos estudos experimentais abrangem vários parâmetros funcionais. São demonstrados resultados de melhora da função cardíaca tanto *in vivo*, por ecocardiografia (Nagaya *et al.*, 2004; Olivares *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004a; Zhang *et al.*, 2004b; Limbourg *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2007; Hou *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2007; Frantz *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008; Yokokura *et al.*, 2008) e hemodinâmica (Orlic *et al.*, 2001a; Nagaya *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2005; Berry *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2006; Boomsma *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2007; Burchfield *et al.*, 2008), quanto *in vitro* por preparações em coração isolado (Tomita *et al.*, 1999; Mangi *et al.*, 2003). Todavia, pouco se sabe acerca das repercussões desta terapia sobre o miocárdio remanescente à área de infarto, e a relação entre sua influência sobre o infarto e o processo de remodelamento que se segue.

O estudo do miocárdio remanescente ao infarto é de suma importância ao entendimento dos processos de remodelamento e disfunção cardíaca. Assim como no homem, o remodelamento ocorrido no miocárdio remanescente ao IM em ratos implica em disfunção contrátil que conseqüentemente exacerba a disfunção ventricular e a IC, renovando o ciclo vicioso desta cardiopatia (Francis *et al.*, 2001).

Ao se estudar a relação entre a disfunção cardíaca e o infarto em ratos, parece consenso que após o primeiro mês seguinte à oclusão coronariana, seja detectada disfunção cardíaca com sinais de IC (Litwin *et al.*, 1991; Cheung *et al.*, 1994; Anand *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1997; Gosselin *et al.*, 1998; Gupta *et al.*, 2000; Wasserstrom *et al.*, 2000; Francis *et al.*, 2001; Kanashiro *et al.*, 2006; Peron *et al.*, 2006; Sallinen *et al.*, 2007). Embora haja dados discordantes (Cheung *et al.*, 1994; Anand *et al.*, 1997; Gupta *et al.*, 2000; Peron *et al.*, 2006), o remodelamento cardíaco nesta fase também já promoveu disfunção contrátil do miocárdio remanescente (Litwin *et al.*, 1991; Litwin & Morgan, 1992; Cheung *et al.*, 1994; Novaes *et al.*, 1996; Qi & Rouleau, 1996; Zhang *et al.*, 1996; Wagner *et al.*, 1997; Gosselin *et al.*, 1998; Holt *et al.*, 1998; Mill *et al.*, 1998; Thai *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1999; Min *et al.*, 2001; Wisløff *et al.*, 2002). Essas alterações de contratilidade são conseqüências, principalmente, de defeitos na eletrofisiologia do cardiomiócito, nos miofilamentos contráteis e no acoplamento excitação-contração (Mittmann *et al.*, 1998; Swynghedauw, 1999; dos Santos & Tucci, 2007).

Dessa forma, visto que as BMC são capazes de interferir no processo de reparação no local de implantação, os dados já existentes relevam a necessidade se avaliar suas influências também sobre o miocárdio remoto ao IM. Frente à hipótese de que a terapia celular poderia interferir positivamente sobre o processo de remodelamento deste tecido remanescente e, dessa maneira, contribuindo com a preservação da função cardíaca, este trabalho consistiu da análise dos efeitos do implante de BMC sobre o IM em ratos e sobre o desempenho ventricular global, em associação com dados que informassem sobre a estrutura e a função contrátil do miocárdio não acometido pelo insulto isquêmico e não envolvido diretamente na injeção das células. Estes aspectos compuseram os objetivos da tese, que são detalhados a seguir.

## **2. OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos da injeção de células mononucleares derivadas da medula óssea, 48 horas após infarto do miocárdio em ratos, sobre a progressão do infarto e função cardíaca global, e sua relação com o remodelamento estrutural, funcional e molecular do miocárdio remanescente.

### 2.2. Objetivos específicos

Avaliar a eficiência do procedimento de implante e fixação celular, pela evidência de células implantadas no coração hospedeiro em tempos diferentes após cirurgia;

Avaliar os efeitos do implante de BMC sobre o tamanho do infarto e progressão das alterações morfológicas cardíacas, avaliados pela ecocardiografia Doppler;

Avaliar os efeitos do implante de BMC sobre a função cardíaca global e os sinais de IC, bem como o desempenho ventricular durante estresse súbito da pós-carga;

Avaliar *in vitro* a função contrátil do miocárdio remoto ao infarto e distante da injeção de BMC;

Avaliar os efeitos do implante de BMC sobre a expressão de proteínas envolvidas na cinética do cálcio no miocárdio remanescente;

Avaliar os efeitos do implante de BMC sobre a evolução histopatológica do remodelamento miocárdico remanescente ao infarto, pelo estudo da hipertrofia miocítica, fibrose intersticial e densidade capilar.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

Foram utilizados ratos Lewis-*inbred* machos e fêmeas, jovens (entre 8 e 12 semanas), pesando entre 160 e 220 gramas, livres de patologia (com certificado de saúde animal), provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB – UNICAMP, Campinas, SP). Todos os animais foram mantidos em caixas com água e ração *ad libitum*, em ambiente com temperatura controlada ( $22 \pm 1^\circ \text{C}$ ) e ciclo claro/escuro de 12 horas. A serragem das caixas foi trocada a cada 48 horas e verificadas as condições dos animais, da água e da ração. Todos os animais foram obtidos da mesma colônia isogênica para diminuir a ocorrência de imunorrejeição ou reação enxerto/hospedeiro contra as células implantadas.

Todos os procedimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia e Fisiopatologia Cardíaca da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP-EPM). Exceções são dadas ao procedimento obtenção das células de medula-óssea, detecção das células implantadas, e o exame histológico, realizados no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular no Instituto do Coração (Incor-HC/FMUSP); e à análise por western blotting das proteínas envolvidas na cinética do cálcio no cardiomiócito, realizada no Laboratório de Fisiologia Vascular na Universidade de São Paulo (ICB-USP). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NIH, Pub 85-23, revisado em 1985), e os projetos que configuraram este trabalho foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo sob os números CEP-1468/05 e CEP-0569/06.

### 3.2. Produção do infarto do miocárdio

O método de produção do IM baseou-se no trabalho de Johns & Olson (1954) com pequenas adaptações. Esta técnica já vem sendo rotineiramente aplicada a ratos no laboratório. Os animais foram anestesiados com mistura de cetamina (50 mg/kg, Dopalen®, Vetbrands, Jacareí, SP, BRA) e xilazina (10 mg/kg, Anasedan®, Vetbrands, Jacareí, SP, BRA), entubados e ventilados com pressão positiva em ventilador para roedores (Rodent ventilator Mod 683, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). Após tricotomia do hemitórax esquerdo, era realizada toracotomia lateral no local onde o coração causava impacto à palpação. Com o animal na posição supina, foi feita incisão de 2 cm na pele e divulsão dos músculos peitorais e intercostais. Após divulsão da musculatura intercostal, afastamento das costelas e pericardiotomia, o coração foi exposto para visualização da artéria coronária interventricular anterior. Para a produção do IM, a artéria coronária foi ligada a, aproximadamente, 3 milímetros da origem na aorta, por meio de fio de sutura prolene 6-0. Após uma hiperinsuflação pulmonar provocada, o tórax foi fechado por sutura em bolsa previamente preparada em torno das bordas da incisão. A seguir, os animais foram mantidos em ventilação artificial enriquecida com oxigênio até que ocorressem movimentos ventilatórios espontâneos. Os animais foram colocados em caixas e mantidos aquecidos durante o período pós-operatório, até que se recuperassem completamente da anestesia.

Após término da cirurgia de indução do infarto ou cirurgia fictícia, os animais foram identificados provisoriamente com algarismos arábicos até a avaliação ecocardiográfica realizada após 48 horas da cirurgia. A partir da anestesia feita para esta avaliação ecocardiográfica (mistura de cetamina 50 mg/kg e xilazina 10 mg/kg, *i.p.*), todos os animais sobreviventes foram identificados por seqüências de 7 dígitos (letras e números), contidas em microchipes de 2 x 11 mm (ID 100A Micro Transponder Trovan®) implantados subcutaneamente na região interescapular para o estudo cego nas avaliações posteriores. A identificação dos códigos fez-se por um leitor (LID 571 pocket reader, Trovan Eletronic Identification Systems Ltd, UK). Foram excluídos os animais que tiveram infarto menor que 30% do VE ao primeiro ECO, enquanto os incluídos no estudo foram categorizados em IM moderados (30 a 39% = mIM) e grandes (40% ou maiores = IM) para posteriores interpretações. O grupo controle foi composto por animais submetidos à cirurgia fictícia da oclusão coronariana, sendo denominado grupo SHAM.



### **3.4. Manipulação das células de medula-óssea**

#### **3.3.1. Isolamento das células**

As células mononucleares foram obtidas e purificadas a partir da coleta da MO dos fêmures e tíbias de ratos machos doadores. Todo o procedimento seguinte foi realizado em meio estéril por fluxo laminar (Holten HBB 2436, Denmark). Os animais foram sacrificados após anestesia com tiopental sódico 60mg/kg (thiopentax<sup>®</sup>, Cristália, SP, BRA) e após tricotomia dos membros inferiores, foi realizada uma incisão para a visualização da articulação coxofemoral. Após secção dos ligamentos e divulsão e retirada do tecido muscular adjacente, os fêmures e as tíbias foram dissecados cuidadosamente, separados e acondicionados em PBS (phosphate-buffered saline) acrescido de penicilina G (100 U/ml) e estreptomicina (100 µg/ml). A extração da MO foi feita sob condições estéreis, pela lavagem das diáfises com meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) com seringa e agulha. Após sucessivas lavagens e homogeneização do meio contendo o extrato da MO, a purificação da fração mononuclear foi feita pela centrifugação da amostra em gradiente de Ficoll (Ficoll-Paque PLUS, GE Healthcare Amersham Biosciences, Sweden) composto de 3 ml de ficoll para cada 10 ml de meio de cultura com células. O material foi centrifugado por 25 minutos a 2.000 rpm ( $\pm 23^\circ$  C), seguido de duas lavagens em PBS, nova centrifugação por 5 minutos a 1.000 rpm, e ressuspensão em solução salina (NaCl 0,9%) estéril. Para análise da viabilidade foi utilizado corante *Trypan Blue* 0,4% (Sigma, St. Louis, MO, USA) e a contagem das células mononucleares foi realizada por avaliação microscópica em câmara de Neubauer.

#### **3.3.2. Procedimento de implante.**

Foram injetadas cerca  $6 \times 10^6$  células de medula-óssea diluídas em 100 µl de solução salina estéril (0,9% NaCl) por animal, sendo divididas em três injeções intramiocárdicas na região peri-infarto, sob anestesia (cetamina + xilazina) e após toracotomia com exposição do coração infartado. O implantação das células foi realizado na fase aguda de evolução do infarto (após 48 horas) e após primeira avaliação ecocardiográfica, quando foram injetados, de forma randômica, 100µl de solução contendo BMC (grupos mIM+BMC e IM+BMC) ou o mesmo volume de solução salina sem células (grupos mIM e IM). O grupo SHAM recebeu o mesmo volume de solução salina sem células.

### 3.3.3. Detecção das células mononucleares implantadas

De forma proposital, foram utilizadas células de medula-óssea provenientes exclusivamente de ratos machos, implantadas em corações infartados de fêmeas. Para comprovar a eficiência do procedimento de injeção intramiocárdica, a presença das células transplantadas foi pesquisada em uma pequena amostra ( $n = 3$ ) de corações provindos de animais do grupo IM+BMC, sacrificados 10 minutos após o transplante. Para acompanhamento temporal da presença de células transplantadas durante o período de análise, amostras foram coletadas com 1, 2 e 5 dias, e após 1 e 6 semanas de transplante celular. Esta análise foi realizada por *polymerase chain reaction* (PCR) convencional para a detecção do gene Sry (*sex-determining region Y*), que está localizado especificamente no cromossomo Y das células implantadas.

Na preparação das amostras, os corações foram retirados, rapidamente congelados e mantidos a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Para obtenção do DNA, o tecido cardíaco triturado ventrículo esquerdo foi digerido em tampão lítico (100 mM Tris-HCl; pH 8,5; 5 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ; 0.2% SDS; 200 mM NaCl) contendo proteinase K (0,25 mg/ml) a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 20 horas. Após a digestão, a amostra foi incubada em fenol e clorofórmio para separar os ácidos nucléicos das proteínas e o DNA contido na fase aquosa foi precipitado com etanol (100%) a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Após centrifugação a 4.500 rpm por 15 minutos, o DNA precipitado foi lavado em etanol (70%), seco em ar livre e solubilizado em água. Para se determinar a concentração de DNA, a amostra era diluída 100 vezes e a absorbância lida em 260 a 280 nm.

Para a reação de PCR convencional, foram utilizados *primers* desenhados de acordo com a seqüência parcial do gene Sry localizado no cromossomo Y de rato (An *et al.*, 1997; Müller-Ehmsen *et al.*, 2002). O *primer* anverso (*antisense*) foi: 5'-AGT GTT CAG CCC TAC AGC CTG AGG AC-3' e o reverso (*sense*): 5'-GCT GCA ATG GGA CAA CAA CCT ACA CAC-3'. A mistura de reação foi composta de 1  $\mu\text{l}$  de DNA, os dois *primers* (1  $\mu\text{M}$  de cada), dinucleotídeos-trifosfatos (200  $\mu\text{M}$ ) (dATP, dCTP, dGTP, e dUTP), 4,5  $\mu\text{l}$  de tampão para PCR, 16,124  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  milliq, 1,25  $\mu\text{l}$  de DMSO e Taq DNA polymerase (0,0125  $\mu\text{l}$ ) em um volume final de 100  $\mu\text{l}$ . Para saber o  $T_m$  ideal realizamos um ensaio de gradiente de temperatura ( $45\text{ }^{\circ}\text{C} - 64,6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) com a amostra de DNA, com e sem DMSO. A partir desse ensaio, a temperatura escolhida foi de  $63,4\text{ }^{\circ}\text{C}$  com DMSO. Com a utilização de um termociclador de DNA foram realizados 35 ciclos de amplificação com cada ciclo consistindo de passos de desnaturação a  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 60 segundos, anelamento a  $63,4\text{ }^{\circ}\text{C}$  e extensão a  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$

por 60 segundos. Os produtos da reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (2%) e identificados de acordo com o peso molecular. Dessa forma, a detecção de bandas de DNA do gene Sry confirmava a presença de células provindas de indivíduos machos (doadores).

### 3.5. Eletrocardiograma

O eletrocardiograma foi obtido segundo técnica já padronizada no laboratório, com os animais anestesiados com a mesma mistura de cetamina + xilazina. A avaliação eletrocardiográfica era feita 48 horas após produção do infarto, imediatamente antes do exame ecocardiográfico. As seguintes derivações foram registradas, com padrão correspondente a 1 mV equivalendo a 20 milímetros de altura (2N) e velocidade de registro de 50 mm/s: D1, D2, D3, aVR, aVL, aVF e as precordiais: VA e VM. VA correspondendo ao ponto médio entre o manúbrio esternal e o apêndice xifóide e VM, à mesma altura de VA, na linha axilar média. O eletrocardiograma foi realizado para se identificar a existência ou inexistência de infarto do miocárdio, segundo dados divulgados pelo laboratório (Bonilha *et al.*, 2005) como capazes de caracterizar a existência do infarto: presença de onda Q em D1 e desvio do ÂQRS além de  $+90^\circ$ . Terminada a avaliação eletrocardiográfica, os animais foram imediatamente encaminhados para a realização do ECO pré-transplante, evitando-se nova indução anestésica.

### 3.6. Estudo morfo-funcional por ecocardiografia Doppler

A ecocardiografia Doppler (ECO) foi realizada na fase aguda após as 48 horas de indução do IM (e imediatamente antes do transplante), e ao fim das seis semanas seguintes de evolução (pós-transplante). Após anestesia e tricotomia da face anterior do tórax, os animais eram posicionados em decúbito lateral esquerdo e três eletrodos foram colocados nas patas para obtenção do traçado eletrocardiográfico simultâneo à imagem ecocardiográfica. O exame foi realizado segundo técnica também já consolidada em nosso laboratório (Moisés *et al.*, 2000; Bonilha *et al.*, 2005; Cury *et al.*, 2005; Nozawa *et al.*, 2006), com aparelho SONUS 5500<sup>®</sup>, que permitiu obtenção de imagens cardíacas em tempo real nos modos mono e bidimensional, além da velocidade de fluxo por efeito Doppler espectral, com profundidade de 3 cm e transdutor de 12 MHz. As imagens em cortes transversais do VE foram gravadas em fitas de vídeo para posterior análise. Foram

utilizadas as janelas paraesternal esquerda (corte longitudinal e transversal) e apical (quatro câmaras e duas câmaras). No modo bidimensional, foram analisadas as áreas do VE ao final da diástole (AdVE) e ao final da sístole (AsVE).

Foram determinadas, também, a presença de infarto e sua extensão, e a função sistólica e diastólica do VE. O tamanho do infarto foi estimado pela medida do comprimento das regiões acinética e/ou hipocinéticas (RAH) das paredes ventriculares, representando-o como percentagem do perímetro total do contorno endocárdico (PE) em três cortes transversais do VE (nível das bordas das cúspides da valva mitral, dos músculos papilares e da região apical). Este método fora previamente validado em nosso laboratório (Moisés *et al.*, 2000).

A função sistólica foi avaliada pela fração de encurtamento da área transversa (FEAT) segundo a fórmula:  $FEAT = [(AdVE - AsVE) / AdVE] \times 100\%$ , sendo AdVE = área diastólica e AsVE = área sistólica do VE. O valor final foi obtido pela média das FEAT calculadas nos três planos basal, médio e apical do VE.

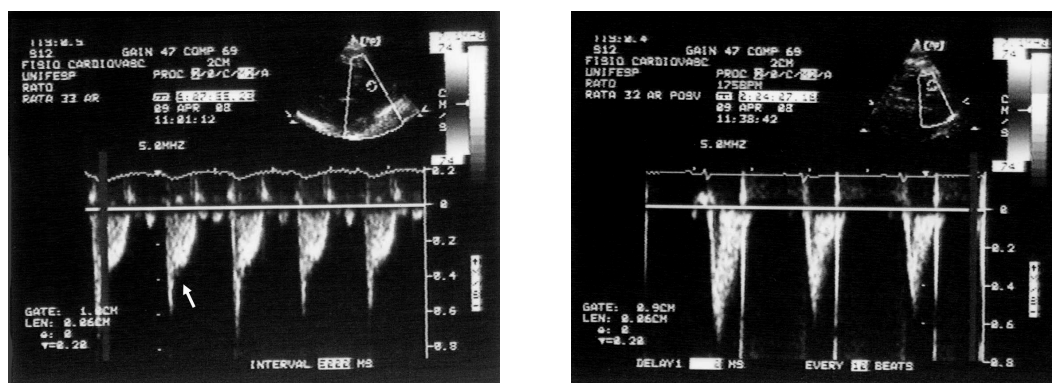
A função diastólica foi avaliada utilizando-se os índices derivados da curva de velocidade do fluxo diastólico mitral obtido pela técnica de Doppler pulsátil. A curva de velocidade do fluxo diastólico foi obtida a partir da imagem apical quatro câmaras, posicionando-se a amostragem de volume próximo à face ventricular da valva mitral. Foram determinadas:

- a) Onda E: maior valor da velocidade de fluxo inicial do enchimento ventricular;
- b) Onda A: maior valor da velocidade de fluxo telediastólico mitral;
- c) Relação E/A: razão entre a velocidade máxima da onda E e a velocidade máxima da onda A.

Foi também analisada a curva de velocidade de fluxo sistólico na artéria pulmonar no plano paraesternal transversal da base, com a amostra de volume do Doppler pulsátil posicionada logo após o plano valvar. Um padrão específico foi pesquisado como sugestivo de hipertensão pulmonar: a identificação de um entalhe no gráfico da curva do Doppler causado pela redução abrupta da velocidade do fluxo de saída do ventrículo direito logo após a fase de descenso rápido (Kitabatake, 1983; Moisés *et al.*, 2000).

Devido à inexistência de estudos que comprovassem a eficiência do ECO na determinação do tamanho do IM em fase tão precoce quanto 48 horas após oclusão coronariana, realizamos um estudo preliminar com animais nestas condições. Ademais também realizamos validação do ECO após seis semanas de IM,

analisando nas duas circunstâncias o grau de concordância entre as medidas do ECO e de uma metodologia confiável para definição da área necrosada, a coloração histoquímica por cloreto de tetrazólio a 1% (Fishbein *et al.*, 1981). A metodologia e os resultados deste estudo estão resumidos e representados no Anexo 1 deste manuscrito, e configuram parte de um trabalho já publicado em periódico científico internacional (dos Santos, 2008).



**Ilustração 1** - Registros de curvas de velocidade de fluxo sistólico pulmonar normal (à direita) e sugestivo de hipertensão pulmonar (à esquerda). Notar o entalhe sistólico na curva de velocidade de fluxo pulmonar (seta branca).

### 3.7. Estudo hemodinâmico da função cardíaca

#### 3.7.1. Estudo hemodinâmico em condições basais

Os estudos hemodinâmicos foram realizados ao fim das seis semanas de seguimento, com os animais mantidos aquecidos ( $\pm 37^{\circ}$  C), sob plano anestésico adequado e ajustado com uretana (1,2 g/kg, *i.v.*, Sigma, MO, USA), e sob ventilação mecânica (frequência: 100 movimentos/minuto e volume corrente: 10 ml/kg) enriquecida com oxigênio. A veia femoral direita foi cateterizada para manutenção do plano anestésico, administração de fármacos e reposição hidrossalina. Um micromanômetro Millar (MikroTip® 2F, Millar Instruments Inc., Houston, TX, USA) teve sua extremidade distal posicionada dentro da cavidade ventricular esquerda a partir de cateterismo da carótida comum direita para medida da pressão intraventricular. Após toracotomia à direita (terceiro espaço intercostal) e cuidadosa dissecação da aorta ascendente, foi posicionado um sensor de fluxo (Transonic Flowprobe, Transonic Systems Inc. NY, USA), devidamente conectado ao sistema de interface para amplificação da medida do fluxo na aorta (Small Animal Blood Flow Meter – T206, Transonic Systems Inc. NY, USA). Os dados obtidos por um

software AcqKnowledge® 3.7.5. (Biopac Systems Inc., CA, USA) de pressão intraventricular e fluxo aórtico, possibilitaram computar os valores instantâneos de: pressões ventriculares sistólica (PSVE em mm Hg) e diastólica final (PDfVE em mm Hg), frequência cardíaca (em batimentos por minuto, bpm), primeira derivada temporal de pressão (dP/dt em mm Hg/s), débito cardíaco (DC, em ml/min) e volume sistólico ejetado (VSE, em ml) e trabalho sistólico (TS, em g·m/batimento). Este último foi resultado da fórmula:  $TS = (PSVE - PDfVE) \times (VSE) \times 0,0136$ , onde 0,0136 é a constante para conversão de pressão e volume em unidades de trabalho (gramas-metro ou g·m). Além disso, analisados os valores indexados de ejeção pela massa de cada animal, a saber: índice cardíaco, índice de volume sistólico ejetado e índice do trabalho sistólico (DC, VSE e TS divididos pela massa do animal em quilogramas = IC, IVSE e ITS, respectivamente)

### **3.7.2. Estudo hemodinâmico durante sobrecarga súbita de pressão**

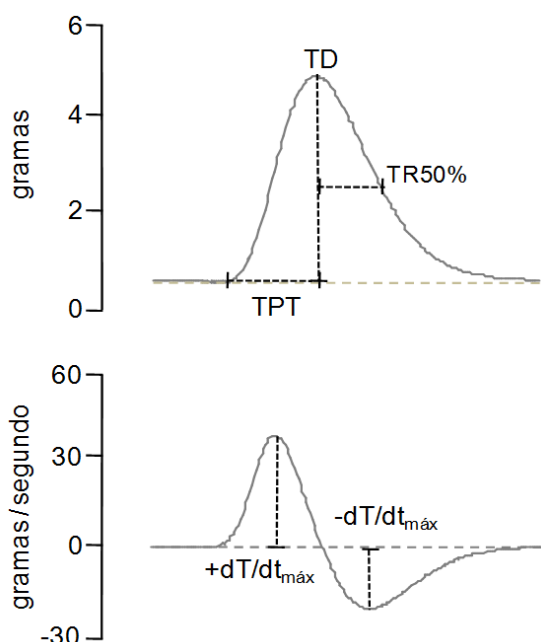
Devido à avaliação hemodinâmica sob condições basais freqüentemente não ser capaz de evidenciar sinais de disfunção ventricular em ratos infartados, foi realizado estudo preliminar envolvendo o uso do estresse súbito da pós-carga cardíaca para avaliação do desempenho de corações saudáveis e infartados. Com os resultados deste estudo (Anexo 2), foi protocolada a avaliação hemodinâmica dos grupos experimentais com terapia celular também durante indução de sobrecarga pressórica súbita. Para tanto, foram feitas avaliações da função hemodinâmica em condições basais e durante súbita elevação da pós-carga produzida pela injeção de fenilefrina (25-75 µg/kg, *i.v. in bolus*, Sigma, St. Louis, MO, USA) suficiente para promover elevação da pressão sistólica em aproximadamente 70% em relação ao basal. Após vagotomia bilateral para eliminar a influência da bradicardia reflexa nas respostas estudadas, foram feitas de 2 a 4 injeções de fenilefrina para se obter o aumento satisfatório na pressão sistólica aguardando o devido retorno dos parâmetros à situação controle entre as sobrecargas súbitas. Foram avaliadas as mudanças relativas promovidas, durante o pico de sobrecarga, nos dados pressóricos e na ejeção ventricular. Também foram estudadas as correlações estabelecidas entre a elevação da pós-carga e os parâmetros de performance cardíaca, coletadas durante a rampa de subida da pressão sistólica aproximadamente a cada 2 ou 3 ciclos cardíacos.

### 3.8. Estudo da função mecânica dos músculos papilares

Ao fim da avaliação hemodinâmica, o coração foi retirado rapidamente do tórax e colocado em solução de Krebs-Henseleit, previamente oxigenada com 100% de oxigênio e aquecida a 30°C. O coração foi retirado da solução e a parede livre do ventrículo direito separada para expor o septo interventricular. O septo foi dividido ao meio para que os músculos papilares do VE fossem adequadamente expostos. O músculo papilar posterior foi cuidadosamente dissecado numa plataforma de parafina e suas extremidades tendínea e parietal, presas a anéis de aço inoxidável. Todo o procedimento, desde a retirada do coração até a colocação do músculo papilar na cuba experimental, não durava mais do que 5 minutos. O músculo papilar foi suspenso verticalmente em uma câmara de vidro preenchida com 5 ml de solução de Krebs-Henseleit. A extremidade tendínea superior foi conectada por anel e fio de aço inoxidável de 0,35 mm de diâmetro a um transdutor de força isométrica (GRASS FT-03, Astro-Med, Inc., RI, USA) e o anel da extremidade inferior do músculo conectado a um gancho fixo na cuba de vidro. O transdutor de força foi conectado ao micromanipulador (N<sup>o</sup> 2046F, Mitutoyo Inc, Kawasaki, Japan) que permitia deslocamento vertical a cada 10 micrômetros/volta. A solução de Krebs-Henseleit foi composta, em milimoles por litro, por: 135 NaCl; 4,6 KCl; 1,5 CaCl; 1,15 MgSO<sub>4</sub>; 1,2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 5,5 glicose e 20 de HEPES como tampão. O pH foi ajustado para 7,45 ± 0,05 adicionando-se hidróxido de sódio (NaOH) em concentração de 20%. Para um litro de solução, em média, foram adicionados cerca de 2 ml de NaOH, elevando assim a concentração de NaCl para em média 145 mM. A solução foi oxigenada com 100% de oxigênio e pressão parcial mantida acima de 550 mm Hg.

O transdutor conectado a um microcomputador dotado do software AcqKnowledge® 3.7.5. (Biopac Systems Inc., CA, USA) permitiu determinar os valores das variáveis fisiológicas analisadas. Paralelamente ao músculo papilar posicionavam-se dois eletrodos de platina acoplados a estimulador elétrico (DV&M, modelo ESF-10) que liberavam estímulos em onda quadrada de 5 ms de duração, com voltagem aproximadamente 10% maior que o mínimo necessário para provocar resposta mecânica máxima do músculo, o que geralmente correspondeu a 7,0 V. Todos os músculos foram estimulados em frequência de 0,2 Hz.

Durante período de 45 minutos o músculo foi deixado contraindo isotonicamente contra pré-carga baixa por meio de molas metálicas (tensão nominal de 0,3 gramas) colocadas entre o anel superior e o transdutor. Em seguida, o músculo era colocado em contrações isométricas sem as molas e, com auxílio do micromanipulador, era cuidadosamente estirado até a tensão de repouso atingir 0,4 gramas e deixado nestas condições por 20 minutos. Após estabilização, foram feitos sucessivos estiramentos de 5 micrômetros cada, até atingir o ápice da curva comprimento versus tensão desenvolvida e, então, determinado seu  $L_{máx}$  (comprimento diastólico da fibra muscular associado à máxima tensão isométrica desenvolvida: TD máxima) e medido o seu comprimento com auxílio de paquímetro (Mitutoyo Inc, Kawasaki, Japan). Essa medida, realizada com o músculo dentro da cuba de vidro, era corrigida de acordo com uma reta de regressão construída a partir de medidas previamente realizadas dentro e fora da cuba, individualmente para o pesquisador que executou o experimento. Em seguida, o músculo era deixado em  $L_{máx}$ , em contração isométrica estável, por mais 15 minutos antes do início dos experimentos. Eram analisados os seguintes parâmetros de função contrátil:



**Ilustração 2** – Registro típico força gerada pelo músculo papilar na contração isométrica em  $L_{máx}$ , e os parâmetros avaliados.

**TD:** tensão isométrica desenvolvida máxima.

**TR:** tensão isométrica de repouso ou diastólica.

**dT/dt:** Taxa de variação da tensão desenvolvida por unidade de tempo. Foram obtidas as máximas derivadas positiva ( $+dT/dt_{máx}$ ) e negativa ( $-dT/dt_{máx}$ ), que informam a variação temporal da força na contração (sístole) e no relaxamento (diástole), respectivamente.

**TPT:** Tempo para atingir o pico da tensão desenvolvida, como parâmetro temporal de capacidade contrátil.

**TR50%:** Tempo decorrido para a tensão desenvolvida decrescer 50% de seu valor máximo, como parâmetro temporal de capacidade de relaxamento.



Com o músculo em  $L_{\text{máx}}$ , foram avaliados os parâmetros acima descritos e, em seguida, realizadas manobras experimentais na seguinte ordem:

### **3.8.1. Resposta contrátil após pausa de estímulos (potenciação pós-pausa)**

Períodos crescentes de pausa (6, 10, 15, 30, e 60 segundos) do estímulo elétrico foram usados para avaliar a amplitude da contração após a pausa, considerada como valor relativo às contrações que precediam a pausa, aguardando-se o retorno da contração para as condições basais entre um teste de pausa de estímulos e outro.

### **3.8.2. Curva de Estiramento-Tensão**

Após os músculos permanecerem em nova estabilização sob contração isométrica em  $L_{\text{máx}}$ , foram avaliados os valores de suas variáveis em comprimentos correspondentes a 92%, 94%, 96%, 98% e 100% do  $L_{\text{máx}}$ , possibilitando a determinação, *a posteriori*, da relação entre estiramento e TD (relação de Frank-Starling), assim entre estiramento e TR (avaliando rigidez miocárdica) para cada músculo.

### **3.8.3. Resposta contrátil ao cálcio**

Após estabilização dos parâmetros de contração, a solução nutriente era substituída por outra contendo uma elevada concentração de cálcio (2,5 mM), aguardando-se a devida estabilização dos parâmetros, e posterior retorno à solução nutriente inicial.

### **3.8.4. Resposta contrátil ao agonista $\beta$ -adrenérgico**

Após novo período de estabilização, era feita adição de isoproterenol (Sigma, St. Louis, MO, USA) para concentração final no banho de 5  $\mu\text{M}$ , e aguardada devida estabilização dos parâmetros frente ao estímulo.

Terminadas as manobras de avaliação da mecânica do músculo papilar, os mesmos foram retirados do sistema, o segmento miocárdico contido entre os anéis de aço foi isolado e pesado em balança de precisão (accu-124, Fisher Scientific

Research Analytical, Pittsburgh, PA, USA). Considerando a densidade muscular igual a 1, a área de secção transversa (AS) do músculo foi estimada pela razão entre a sua massa (em mg) e seu comprimento em repouso verificado em  $L_{\text{máx}}$  (em mm). Os dados relacionados à força foram corrigidos pela AS de cada músculo.

### 3.9. Determinação das massas cardíacas e teor de água no pulmão

Logo após a retirada do músculo papilar, os ventrículos esquerdo (VE) e direito (VD) foram rapidamente pesados para avaliação das massas brutas e corrigidas pelas massas corpóreas de cada animal, como estimativa de hipertrofia miocárdica.

Sendo um parâmetro de congestão pulmonar e, conseqüentemente, do grau de IC, também foi avaliado o teor de água no pulmão que, sabidamente, é uma análise sensível como indicadora da congestão tissular (Saito *et al.*, 2002). Para tanto, após a retirada do coração e dissecação do músculo papilar para o estudo funcional *in vitro*, o pulmão direito foi retirado do animal e pesado imediatamente, obtendo-se a massa úmida (MU) da peça. Tais amostras de tecido foram mantidas em dessecador (70° C) por 24 horas e pesadas fornecendo então a massa seca (MS) da amostra. O teor de água do pulmão foi calculado pela seguinte fórmula tradicionalmente utilizada:  $\% H_2O = [(MU - MS) / MU] \times 100$ , onde % H<sub>2</sub>O é o teor de água no pulmão. Ademais foram avaliadas as massas úmidas e secas dos pulmões indexadas pela respectiva massa corpórea do animal.

### 3.10. Western blotting das proteínas relacionadas à cinética do cálcio.

Para correlacionar os efeitos da terapia celular nas alterações funcionais e moleculares provocadas pelo IM, foram realizadas análises por *Western blot* para as seguintes proteínas relacionadas à cinética do cálcio, no miocárdio remanescente: as isoformas 1 e 2 da subunidade  $\alpha$  da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase ( $\alpha_1$ -NKA e  $\alpha_2$ -NKA), o trocador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>+2</sup> (NCX), a Ca<sup>+2</sup>-ATPase sarcoplasmática (SERCA2), o fosfolamban (PLB) e o fosfolamban fosforilado na serina-16 (PLB-Ser<sup>16</sup>). Para tanto, imediatamente após a retirada do músculo papilar para o estudo da contratilidade *in vitro*, pesagem das partes do coração e separação das amostras para os estudos histopatológicos, a metade basal do VE, excetuando-se a cicatriz do IM e o tecido adjacente, foi congelada a -80° C para posterior análise.

### **3.10.1. Homogenização das amostras**

Amostras do VE (aproximadamente 150 mg) de cada grupo experimental foram homogeneizadas em tampão Tris (Tris 50 mM, EDTA 1 mM e sacarose 250 mM, pH 7,4) gelado, com uso de Polytron (Polytron® PT2100, Kinematica AG, Littau, LU, Switzerland). Os homogenatos foram centrifugados (10.000 g, 4°C, 10 minutos), e o sobrenadante submetido à ultra-centrifugação (100.000 g, 1 hora, 4°C) para obtenção da fração de membrana. O *pellet* resultante foi dissolvido (1:3) em tampão Tris-EDTA (Tris 50 mM; EDTA 1 mM, pH = 7,4) e a concentração de proteína do extrato foi medida por espectrofotometria (Bradford, 1976).

### **3.10.2. Eletroforese das proteínas**

As amostras de extrato protéico de fração de membrana (25 µg de proteína) e o padrão de peso molecular foram eletroforeticamente separados em gel SDS-PAGE (Bio-Rad; Hercules, CA) 7,5% (para NCX), 10% (para  $\alpha_1$ -NKA e  $\alpha_2$ -NKA) ou 12% (para SERCA2, PLB, e PLB-Ser<sup>16</sup>) e transferidos, durante 12 horas a 4°C, para membrana de PVDF (*polyvinyl difluoride*, Amershan Biosciences) usando sistema de eletro-transferência (Mini Trans-Blot Cell system, Bio-Rad) contendo Tris 25 mM; glicina 190 mM; metanol 20% e SDS 0,05%. A eficiência da transferência e a igualdade da carga de proteínas eram verificadas pela coloração com *Ponceau S* 1% (Caledon laboratories, Ontário, Canadá).

### **3.10.3. Detecção das proteínas**

As membranas foram bloqueadas em tampão Tris (Tris 10mM; NaCl 100 mM e Tween 20 0,1 %, pH= 7,4) contendo leite em pó desnatado (5%) por 1 hora em temperatura ambiente, e incubadas por aproximadamente 12 h (4°C) com anticorpos primários específicos, incluindo: monoclonal anti- $\alpha_1$  Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (1:10.000, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA), anti- $\alpha_2$  Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (1:5.000, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA), monoclonal anti-NXC (1:1.500, Swant, Switzerland), monoclonal anti-SERCA2 (1:2500, Abcam Inc., MA, USA), monoclonal anti-PLB (0,25 µg/ml, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA) ou anti-PLB-Ser<sup>16</sup> (1:1.000, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA.). Após consecutivas lavagens em tampão Tris, as membranas foram incubadas com

anticorpo secundário *anti-rabbit* (subunidade  $\alpha_2$  da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e PLB- Ser<sup>16</sup>) ou *anti-mouse* (subunidade  $\alpha_1$  da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, NXC, SERCA2 e PLB) conjugados a peroxidase de rábano (1:3.000, Bio-Rad; Hercules, CA, USA). Após nova lavagem, os imunocomplexos foram detectados por um sistema de detecção de quimioluminescência para peroxidase (ECL Plus, Amersham International; Little Chalfont, UK) seguida de auto-radiografia (Hyperfilm ECL, Amersham International). As bandas (*blots*) das proteínas foram quantificadas pelo programa *Scion Image* em unidades arbitrárias de densidade óptica, e em seguida normalizadas pelas médias das amostras controle (grupo SHAM) de cada membrana, e finalmente expressas como percentagem em relação ao grupo SHAM para correta normalização e comparação entre os demais grupos.

### 3.11. Estudos morfológicos por histologia

Após pesagem e secção do VE transversalmente, a metade apical de cada ventrículo acondicionada em formol 4% tamponado com solução-tampão fosfato (0,01mM; pH 7,4) para obtenção dos cortes para microscopia de luz.

O fragmento do VE foi fatiado na transversal e disposto em cassete plástico do tipo processador/inclisor. Os cassetes foram processados em aparelho auto-técnico com ciclo total de 12 horas para a desidratação, diafanização e parafinização do material. A desidratação foi realizada com concentrações crescentes de álcool etílico até chegar ao álcool absoluto, diafanizados em xilol, impregnados e incluídos em parafina a 60°C para obtenção de cortes de 3  $\mu\text{m}$  em micrótomo do tipo Minot (Leica RM 2035). A seguir, os cortes foram colocados em lâminas mantidas à temperatura de 37 °C para secagem, colagem e posterior coloração. As imagens da microscopia de luz foram visualizadas em microscópio (Leica DM/LS, Leica Microsystems Ltd, Germany) ligado a sistema de digitalização de imagem (Leica Imaging Solutions) e as imagens digitalizadas dos corações foram analisadas com uso de um software (Leica QWin Plus V.3.2.0., Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd., Cambridge, UK).

A análise por microscopia de luz possibilitou a caracterização morfológica do tecido miocárdico com avaliações do volume nuclear, espessura da cicatriz do infarto, teor de colágeno intersticial, e densidade capilar.

### **3.11.1. Volume nuclear**

Como parâmetro de hipertrofia miocitária (Gerdes *et al.*, 1994), foi estimado o volume nuclear médio dos cardiomiócitos, a partir de amostras de cada animal, do miocárdio ventricular esquerdo, remoto a área de infarto (septo e parede posterior). Nos cortes histológicos corados com hematoxilina & eosina de Harris, as fibras musculares cardíacas cortadas longitudinalmente foram visualizadas em aumento de 400 vezes (objetiva de 40 vezes e ocular de 10 vezes) e medidos exclusivamente os núcleos totalmente visíveis, situados no centro da célula, e que apresentaram forma elipsóide, sendo estes, localizados principalmente no mesocárdio. Os núcleos cortados em sentido transversal ou oblíquo foram desprezados.

Para cada animal estudado foram medidos de 50 a 70 núcleos, avaliados num total de seis campos de 75.000  $\mu\text{m}^2$  cada, calculando-se o volume de cada núcleo conforme equação (Gerdes *et al.*, 1994): Volume nuclear ( $V$ ) =  $\pi \times D \times d^2 / 6$ . Sendo  $d$  o menor diâmetro do núcleo e  $D$  o maior diâmetro medido.

### **3.11.2. Quantificação do colágeno intersticial no VE**

Para avaliar o teor de colágeno no interstício do miocárdio remoto ao infarto, os cortes montados sobre as lâminas foram corados pelo método do picrossirius red por imersão durante uma hora em solução contendo 0,1% de sirius red F3BA, em meio aquoso saturado de ácido pícrico, e a seguir, lavados em solução 0,01 N de HCl por dois minutos, desidratados com álcool etílico e diafanizados com xilol. A cobertura com resina sintética (Entellan – Merck) preservou o material para análises posteriores.

O teor de colágeno no miocárdio do VE foi estimado (Junqueira *et al.*, 1979) desprezando-se as mensurações na região perivascular e cicatricial (infarto). Após captar as imagens na tela do computador, o software detectou as regiões coradas em vermelho vibrante, composto por tons de vermelho (*red*), verde (*green*) e azul (*blue*). Foi selecionada e padronizada a faixa na qual se obtinham os mesmos tons (*red*: 200 a 250, *green*: 120 a 160, e *blue*: 130 a 180) para uniformização da análise de todas as amostras, e as estimativas foram realizadas com objetiva que ampliava as imagens em 20 vezes e ocular de 10 vezes (ampliação de 200 vezes). Foram avaliados de cinco a sete campos de cada animal, capturados do septo interventricular e parede posterior. Os resultados foram expressos em percentagens

da área ocupada por fibras colágenas em relação ao respectivo campo de aproximadamente 300.000  $\mu\text{m}^2$  de área.

### **3.11.3. Espessura do miocárdio remanescente e da cicatriz do infarto**

Nos mesmos cortes corados com *picrossirius red*, foram medidas as espessuras da parede ventricular (septo interventricular), com objetiva de 5 vezes de aumento, pela média de três medidas da espessura epi-endocárdica para cada um dos três campos capturados pelo software. Por último, também foram realizadas três medidas da espessura da cicatriz do infarto, por um único campo com objetiva de 5 vezes, capturado na porção média da extensão da cicatriz fibrótica.

### **3.11.4. Determinação da densidade capilar.**

A densidade capilar foi quantificada em cortes submetidos à coloração de PAS (ácido periódico de Schiff) e eosina, provenientes tanto da zona de transição entre o infarto e o miocárdio remanescente, quanto do miocárdio remoto ao infarto (septo interventricular). Com objetiva de ampliação de 40 vezes e lente ocular de 10 vezes (ampliação total: 400 vezes), foi realizada contagem do número absoluto de capilares contados em cinco campos aleatórios capturados no espaço determinado para análise, onde os miócitos e capilares estavam cortados transversalmente. A densidade foi calculada tanto em função da área de cada campo, quanto em função do número de miócitos presentes no mesmo campo analisado. Dessa forma, a densidade capilar pôde então ser avaliada pelo número de capilares/ $\text{mm}^2$  e pelo número de capilares/cardiomiócito.

## **3.12. Análise estatística**

Os resultados estão apresentados na estatística descritiva por média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.). Para estatística inferencial, o nível de significância foi estabelecido em 5%. A comparação entre os grupos foi feita por teste *t* de Student não pareado, análise de variância uma e duas vias com medidas repetidas ou completamente randomizada, dependendo da ocasião e do número de grupos e vias a comparar. Quando identificadas diferenças significantes, foi aplicado o teste *post-hoc* de Bonferroni para localizar as diferenças. As comparações entre freqüências ou proporções foram feitas por teste do Qui-quadrado bi-caudal. Para

avaliação da curva estiramento-tensão no músculo papilar isolado e da sobrecarga pressórica na função hemodinâmica, foram feitas análises de correlação e regressão linear com posterior comparação dos coeficientes angulares dos grupos. Toda a análise e construção gráfica foram realizadas por meio do *GraphPad Prism 4.0 software*.

#### **4. RESULTADOS**



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Massa corpórea dos animais

Os animais sobreviventes as primeiras 48 horas após cirurgia fictícia para indução do infarto apresentaram média das massas corpóreas de  $201,7 \pm 1,9$  g, e os animais submetidos à oclusão coronariana foi de  $198,3 \pm 1,3$  g, sem diferença entre os grupos. Após a randomização dos animais infartados nos grupos experimentais e sua seleção de acordo com o tamanho do infarto (Tabela 1), também não foram identificadas diferenças significantes entre as massas dos animais infartados submetidos à terapia (BMC) ou à injeção de solução salina, tampouco entre estes e o grupo SHAM. Com as seis semanas de seguimento, houve aumento significativo da massa corpórea em todos os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ), todavia manteve-se a semelhança entre os grupos experimentais.

**Tabela 1 – Massas corpóreas**

	Inicial (g)	Final (g)	Ganho ponderal (g)	Ganho ponderal (%)
<b>SHAM</b>	$201,3 \pm 5,7$	$222,1 \pm 9,9$ †	$21,8 \pm 4,8$	$10,4 \pm 2,1$
<b>mIM</b>	$203,2 \pm 2,9$	$226,9 \pm 5,4$ †	$23,6 \pm 5,0$	$11,7 \pm 2,5$
<b>mIM+BMC</b>	$195,3 \pm 4,2$	$219,7 \pm 5,1$ †	$24,4 \pm 2,0$	$12,5 \pm 1,0$
<b>IM</b>	$202,0 \pm 3,3$	$229,5 \pm 7,2$ †	$27,5 \pm 5,0$	$13,4 \pm 2,3$
<b>IM+BMC</b>	$195,1 \pm 4,0$	$219,2 \pm 4,5$ †	$24,1 \pm 2,8$	$12,4 \pm 1,5$
<b>ANOVA p</b>	<i>0,3638</i>	<i>0,6751</i>	<i>0,3117</i>	<i>0,1952</i>

Médias  $\pm$  e.p.m. † $p < 0,05$  Final vs. Inicial.

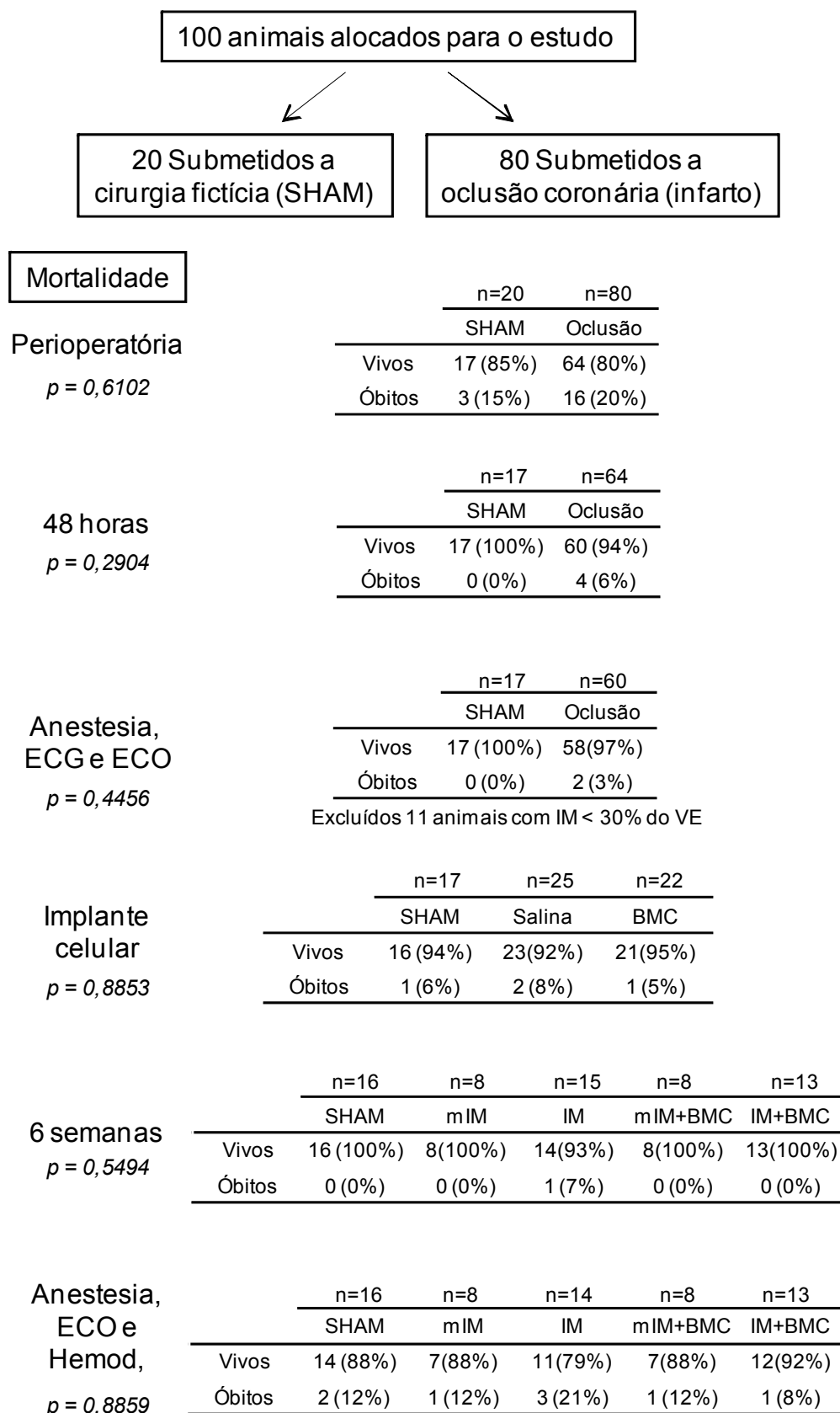
#### **4.2. Mortalidade perioperatória e durante o seguimento do estudo.**

Os dados referentes à mortalidade (Figura 1) não configuraram nenhuma diferença entre os grupos ou procedimentos do ponto de vista estatístico. Foram alocados um total de 100 animais, dos quais 80 foram submetidos à cirurgia de oclusão coronariana, e 20 à cirurgia fictícia (grupo SHAM). A mortalidade perioperatória desta cirurgia foi de 15% nos SHAM e 20% nos submetidos à oclusão arterial. Nenhum animal foi a óbito nas 48 horas seguintes à cirurgia fictícia do infarto, mas 6,25% dos animais submetidos à oclusão coronariana morreram durante este período. O procedimento de anestesia para avaliação ecocardiográfica pré-transplante após as 48 horas de oclusão, cursou com dois óbitos no grupo com oclusão (3,33%) e nenhuma morte no grupo SHAM. Com a exclusão de 11 animais com infartos menores que 30% nesta primeira avaliação ecocardiográfica, a amostragem ficou composta por 64 ratas, sendo 17 SHAM e 47 infartadas. Após randomização dos grupos com infarto, o procedimento cirúrgico para implante celular levou a apenas um óbito (4,5%) e a injeção solução salina levou a dois óbitos (8%). Ademais, houve também um óbito no grupo SHAM onde foi injetada solução salina (5,8%), sem diferenças também nesta avaliação.

Durante as seis semanas subseqüentes ao infarto e implante celular, ocorreu somente óbito de um animal, pertencente ao grupo IM. No procedimento de anestesia e avaliação do ECO após seis semanas de infarto e transplante celular, dois animais SHAM morreram (12%) enquanto quatro óbitos foram verificados no grupo infartado com injeção de salina (15,38%) e dois óbitos no grupo infartado com injeção de BMC (6,89%). Após a distribuição dos animais nos respectivos grupos, a mortalidade calculada foi de 12,5% para ambos os grupos com infartos moderados (mIM e mIM+BMC) e 21,4% para os IM e 7,69% para os IM+BMC.

#### **4.3. Isolamento das células e procedimento de transplante**

O processo de extração da MO dos ratos machos doadores e isolamento da fração mononuclear cursou com rendimento de, em média,  $23,52 \pm 6,58 \times 10^6$  células para cada rato macho jovem, com viabilidade média de  $96,5 \pm 1,2\%$ . Foram injetadas, em média,  $6,17 \pm 0,08 \times 10^6$  células para cada coração infartado das ratas fêmeas receptoras. Três animais foram excluídos do protocolo, porque nestes, o procedimento de implante das células foi visivelmente falho, com nítido vazamento de solução no momento da injeção intramiocárdica.



**Figura 1** – Acompanhamento da mortalidade dos animais. Não houve diferença estatística em nenhuma das comparações entre os grupos. Teste do Qui-quadrado bi-caudal.

#### 4.4. Detecção das células mononucleares transplantadas

Para a análise de PCR para o segmento de DNA do gene Sry específico para o cromossomo Y, foram utilizados *primers* específicos possibilitando que os exames de PCR produzissem amplificação dos segmentos de DNA identificáveis nas radiofotografias mostradas na Figura 2. Conforme pode ser observado, as reações de amplificação das amostras controle-positivo, compostas por VE de ratos machos, produziram a seqüência Y específica com aproximadamente 400 pares de bases. Todavia, esta mesma banda não foi identificada em nenhuma amostra controle-negativo, compostas por VE de fêmeas sem qualquer intervenção. Ademais, as análises de amostras processadas a partir de ventrículos esquerdos de ratas fêmeas infartadas submetidas à terapia, e colhidas após tempos diversos de implante celular, produziram a mesma seqüência Y específica identificada no controle-positivo, porém com densidade óptica menor. Bandas mais nítidas do fragmento Y específico foram identificadas nas amostras colhidas após dez minutos, um e dois dias de implante, com intensidade das bandas diminuindo proporcionalmente ao aumento do tempo decorrido após o transplante para a coleta do material. Ademais, ainda foram identificadas fracas bandas do fragmento Y específico das células implantadas nas amostras de corações colhidas após seis semanas de IM e terapia celular, tempo este utilizado para realização dos demais estudos experimentais do presente trabalho.

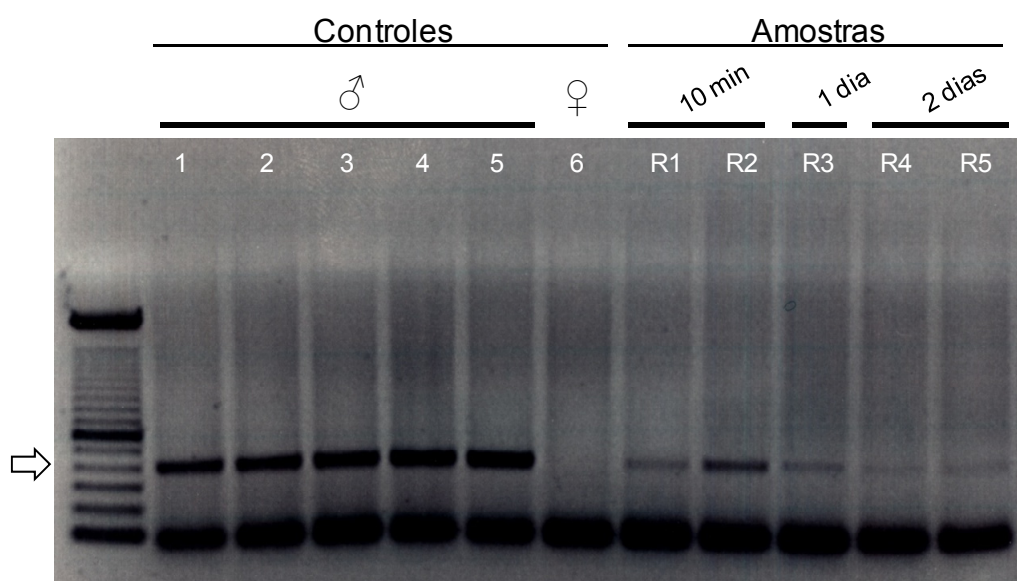
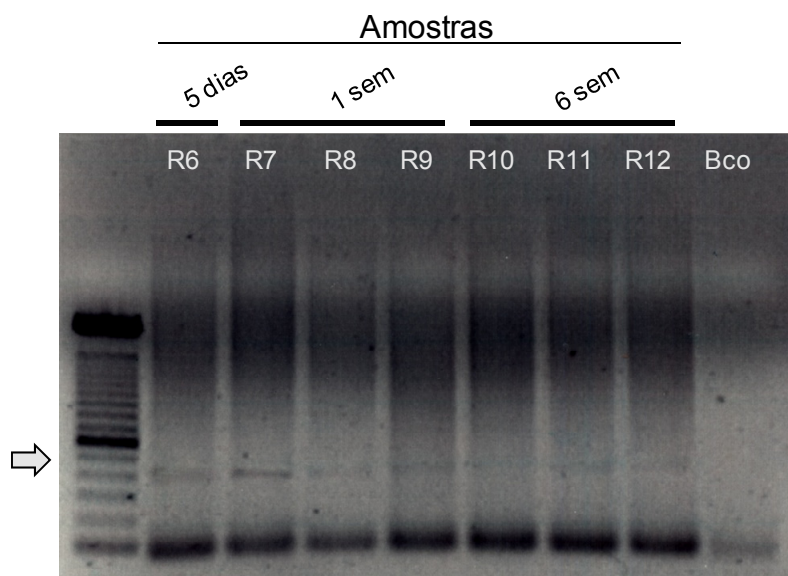


Figura 2 (continua)



**Figura 2** – Radiofotografias típicas dos produtos de PCR para amostras de VE de 5 machos (controles positivos ♂ 1 a 5) e 1 fêmea (controle negativo ♀ 6) Lewis sem qualquer intervenção experimental; e de amostras de VE de ratas infartadas colhidas após 10 minutos (R1 e R2), 1 dia (R3), 2 dias (R4 e R5), 5 dias (R6), 1 semana (R7 a R9) e 6 semanas (R10 a R12) implante de células mononucleares provenientes de medulas-ósseas de ratos machos. A seta indica o segmento Y específico (~400 pares de bases) do gene Sry (*sex-determining region Y*).

## 4.5. Avaliação por ecocardiografia Doppler antes da terapia

### 4.5.1. Tamanho dos infartos pré-terapia celular

De acordo com os resultados do Anexo 1, verificamos que a análise por ECO possibilita estimar com comprovada acurácia o tamanho do infarto do miocárdio evidenciado pela porção acinética da parede do VE ao exame. A cirurgia fictícia não promoveu qualquer alteração visível sugestiva de infarto, enquanto a oclusão cirúrgica da artéria coronária resultou em infartos variando entre 7 e 55% do VE. Após exclusão dos infartos menores que 30% do VE, separação entre infartos moderados (de 30 a 39% do VE) e grandes (40% ou maior), e randomização entre injeção de BMC e solução salina, o tamanho médio dos infartos de acordo com a avaliação do ECO pré-transplante (Tabela 2) foi: mIM:  $35,5 \pm 1,1\%$  do VE e mIM+BMC:  $35,2 \pm 1,5\%$ , IM:  $44,3 \pm 1,5\%$  e IM+BMC:  $43,2 \pm 1,1\%$ , não havendo diferença estatística entre os grupos placebo e tratados ( $p > 0,05$ ).

#### **4.5.2. Estudo morfo-funcional pré-terapia celular**

Os parâmetros do ECO foram analisados na forma absoluta e indexada pela massa corpórea do animal, mas como as massas dos animais não se diferiram entre os grupos, essa manobra de indexação não modificou as diferenças. Neste manuscrito somente são apresentados os valores absolutos (Tabelas 2a e 2b).

Como observado na tabela 2a, nenhuma diferença estatística foi detectada na área transversas do VE ao fim da diástole para os infartos moderados em relação aos SHAM, com apenas os animais com grandes infartos apresentando valores elevados. Os animais infartados apresentaram maiores áreas sistólicas quando comparados ao grupo SHAM, proporcional ao tamanho do infarto, com as medidas dos grupos com grandes infartos significativamente maiores que aquelas dos grupos com moderados infartos.

A avaliação funcional indicou que a fração de encurtamento da área transversa (FEAT) já se apresentava deprimida nos animais infartados comparados ao grupo SHAM, sendo a FEAT dos animais com grandes infartos menor que a dos animais com infartos moderados. O estudo da função diastólica foi representado pela análise das velocidades máximas das ondas E e A, e da relação entre as ondas E/A (Tabela 2a). As diferenças numéricas observadas entre os valores da onda E dos grupos experimentais não assumiram níveis de significância ( $p > 0,05$ ). Entretanto, as médias das velocidades máximas da onda A nos grupos com grandes infartos estavam significativamente deprimidas em comparação aquelas do grupo SHAM e com infartos moderados. O mesmo comportamento foi verificado na análise estatística da relação E/A dos grupos experimentais, elevada somente nos infartos de grandes dimensões. A hipertensão arterial pulmonar, suspeitada pela verificação do entalhe na curva do fluxo de saída da válvula pulmonar não foi diagnosticada em nenhum dos animais avaliados às 48 horas após oclusão coronariana.

#### **4.5.3. Homogeneidade entre os grupos tratados e não tratados.**

É importante frisar que, após avaliação ecocardiográfica e randomização dos grupos para terapia ou placebo, a análise estatística demonstrou não haver diferença significativa em quaisquer parâmetros morfológicos ou funcionais (Tabela 2b) entre os grupos tratados e não tratados (mIM vs. mIM+BMC; ou IM vs. IM+BMC), caracterizando total homogeneidade entre os grupos pares.

**Tabela 2a - Avaliação ecocardiográfica após 48h de oclusão**

	SHAM (n = 16)	Inf. Moderados (mIM) (n = 21)	Inf. Grandes (IM) (n = 22)	p
<b>Caracterização morfológica</b>				
IM (% do VE)	-	35,33± 0,92	43,74 ± 0,91 §	< 0,0001
AdVE (mm <sup>2</sup> )	25,78 ± 0,91	28,08 ± 1,34	32,14 ± 0,97 *§	0,0014
AsVE (mm <sup>2</sup> )	10,49 ± 0,52	16,38 ± 0,71 *	23,30 ± 0,91 *§	< 0,0001
<b>Caracterização funcional</b>				
FEAT (%)	59,1 ± 1,1	44,7 ± 1,5 *	30,5 ± 1,1 *§	< 0,0001
Onda E (cm/s)	68,0 ± 4,0	69,2 ± 2,3	71,7 ± 1,5	0,5302
Onda A (cm/s)	34,5 ± 1,1	32,1 ± 1,7	24,1 ± 2,0 *§	0,0009
Relação E/A	1,90 ± 0,09	2,03 ± 0,10 *	3,64 ± 0,27 *§	< 0,0001
Incidência de HP	0 %	0 %	0 %	-

Dados (média ± e.p.m.) agrupados retrospectivamente após composição dos grupos experimentais. AdVE = área transversal do VE na diástole; AsVE = área transversal do VE na sístole; FEAT = fração de encurtamento da área transversa; HP = hipertensão pulmonar. Os valores de p na tabela resultam de ANOVAs 1-via. \*p < 0,05 vs. SHAM; e §p < 0,05 vs. infartos moderados.

**Tabela 2b – Homogeneidade entre os grupos submetidos à injeção de salina ou BMC**

	mIM (n = 8)	mIM+BMC (n = 13)	p	IM (n = 8)	IM+BMC (n = 14)	p
<b>Caracterização morfológica</b>						
IM (% do VE)	35,5 ± 1,1	35,2 ± 1,5	<b>0,8667</b>	44,3 ± 1,5	43,2 ± 1,1	<b>0,5511</b>
AdVE (mm <sup>2</sup> )	28,30 ± 1,62	27,91 ± 2,10	<b>0,8929</b>	32,78 ± 1,97	31,66 ± 0,93	<b>0,5842</b>
AsVE (mm <sup>2</sup> )	16,42 ± 1,03	16,35 ± 1,03	<b>0,9651</b>	24,76 ± 1,83	23,37 ± 0,82	<b>0,1717</b>
<b>Caracterização funcional</b>						
FEAT (%)	45,6 ± 1,7	44,2 ± 2,3	<b>0,6919</b>	29,00 ± 2,1	31,6 ± 1,0	<b>0,2304</b>
Onda E (cm/s)	69,2 ± 3,7	69,3 ± 3,2	<b>0,9855</b>	72,3 ± 2,9	71,4 ± 1,7	<b>0,7970</b>
Onda A (cm/s)	33,8 ± 3,4	30,8 ± 1,8	<b>0,4098</b>	25,91 ± 3,9	22,6 ± 1,8	<b>0,4418</b>
Relação E/A	1,88 ± 0,18	2,15 ± 0,12	<b>0,2283</b>	3,32 ± 0,46	3,86 ± 0,33	<b>0,3444</b>
Incidência de HP	0 %	0 %	-	0 %	0 %	-

Dados (média ± e.p.m.) agrupados retrospectivamente após randomização em tratados ou não tratados. AdVE = área transversal do VE na diástole; AsVE = área transversal do VE na sístole; FEAT = fração de encurtamento da área transversa; HP = hipertensão pulmonar. Os valores de p na tabela resultam de testes t de Student não pareados, mostrando satisfatória homogeneidade entre os grupos submetidos à injeção de salina e BMC.



#### 4.6. Determinação das massas cardíacas e teor de água no pulmão

As avaliações desses parâmetros biométricos estão representadas na Tabela 3. A indexação das massas ventriculares e pulmonar pelas respectivas massas corpóreas dos animais no dia do sacrifício não modificou, de forma importante, as diferenças encontradas. Quanto à análise da massa do VE, houve aumento nos grupos infartados sugerindo hipertrofia cardíaca, mas de forma significativa somente no grupo IM ( $p < 0,05$ ) comparados ao SHAM. Com isso, somente em IM+BMC houve prevenção significativa desse aumento. A massa do VD foi maior somente em IM, e IM+BMC foi estatisticamente inferior aos IM e semelhantes ao SHAM.

**Tabela 3 - Parâmetros biométricos**

	SHAM (n = 12)	mIM (n = 7)	mIM+BMC (n = 8)	IM (n = 10)	IM+BMC (n = 12)
<b>Massa do VE</b>					
Absoluta (mg)	562 ± 32	622 ± 10 *	564 ± 20	675 ± 26 *	574 ± 21 #
Indexada (mg/g)	2,30 ± 0,10	2,76 ± 0,09 *	2,57 ± 0,09	2,97 ± 0,08 *	2,62 ± 0,09
<b>Massa do VD</b>					
Absoluta (mg)	152 ± 11	175 ± 12	136 ± 7	290 ± 35 * <sup>§</sup>	180 ± 21 #
Indexada (mg/g)	0,64 ± 0,05	0,77 ± 0,05	0,62 ± 0,03	1,26 ± 0,15 * <sup>§</sup>	0,82 ± 0,09 #
<b>Massa pulmonar</b>					
Absoluta (mg)	860 ± 67	985 ± 58	915 ± 54	1.641 ± 191 * <sup>§</sup>	967 ± 98 #
Indexada (mg/g)	3,55 ± 0,30	4,65 ± 0,41	4,18 ± 0,26	7,16 ± 0,84 * <sup>§</sup>	4,45 ± 0,46 #
<b>Massa seca pulmonar</b>					
Absoluta (mg)	178 ± 13	190 ± 13	192 ± 12	300 ± 36 * <sup>§</sup>	200 ± 19 #
Indexada (mg/g)	0,78 ± 0,06	0,84 ± 0,06	0,87 ± 0,05	1,31 ± 0,15 * <sup>§</sup>	0,91 ± 0,09 #
<b>Teor de água no pulmão</b>					
(%)	78,76 ± 0,30	80,38 ± 0,38 *	79,03 ± 0,27 #	81,83 ± 0,18 * <sup>§</sup>	79,31 ± 0,28 #

Média ± e.p.m. das massas ventriculares esquerda (VE) e direita (VD), e do pulmão direito analisados sob a forma absoluta ou indexadas pela massa corpórea do respectivo animal; e do teor de água no pulmão direito. \* $p < 0,05$  vs. SHAM; # $p < 0,05$  vs. não-tratado; e <sup>§</sup> $p < 0,05$  vs. mIM. ANOVA 1-via seguida do teste de Bonferroni.

A massa úmida do pulmão direito dos IM foi estatisticamente maior que todos os demais grupos, e em IM+BMC foi normal. Após dessecação em estufa por 24 horas, não houve modificações no comportamento identificado: a massa seca do

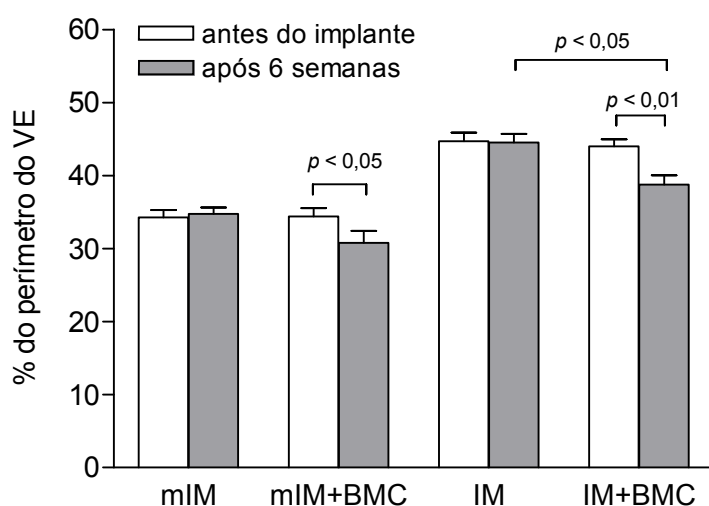
pulmão direito do grupo IM foi maior que a dos demais grupos e, novamente, a terapia com BMC foi capaz de prevenir este aumento. Quando foi calculado o teor percentual de água no pulmão direito, pôde-se notar acúmulo significativo de água nos pulmões nos grupos mIM e IM, enquanto os grupos tratados tiveram teores significativamente menores e equivalentes aos níveis do grupo SHAM.

#### 4.7. Avaliação por ecocardiografia Doppler após terapia.

##### 4.7.1. Tamanho dos infartos após terapia celular.

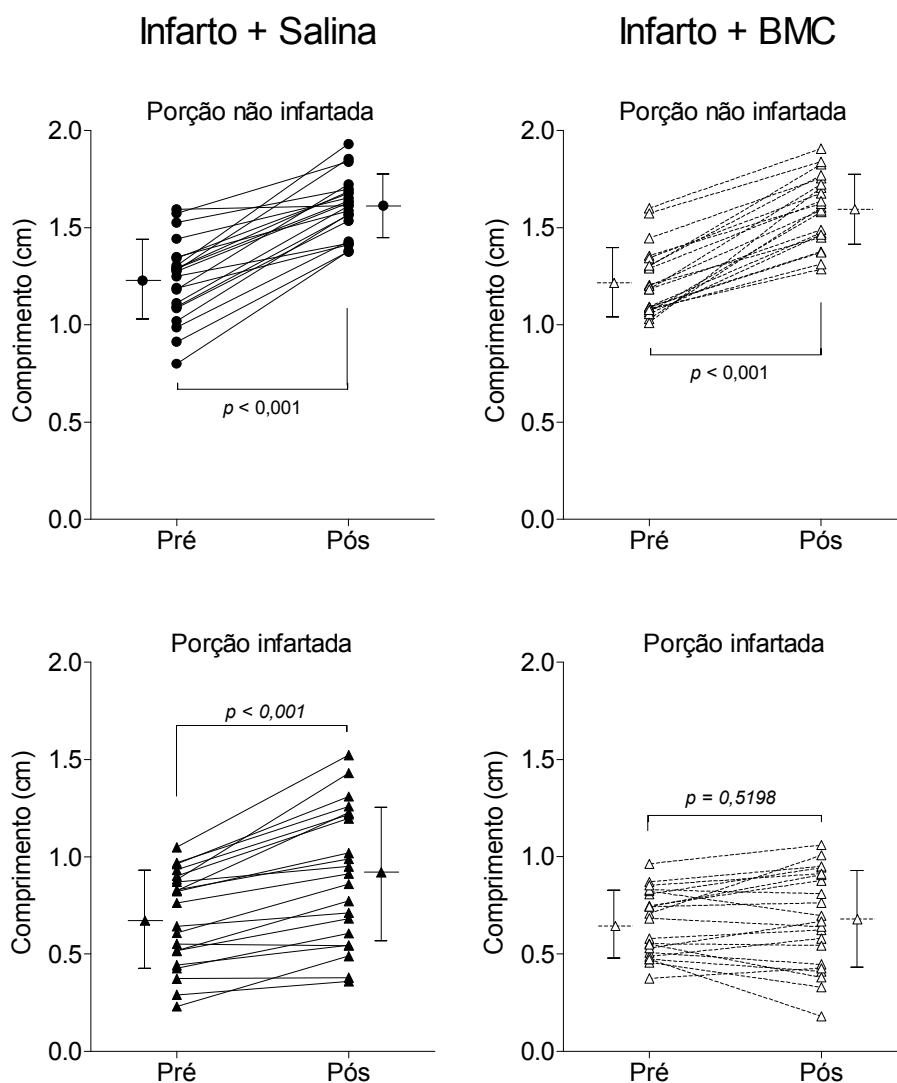
Os resultados dos tamanhos dos infartos relativos à circunferência do VE depois de decorridas seis semanas do implante celular estão ilustrados graficamente na Figura 3.

A análise pelo ECO da extensão do infarto demonstrou tamanho médio estatisticamente inferior no grupo IM+BMC ( $38,0 \pm 1,4\%$  do VE) em relação ao grupo não-tratado IM ( $44,4 \pm 1,6\%$  do VE), e no grupo mIM+BMC ( $30,7 \pm 2,3\%$  do VE) em relação a mIM ( $34,3 \pm 1,0\%$  do VE). Considerando a análise destes valores em relação à avaliação pré-terapia, não houve mudança significativa nos grupos infartados sem terapia. Todavia, nos grupos mIM+BMC e IM+BMC, houve diferenças entre as medidas antes e após seis semanas de terapia ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$  respectivamente).



**Figura 3** – Tamanho do IM avaliado pelo ECO antes e após seis semanas de terapia nos grupos experimentais. As barras representam médias  $\pm$  e.p.m. ANOVA 2-vias seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni.

Ao avaliar a evolução da medida do comprimento da porção remanescente do VE e da cicatriz do infarto (Figura 4), evidenciamos que o comprimento médio da porção não infartada aumentou de forma significativa em todos os animais infartados com ou sem terapia. Já o comprimento médio da cicatriz, que também aumentou nos animais infartados sem terapia, não foi alterado com o decorrer das seis semanas.

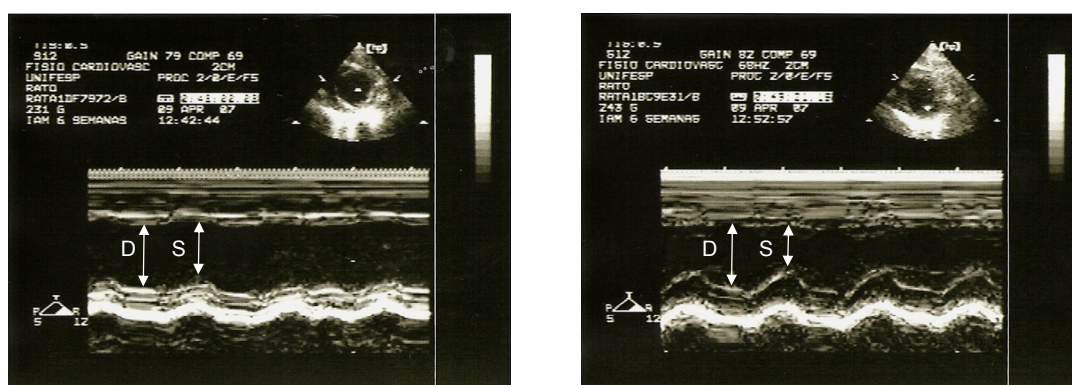


	Porção não infartada (cm)		Porção infartada (cm)	
	Inicial	Final	Inicial	Final
Salina	1,23 ± 0,04	1,61 ± 0,03 <sup>†</sup>	0,67 ± 0,05	0,91 ± 0,07 <sup>†</sup>
BMC	1,22 ± 0,04	1,59 ± 0,04 <sup>†</sup>	0,65 ± 0,04	0,68 ± 0,05

**Figura 4** – medidas dos comprimentos da porção contrátil não infartada e da porção acinética (infarto) nos grupos experimentais antes (Pré) e após seis semanas (Pós). Os símbolos laterais representam a média ± desvio padrão. <sup>†</sup> $p < 0,05$  Final vs. Inicial.

#### 4.7.2. Estudo morfo-funcional após terapia celular.

Pela Tabela 4, pode-se verificar que a área diastólica do VE nos grupos infartados não tratados (mIM e IM) foi maior que no grupo SHAM. Enquanto o grupo mIM+BMC foi diferente do seu par não tratado, IM+BMC apresentou média significativamente inferior ao IM. Porém, ambos os grupos tratados tiveram valores ainda superiores ao grupo SHAM. Ao fim da sístole, as áreas transversas do VE também foram maiores em todos os grupos infartados comparados ao grupo SHAM, e o grupo IM+BMC apresentou área menor que IM, sem diferença estatisticamente significativa entre mIM+BMC e mIM.



**Ilustração 3** - Registros ecocardiográficos do VE obtidos em animal do grupo IM (à esquerda) e do grupo IM+BMC (à direita) em modo M. D = diástole; S = sístole

A análise estatística das diferenças percentuais ocorridas nos parâmetros ecocardiográficos tomados em relação aos seus respectivos valores na avaliação pré-terapia apontou informações interessantes a respeito da evolução temporal da disfunção cardíaca pós-IM, bem como os possíveis efeitos do implante celular sobre esta (Figura 5). Embora a AdVE aumentasse discretamente no grupo SHAM ( $7,0 \pm 6,7\%$  de aumento em relação à avaliação anterior), os grupos com infarto tiveram dilatação ventricular significativa, e o grupo mIM+BMC cursou com aumento ( $45,6 \pm 10,9\%$ ) não diferente de mIM ( $45,6 \pm 14,0\%$ ). Apesar disso, IM+BMC exibiu dilatação do VE ( $45,6 \pm 9,9\%$ ) estatisticamente inferior ao grupo IM ( $82,5 \pm 6,6\%$ ). Comportamento muito semelhante foi observado na evolução da AsVE: houve um discreto aumento no grupo SHAM ( $9,0 \pm 7,7\%$ ), maior elevação nos grupos infartados, sem diferença entre mIM ( $43,6 \pm 9,7\%$ ) e mIM+BMC ( $37,6 \pm 10,8\%$ ), e menor aumento no grupo IM+BMC ( $38,3 \pm 6,9\%$ ) quando comparado ao IM ( $76,9 \pm 10,2\%$ ).

A avaliação da função sistólica (Tabela 4) indicou FEAT deprimida nos animais infartados em relação ao SHAM. Ademais, IM+BMC apresentou, de forma estatisticamente significativa, média maior que seu grupo par não tratado (IM). A avaliação da evolução temporal (Figura 5) indicou que o grupo SHAM aumentou a FEAT em apenas  $2,5 \pm 1,6\%$  em relação à sua primeira avaliação, permanecendo com este parâmetro dentro de valores normais; mIM aumentou apenas  $1,9 \pm 5,3\%$ , permanecendo moderadamente deprimido; e mIM+BMC também não aumentou de forma significativa ( $5,7 \pm 3,8\%$ ). Interessantemente, enquanto o grupo IM permaneceu com a FEAT deprimida, com aumento de apenas  $4,3 \pm 4,9\%$ , IM+BMC teve aumento médio de  $19,8 \pm 8,9\%$  na função sistólica, estatisticamente superior.

A função diastólica avaliada pelas velocidades máximas das ondas E e A, e pela relação E/A encontra-se também representada na Tabela 4. Não foram detectadas diferenças estatísticas entre os grupos mIM e mIM+BMC, e o grupo SHAM. Na velocidade máxima da onda E foi observada diferença significativa somente no grupo IM em relação aos demais, ainda que as alterações percentuais em relação à primeira avaliação (Figura 5) não foram diferentes entre os grupos: o aumento da onda E no grupo IM ( $26 \pm 6\%$ ) não foi diferente de IM+BMC ( $15 \pm 7\%$ ), SHAM ( $13 \pm 3\%$ ), mIM ( $11 \pm 6\%$ ) ou mIM+BMC ( $4 \pm 6\%$ ).

Na análise da onda A, os valores de IM foram significativamente menores em relação aos grupos SHAM e mIM, mas o grupo IM+BMC apresentou nível intermediário e estatisticamente indistinguível do SHAM. O que também significa dizer que, em relação à primeira avaliação, a onda A teve elevação discreta e em magnitude semelhante nos grupos SHAM ( $3,0 \pm 2,5\%$ ), mIM ( $2,4 \pm 9,1\%$ ) e mIM+BMC ( $11,0 \pm 5,0\%$ ), enquanto em IM reduziu  $25 \pm 9\%$ , e em IM+BMC aumentou  $40 \pm 13\%$  ( $p < 0,05$  vs. IM).

A razão E/A mostrou-se elevada no grupo IM em relação ao SHAM, e IM+BMC apresentou valores intermediários e não diferentes do SHAM (Tabela 4). Em relação à primeira avaliação ecocardiográfica, a razão E/A aumentou  $14 \pm 6\%$  no SHAM e  $16 \pm 10\%$  em mIM, mas reduziu  $6 \pm 3\%$  em mIM+BMC. De forma interessante, esta razão aumentou cerca de 90% no grupo IM enquanto reduziu  $10 \pm 14\%$  no grupo IM+BMC (Figura 5).

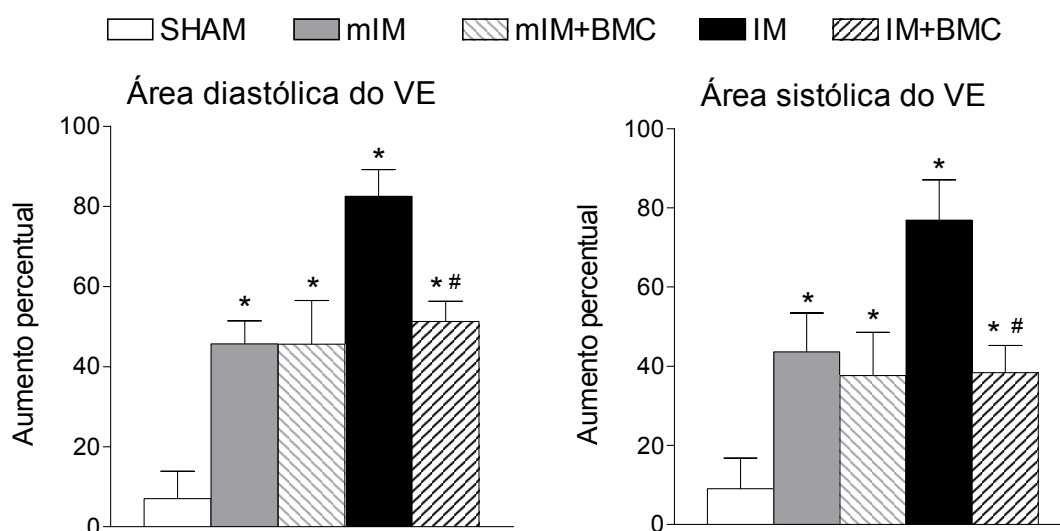
Na análise da curva do Doppler da artéria pulmonar, foi identificado padrão sugestivo de hipertensão pulmonar somente nos grupos IM e IM+BMC. Ademais, o teste do Qui-quadrado da tabela de contingência formada por esses dados

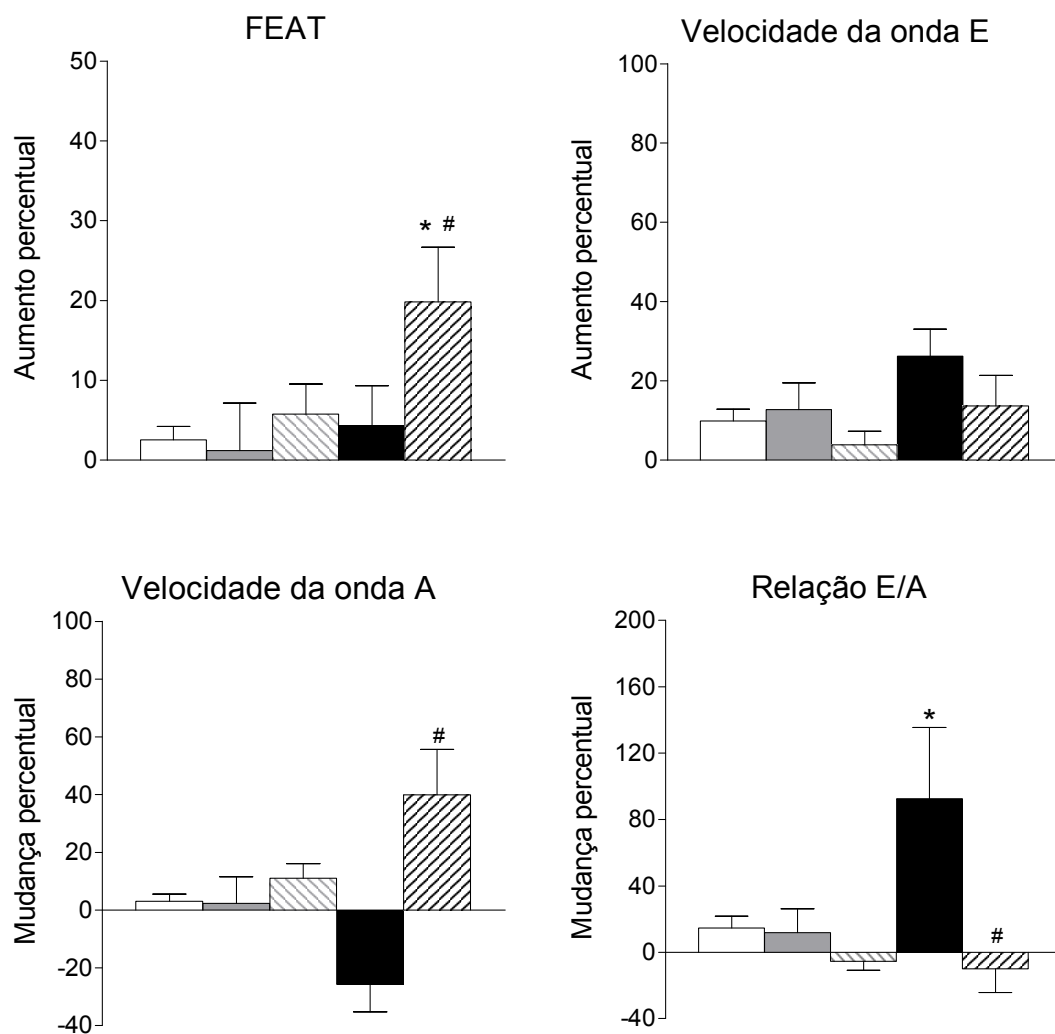
demonstrou que a incidência de hipertensão pulmonar foi estatisticamente menor no grupo IM+BMC (17%) que no grupo sem terapia, IM (63%).

**Tabela 4 – Avaliação ecocardiográfica após seis semanas de seguimento.**

	SHAM (n = 15)	mIM (n = 8)	mIM+BMC (n = 13)	IM (n = 8)	IM+BMC (n = 13)	ANOVA <i>p</i>
<b>Morfologia</b>						
IM (% do VE)	-	34,3 ± 1,0	30,7 ± 2,3	44,4 ± 1,6	38,0 ± 1,4 <sup>#</sup>	-
AdVE (mm <sup>2</sup> )	27,5 ± 1,7	40,8 ± 1,9 <sup>*</sup>	38,0 ± 2,3 <sup>*</sup>	59,0 ± 2,5 <sup>*§</sup>	47,7 ± 2,0 <sup>*#</sup>	< 0,0001
AsVE (mm <sup>2</sup> )	11,3 ± 0,7	23,5 ± 1,9 <sup>*</sup>	20,2 ± 1,9 <sup>*</sup>	42,5 ± 1,9 <sup>*§</sup>	29,6 ± 1,9 <sup>*#</sup>	< 0,0001
<b>Função</b>						
FEAT (%)	60,1 ± 1,2	46,4 ± 3,1 <sup>*</sup>	47,5 ± 2,1 <sup>*</sup>	29,4 ± 1,7 <sup>*§</sup>	38,3 ± 2,4 <sup>*#</sup>	< 0,0001
Onda E (m/s)	74,9 ± 3,7	77,3 ± 2,6	71,5 ± 2,2	90,4 ± 3,9 <sup>*</sup>	81,1 ± 4,9 <sup>#</sup>	0,0209
Onda A (m/s)	36,4 ± 2,0	34,3 ± 4,2	35,3 ± 1,8	17,5 ± 2,1 <sup>*§</sup>	29,5 ± 3,4	0,0003
Relação E/A	2,16 ± 0,15	2,22 ± 0,20	2,07 ± 0,12	5,23 ± 0,69 <sup>*§</sup>	3,52 ± 0,74	< 0,0001
HP	0 %	0 %	0 %	63 %	17 %	0,0353 <sup>x</sup>

Dados morfo-funcionais (média ± e.p.m.) adquiridos pelo ECO. AdVE = área transversal do VE na diástole; AsVE = área transversal do VE na sístole; FEAT = fração de encurtamento da área transversa. HP = incidência de hipertensão pulmonar. <sup>\*</sup>*p* < 0,05 vs. SHAM; e <sup>§</sup>*p* < 0,05 vs. mIM; e <sup>#</sup>*p* < 0,05 vs. IM, ANOVA 1-via seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni, <sup>x</sup> valor do *p* pelo teste do Qui-quadrado.





**Figura 5** – Alterações percentuais (média ± e.p.m.) nos parâmetros ecocardiográficos de dilatação ventricular, função sistólica e diastólica em relação à avaliação inicial (48h de oclusão). \* $p < 0,05$  vs. SHAM e # $p < 0,05$  vs. não tratado, ANOVA 1-via seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni.

#### 4.8. Estudo hemodinâmico da função cardíaca

##### 4.8.1. Estudo hemodinâmico sob condições basais

O estudo dos parâmetros hemodinâmicos nos animais anestesiados (Tabela 5) não foi suficientemente sensível em mostrar disfunção cardíaca nos grupos de tamanhos moderados de IM. Houve semelhança nos valores de PSVE do grupo SHAM em relação a mIM e IM, assim como dos grupos submetidos à terapia celular. Entretanto, apesar dos animais do grupo mIM não apresentarem alterações perceptíveis na PDfVE, este parâmetro estava significativamente elevado no grupo

IM. Em IM+BMC, a PDfVE foi menor que IM e similar a dos SHAM. O mesmo comportamento foi evidenciado na análise da derivada positiva máxima de pressão ( $+dP/dt_{m\acute{a}x}$ ) com depressão significativa somente no grupo IM e prevenção nos IM+BMC. A derivada negativa máxima de pressão ( $-dP/dt_{m\acute{a}x}$ ), frequência cardíaca, assim como as variáveis de ejeção (DC e VSE) e desempenho (TS) ventriculares não foram afetados de forma significativa pelo infarto ou pelas terapias aplicadas, sem diferenças em relação ao SHAM sob estas condições basais de experimentação.

A indexação dos parâmetros provavelmente influenciáveis pela massa corpórea não influenciou nos resultados estatísticos dessa análise, mantendo-se o índice cardíaco, índice do volume sistólico ejetado e índice do trabalho sistólico semelhantes em todos os grupos experimentais em relação ao SHAM.

#### **4.8.2. Estudo hemodinâmico durante sobrecarga súbita de pressão**

As mudanças percentuais nos parâmetros hemodinâmicos conseqüentes ao estresse súbito da pós-carga encontram-se representadas na Figura 6. O aumento súbito da pressão sistólica foi semelhante ( $p = 0,7510$ ) em todos os grupos estudados: SHAM:  $63,9 \pm 4,2\%$ , mIM:  $61,1 \pm 2,2\%$ ; mIM+BMC:  $66,1 \pm 4,5\%$ ; IM:  $61,7 \pm 4,1\%$  e IM+BMC:  $67,0 \pm 2,3\%$  de aumento em relação ao valor basal. No grupo SHAM houve aumento concomitante das  $dP/dt_{m\acute{a}x}$  positiva ( $59,0 \pm 7,0\%$ ) e negativa ( $70,7 \pm 16,9\%$ ). Este aumento foi menor no grupo mIM ( $35,3 \pm 7,4\%$  e  $8,7 \pm 16,8\%$  respectivamente,  $p = 0,0406$  vs. SHAM) e inexistente no grupo IM ( $5,9 \pm 3,4\%$  e  $-24,3 \pm 6,3\%$  respectivamente,  $p < 0,001$  vs. SHAM), enquanto nos grupos que receberam BMC, esta resposta foi semelhante à normal (mIM+BMC:  $56,3 \pm 8,3\%$  e  $36,4 \pm 12,5\%$  respectivamente,  $p = 0,0602$  vs. mIM; e IM+BMC:  $54,7 \pm 6,3\%$  e  $27,3 \pm 7,3\%$  respectivamente,  $p < 0,001$  vs. IM).

Embora estatisticamente significativa em alguns grupos (Tabela 6), o decréscimo na frequência cardíaca foi muito pequeno, provavelmente em decorrência do bloqueio barorreflexo causado vagotomia bilateral. Ademais, em todos os grupos, as intensidades destas bradicardias foram semelhantes (SHAM:  $-3,3 \pm 1,2\%$ , mIM:  $-1,8 \pm 1,3\%$ ; mIM+BMC:  $-0,8 \pm 0,8\%$ ; IM:  $-3,7 \pm 1,5$  e IM+BMC:  $-2,6 \pm 0,9\%$ ,  $p = 0,4075$ ).



Tabela 5 - Estudo hemodinâmico sob condições basais

	SHAM (n = 12)	mIM (n = 7)	mIM+BMC (n = 9)	IM (n = 7)	IM+BMC (n = 12)	ANOVA p
PSVE	119,1 ± 3,1	112,4 ± 3,9	113,5 ± 3,4	115,4 ± 2,5	111,2 ± 2,5	<b>0,8174</b>
PDfVE	4,1 ± 0,7	4,8 ± 0,9	6,3 ± 0,5	16,3 ± 2,7 *§	4,9 ± 1,2 #	<b>&lt; 0,001</b>
FC	339 ± 10	323 ± 12	331 ± 12	328 ± 13	337 ± 9	<b>0,1721</b>
+dP/dt <sub>máx</sub>	9.635 ± 383	8.270 ± 536	9.345 ± 225	7.227 ± 367 *	9.035 ± 345 #	<b>0,0008</b>
-dP/dt <sub>máx</sub>	-5.774 ± 344	-5.353 ± 334	-5.801 ± 339	-5.018 ± 275	-5.995 ± 248	<b>0,1292</b>
DC	48,9 ± 7,3	44,3 ± 8,4	44,5 ± 7,6	45,4 ± 9,6	48,4 ± 5,8	<b>0,8303</b>
VSE	0,137 ± 0,008	0,129 ± 0,016	0,130 ± 0,018	0,131 ± 0,014	0,134 ± 0,010	<b>0,9452</b>
TS	0,208 ± 0,017	0,199 ± 0,031	0,207 ± 0,012	0,178 ± 0,020	0,199 ± 0,015	<b>0,5015</b>

## Parâmetros de ejeção e trabalho indexados pelo peso corpóreo

	SHAM (n = 12)	mIM (n = 7)	mIM+BMC (n = 9)	IM (n = 7)	IM+BMC (n = 12)	ANOVA p
IC	222 ± 17	201 ± 23	207 ± 13	188 ± 15	218 ± 15	<b>0,4397</b>
IVSE	0,615 ± 0,040	0,579 ± 0,078	0,614 ± 0,048	0,590 ± 0,029	0,611 ± 0,042	<b>0,9252</b>
ITS	0,931 ± 0,070	0,887 ± 0,146	0,972 ± 0,065	0,878 ± 0,041	0,918 ± 0,080	<b>0,8908</b>

Parâmetros hemodinâmicos (média ± e.p.m.) sob condições basais de experimentação: PSVE = pressão sistólica do VE (mm Hg); PDfVE = pressão diastólica final do VE (mm Hg); dP/dt<sub>máx</sub> = derivadas máximas positiva e negativa da pressão intraventricular (mm Hg/s); DC = débito cardíaco (ml/min); VSE = volume sistólico ejetado (ml); TS = trabalho sistólico (g·m/batimento); e IC = índice cardíaco (ml.min<sup>-1</sup>.kg<sup>-1</sup>); IVSE = índice do volume ejetado (ml.kg<sup>-1</sup>); e ITS = índice do trabalho sistólico (g·m.bat<sup>-1</sup>.kg<sup>-1</sup>). \*p < 0,05 vs. SHAM; #p < 0,05 vs. não-tratado; e §p < 0,05 vs. mIM, ANOVA 1-via seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni.

No grupo SHAM, a PDfVE aumentou estatisticamente (Tabela 6) quando comparado o pico da sobrecarga pressórica ao seu estado basal, embora esta magnitude de aumento ( $2,9 \pm 0,8$  mm Hg) continua dentro dos padrões normais. Já o grupo mIM cursou com aumento superior na PDfVE ( $14,5 \pm 2,1$  mm Hg de aumento,  $p < 0,01$  vs. SHAM), enquanto em mIM+BMC o aumento ( $4,6 \pm 1,0$  mm Hg,  $p < 0,05$  vs. mIM) foi semelhante ao grupo SHAM. O mesmo ocorreu com o grupo IM que cursou com expressivo aumento ( $29,9 \pm 3,5$  mm Hg de aumento,  $p < 0,001$  vs. SHAM), enquanto em IM+BMC, a PDfVE elevou-se muito pouco ( $5,5 \pm 1,1\%$  de aumento,  $p < 0,001$  vs. IM) também indistinguível do SHAM.

A análise do comportamento do débito cardíaco, volume sistólico ejetado e trabalho sistólico durante a sobrecarga súbita foi bastante complementar e esclarecedora às acima descritas.

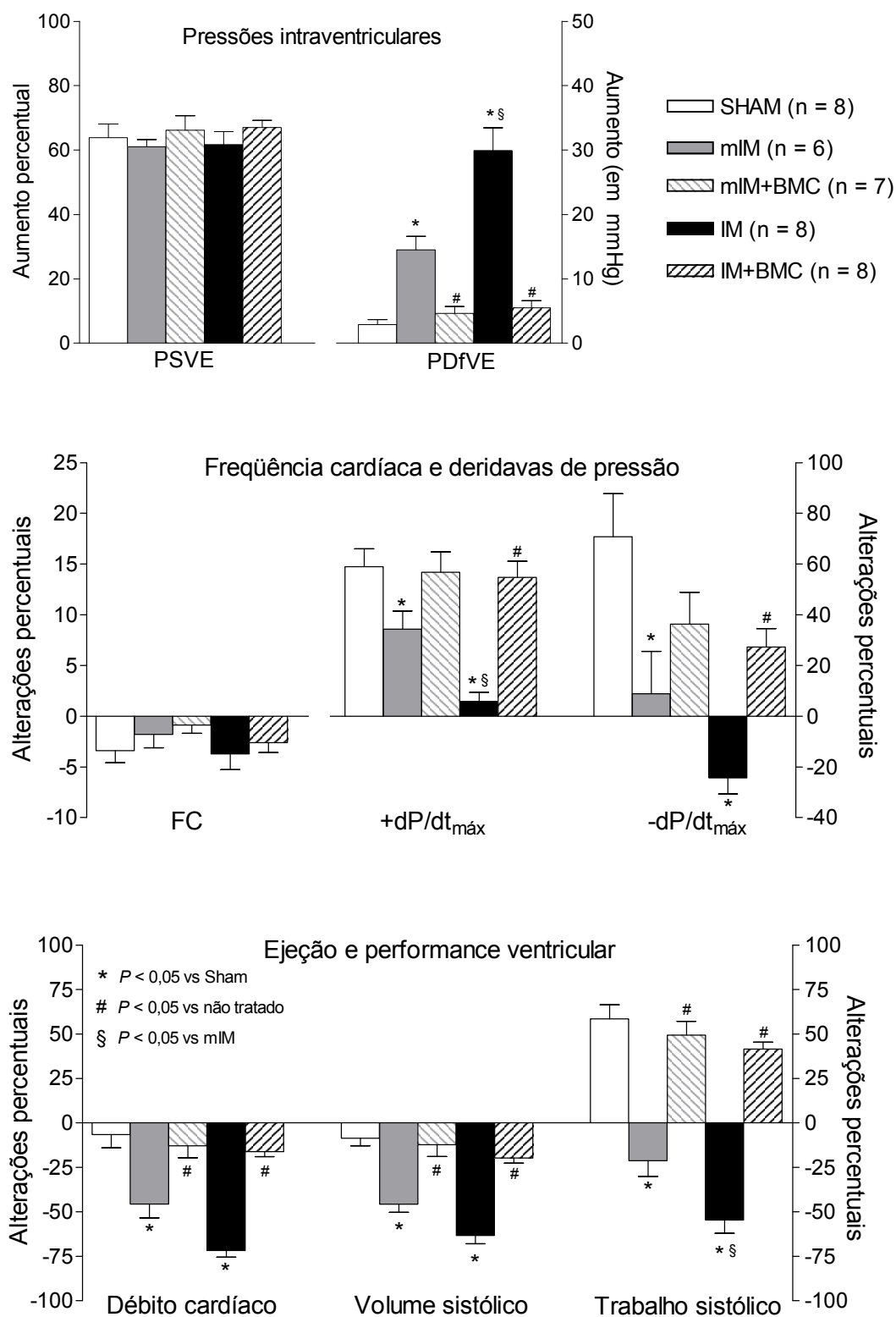
O grupo SHAM, assim como no estudo preliminar do Anexo 2, apresentou discreta redução do débito cardíaco ( $6,5 \pm 7,5\%$  de redução) e do volume sistólico ejetado ( $8,6 \pm 4,2\%$  de redução). Entretanto, esta queda foi significativamente mais intensa nos grupos infartados, e proporcional à extensão do infarto (DC: mIM =  $45,5 \pm 7,8\%$  e IM =  $71,3 \pm 3,7\%$  de redução,  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$  vs. SHAM respectivamente; VSE: mIM =  $45,7 \pm 4,4\%$  e IM =  $63,3 \pm 4,5\%$  de redução,  $p < 0,001$  ambos vs. SHAM). Porém, os grupos tratados apresentaram comportamento semelhante ao SHAM, com prevenção significativa da queda na ejeção ventricular (DC: mIM+BMC =  $12,8 \pm 6,7\%$  e IM+BMC =  $16,2 \pm 2,8\%$  de redução,  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$  vs. mIM e IM respectivamente; e VSE: mIM+BMC =  $12,2 \pm 6,5\%$  e IM+BMC =  $19,7 \pm 2,8\%$  de redução,  $p < 0,001$  vs. mIM e IM respectivamente).

O trabalho sistólico dos animais SHAM aumentou em  $58,4 \pm 8,0\%$ , enquanto decaiu significativamente nos grupos mIM ( $21,1 \pm 8,9\%$  de redução,  $p < 0,001$  vs. SHAM) e IM ( $54,6 \pm 7,4\%$  de redução;  $p < 0,001$  vs. SHAM) denunciando o prejuízo no desempenho ventricular. De forma interessante, os grupos tratados, mesmo com consideráveis tamanhos de infarto, cursaram com aumento na geração de trabalho em  $49,3 \pm 7,8\%$  nos mIM+BMC ( $p < 0,001$  vs. mIM) e  $41,5 \pm 3,8\%$  nos IM+BMC ( $p < 0,001$  vs. IM).

**Tabela 6 - Parâmetros hemodinâmicos antes e no pico da sobrecarga.**

	SHAM (n = 8)	mIM (n = 6)	mIM+BMC (n = 8)	IM (n = 7)	IM+BMC (n = 8)	p
<b>PSVE</b>						
Basal	111,3 ± 2,2	108,2 ± 5,1	105,3 ± 4,1	108,1 ± 3,7	101,6 ± 3,2	<b>0,3960</b>
Pico	187,3 ± 6,3 <sup>†</sup>	173,8 ± 5,8 <sup>†</sup>	174,6 ± 8,4 <sup>†</sup>	170,9 ± 8,6 <sup>†</sup>	169,9 ± 6,5 <sup>†</sup>	<b>0,2606</b>
<b>PDfVE</b>						
Basal	3,6 ± 0,8	5,4 ± 1,3	2,2 ± 0,6	14,1 ± 2,4 <sup>*</sup>	4,6 ± 0,5 <sup>#</sup>	<b>&lt;0,001</b>
Pico	7,2 ± 1,1 <sup>†</sup>	19,9 ± 2,2 <sup>†*</sup>	7,1 ± 0,9 <sup>†#</sup>	44,0 ± 4,2 <sup>†*§</sup>	10,1 ± 1,1 <sup>†#§</sup>	<b>&lt;0,001</b>
<b>FC</b>						
Basal	371 ± 11	350 ± 16	340 ± 13	353 ± 10	360 ± 10	<b>0,1740</b>
Pico	358 ± 10 <sup>†</sup>	344 ± 17	337 ± 12	338 ± 10 <sup>†</sup>	350 ± 11 <sup>†</sup>	<b>0,1989</b>
<b>+dP/dt<sub>máx</sub></b>						
Basal	9.723 ± 976	8.438 ± 481	9.285 ± 356	7.673 ± 808	8.839 ± 474	<b>0,1618</b>
Pico	15.106 ± 1.077 <sup>†</sup>	10.960 ± 565 <sup>†</sup>	14.717 ± 714 <sup>†</sup>	8.268 ± 794 <sup>*</sup>	13.415 ± 592 <sup>†#</sup>	<b>&lt;0,001</b>
<b>-dP/dt<sub>máx</sub></b>						
Basal	-5.244 ± 411	-4.715 ± 388	-5.558 ± 360	-5.046 ± 534	-4.887 ± 277	<b>0,5995</b>
Pico	-8.942 ± 6 11 <sup>†</sup>	-5.132 ± 685 <sup>*</sup>	-7.425 ± 604 <sup>†</sup>	-2.830 ± 1199 <sup>*</sup>	-6.425 ± 475 <sup>†#</sup>	<b>&lt;0,001</b>
<b>IC</b>						
Basal	187 ± 23	191 ± 16	161 ± 12	213 ± 11	192 ± 17	<b>0,2411</b>
Pico	175 ± 27	95 ± 13 <sup>†*</sup>	131 ± 10	64 ± 12 <sup>†*</sup>	160 ± 16 <sup>†#</sup>	<b>&lt;0,001</b>
<b>IVSE</b>						
Basal	0,596 ± 0,046	0,590 ± 0,054	0,589 ± 0,045	0,614 ± 0,055	0,530 ± 0,041	<b>0,1048</b>
Pico	0,541 ± 0,043	0,298 ± 0,035 <sup>†*</sup>	0,484 ± 0,025	0,246 ± 0,047 <sup>†*</sup>	0,421 ± 0,032 <sup>†#</sup>	<b>&lt;0,001</b>
<b>ITS</b>						
Basal	0,86 ± 0,11	0,89 ± 0,13	0,81 ± 0,10	1,03 ± 0,10	0,90 ± 0,07	<b>0,1048</b>
Pico	1,34 ± 0,16 <sup>†</sup>	0,68 ± 0,18 <sup>†</sup>	1,17 ± 0,12 <sup>†</sup>	0,50 ± 0,11 <sup>†*</sup>	1,27 ± 0,09 <sup>†#</sup>	<b>0,0084</b>

Média ± e.p.m. dos parâmetros hemodinâmicos adquiridos antes (basal) e durante (pico) da sobrecarga pressórica súbita. PSVE = pressão sistólica do VE (mm Hg); PDfVE = pressão diastólica final do VE (mm Hg); dP/dt<sub>máx</sub> = derivadas máximas positiva e negativa da pressão intraventricular (mm Hg.s<sup>-1</sup>); IC = índice cardíaco (ml.min<sup>-1</sup>.kg<sup>-1</sup>); IVSE = índice do volume ejetado (ml.kg<sup>-1</sup>); e ITS = índice do trabalho sistólico (g.m.bat<sup>-1</sup>.kg<sup>-1</sup>). <sup>†</sup>p < 0,05 Pico vs. basal; <sup>\*</sup>p < 0,05 vs. SHAM; <sup>#</sup>p < 0,05 vs. não-tratado; e <sup>§</sup>p < 0,05 vs. mIM. ANOVA 2-vias seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni.



**Figura 6** – Média  $\pm$  e.p.m. das alterações nos parâmetros hemodinâmicos promovidas por sobrecarga pressórica. Os dados estão representados como % em relação à condição basal. (exceto PDfVE, representada como mm Hg de aumento). Os valores positivos e negativos resultam do aumento ou diminuição respectivamente. ANOVA 1-via seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni.

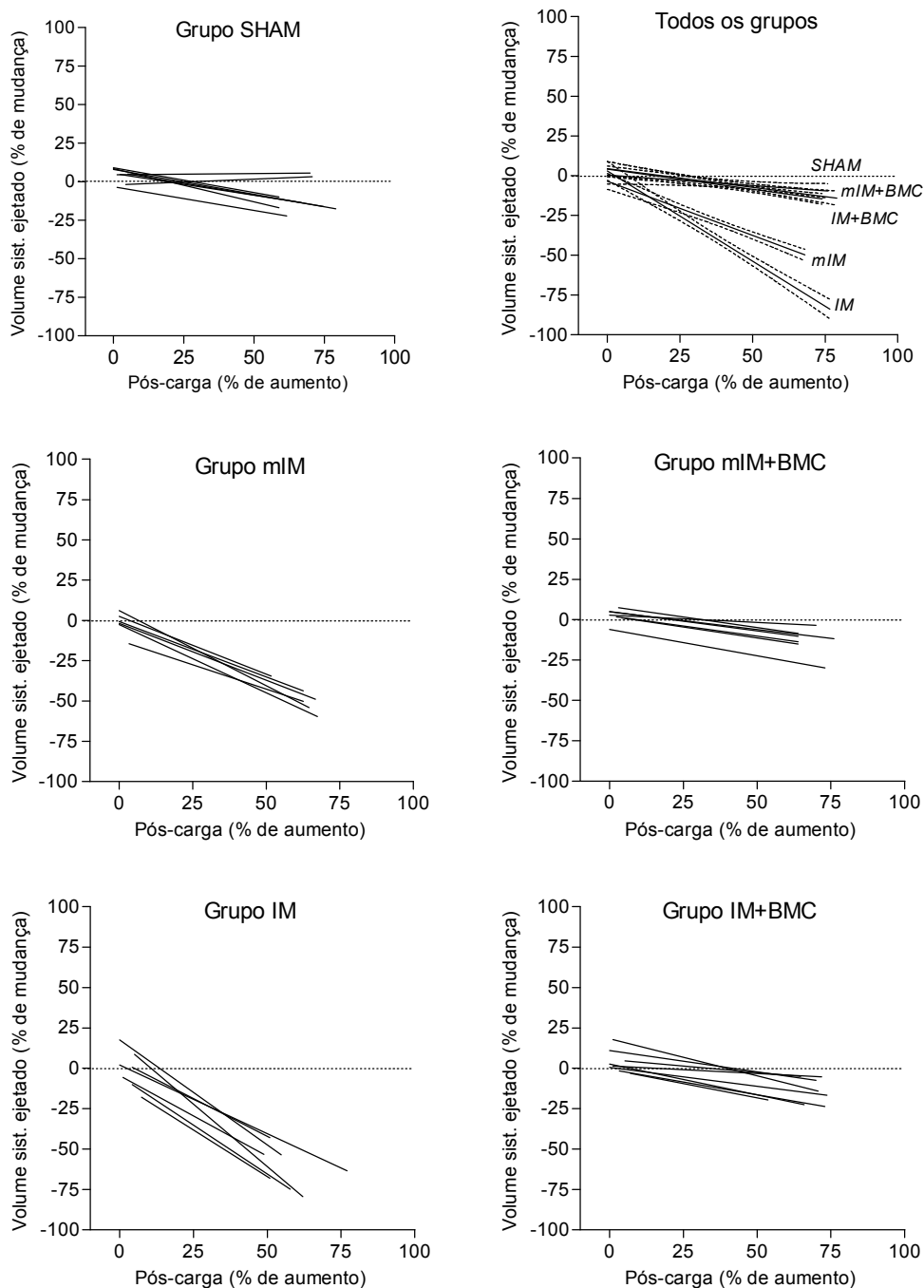
#### 4.8.2.1. Correlações

Foram construídas relações entre o aumento percentual na pressão e as mudanças percentuais no VSE e TS, resultando em correlações lineares representadas nas Figuras 7 e 8.

A relação estabelecida entre a sobrecarga pressórica e VSE (Figura 7) não apresentou significância estatística no grupo SHAM, indicando que este parâmetro não se modifica significativamente com o aumento da pós-carga até os níveis estudados. Não obstante, estas correlações nos grupos infartados sem terapia apresentaram significante negatividade, com inclinações médias inferiores nos mIM ( $p < 0,001$  vs. SHAM) e nos IM ( $p < 0,001$  vs. SHAM e  $p < 0,01$  vs. mIM), enquanto os grupos tratados com BMC correlacionaram estes dois fatores de forma muito semelhante ao grupo SHAM, com inclinações médias superiores aos não tratados em mIM+BMC ( $p < 0,001$  vs. mIM) e IM+BMC ( $p < 0,001$  vs. IM).

Em adição, as correlações entre a sobrecarga e geração de trabalho (Figura 8) foram significantes e positivas no grupo SHAM ( $p < 0,0001$  e  $r = 0,7346$  pelo teste de Person) e negativas nos grupos mIM ( $p < 0,0001$  e  $r = -0,7624$ ) e IM ( $p < 0,0001$  e  $r = -0,7962$ ), mas significativamente positivas em mIM+BMC ( $p < 0,0001$  e  $r = 0,8302$ ;  $p < 0,001$ ) e IM+BMC ( $p < 0,0001$  e  $r = 0,7417$ , com inclinação =  $0,52 \pm 0,05$ ;  $p < 0,001$ ). Os valores de inclinação dessas retas formadas foram estatisticamente menores nos grupos mIM ( $p < 0,001$ ) e IM ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo SHAM, enquanto nos grupos mIM+BMC ( $p < 0,01$  vs. mIM) e IM+BMC ( $p < 0,0001$  vs. IM) foram maiores que nos não tratados e semelhantes ao SHAM.

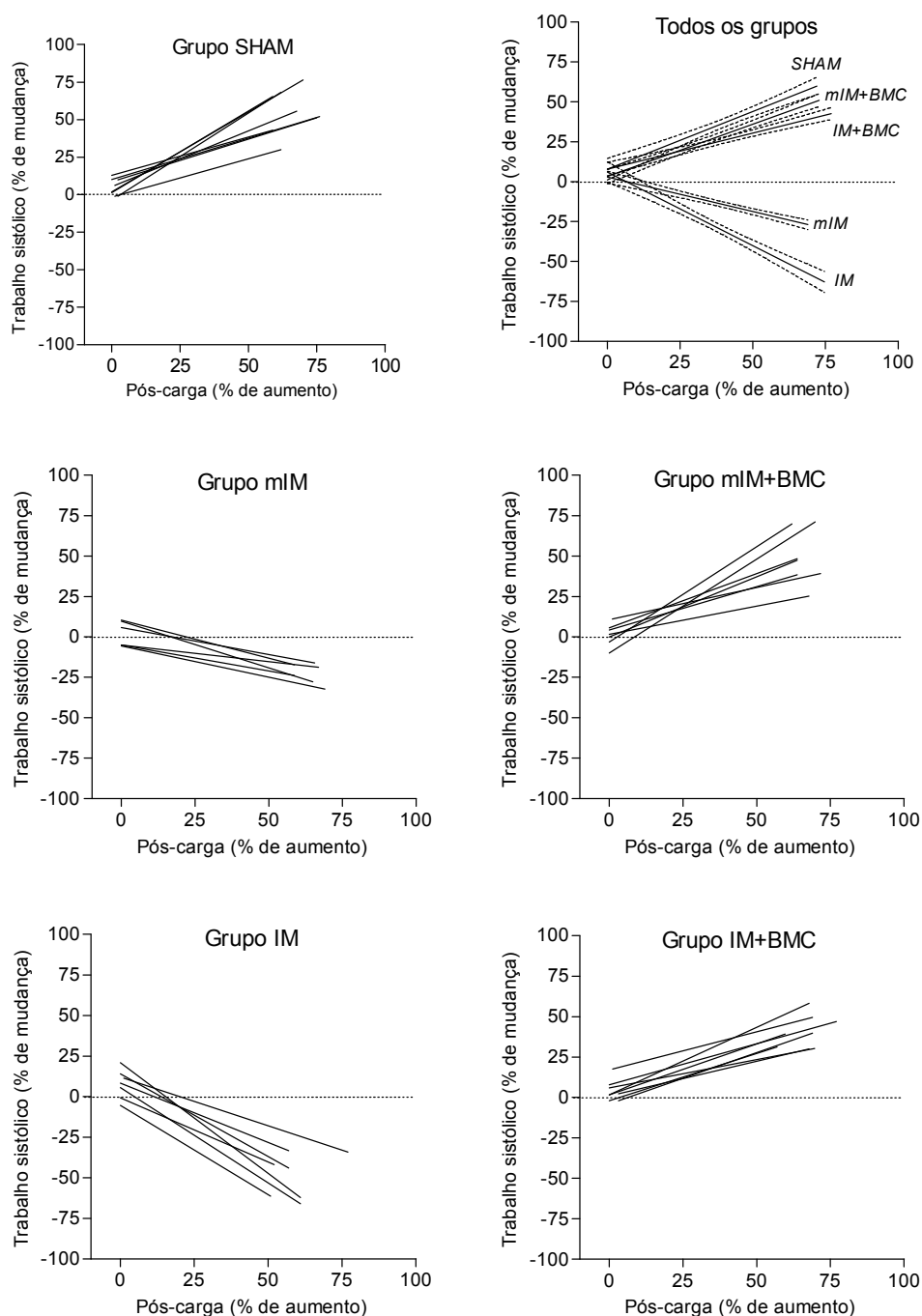
## Relação entre o aumento da pós-carga e volume ejettato pelo coração



	SHAM (n = 8)	mIM (n = 6)	mIM+BMC (n = 8)	mIM (n = 7)	mIM+BMC (n = 8)	ANOVA <i>p</i>
<b>Slope</b>	-0,19 ± 0,06	-0,75 ± 0,04*	-0,20 ± 0,08 <sup>#</sup>	-1,14 ± 0,08* <sup>§</sup>	-0,29 ± 0,05 <sup>#</sup>	<0,001

**Figura 7** – Relação entre sobrecarga pressórica e variação do volume sistólico ejettato (alterações percentuais). A tabela representa a média ± e.p.m. dos coeficientes de inclinação das retas (*slope*). \**p* < 0,05 vs. SHAM; <sup>#</sup>*p* < 0,05 vs. não-tratado; e <sup>§</sup>*p* < 0,05 vs. mIM. ANOVA 1-vida seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni.

## Relação entre o aumento da pós-carga e geração de trabalho pelo coração



	SHAM (n = 8)	mIM (n = 6)	mIM+BMC (n = 8)	mIM (n = 7)	mIM+BMC (n = 8)	ANOVA <i>p</i>
<b>Slope</b>	0,75 ± 0,09	-0,38 ± 0,05*	0,74 ± 0,12 <sup>#</sup>	-0,97 ± 0,1 <sup>*§</sup>	0,52 ± 0,05 <sup>#</sup>	<0,001

**Figura** – Relação entre sobrecarga pressórica e variação do trabalho sistólico (alterações percentuais). A tabela representa a média ± e.p.m. dos coeficientes de inclinação das retas (*slope*). \**p* < 0,05 vs. SHAM; <sup>#</sup>*p* < 0,05 vs. não-tratado; e <sup>§</sup>*p* < 0,05 vs. mIM. ANOVA 1-via seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni.

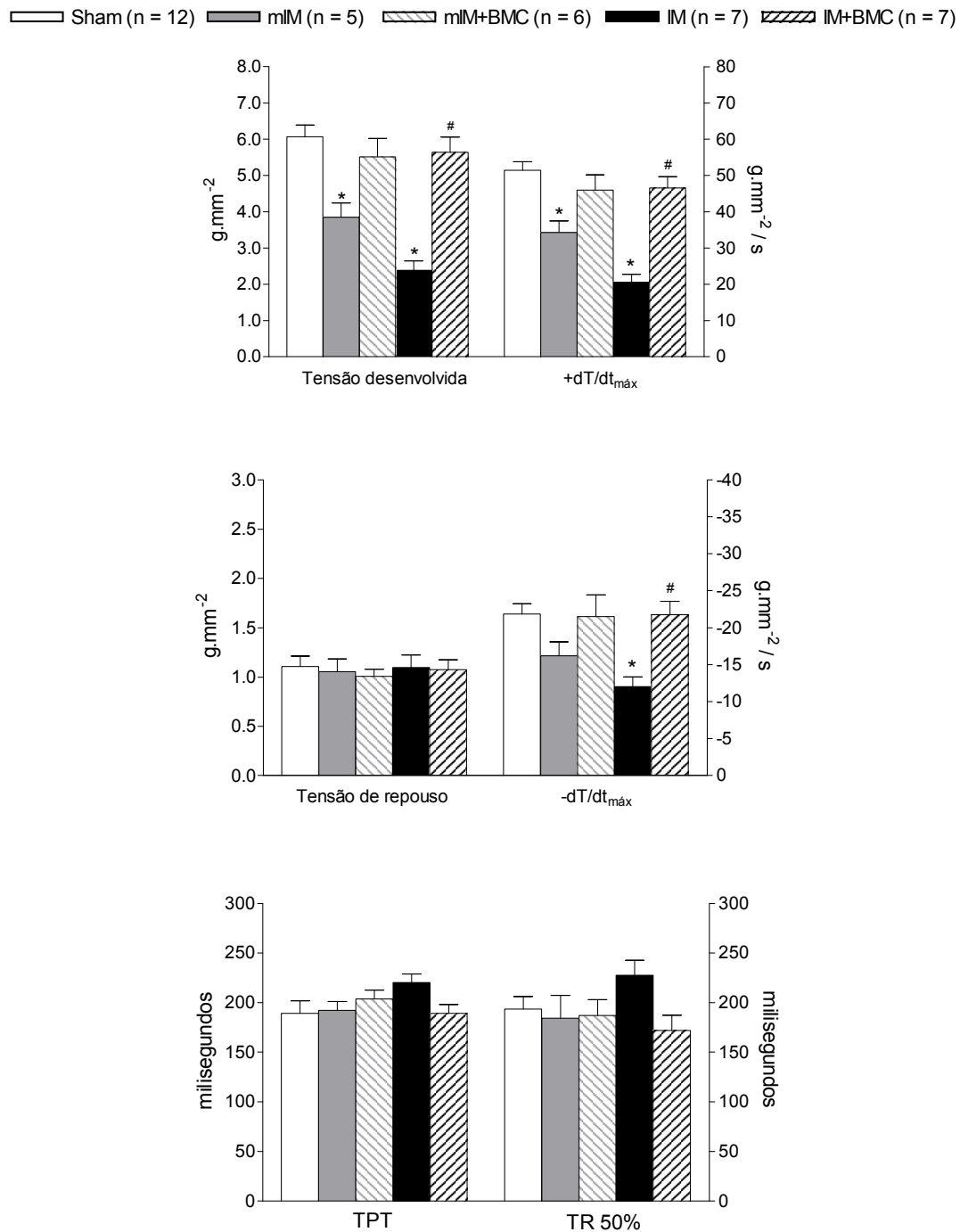
#### 4.9. Estudo *in vitro* da mecânica do miocárdio remanescente ao infarto

As massas dos músculos papilares situaram-se entre 1,6 e 7,8 mg. A massa média desses músculos que representa cada grupo experimental foi: SHAM =  $3,96 \pm 0,40$  mg, mIM =  $4,74 \pm 0,39$  mg, mIM+BMC =  $3,59 \pm 0,25$  mg, IM =  $5,15 \pm 0,58$  mg, e IM+BMC =  $3,32 \pm 0,27$  mg; com diferença estatística somente entre IM e IM+BMC ( $p < 0,05$ ). Com a determinação do comprimento ótimo ( $L_{m\acute{a}x}$ ), resultaram os seguintes valores médios: SHAM =  $5,00 \pm 0,27$  mm, mIM =  $4,22 \pm 0,43$  mm, mIM+MBC =  $4,57 \pm 0,33$  mm, IM =  $4,10 \pm 0,37$  mm, e IM+BMC =  $4,41 \pm 0,31$  mm; sem diferenças estatisticamente significantes. A estimação da área da secção transversa dos músculos papilares demonstrou valores estatisticamente maiores ( $p < 0,05$ ) nos grupos mIM ( $1,14 \pm 0,06$  mm<sup>2</sup>) e IM ( $1,25 \pm 0,10$  mm<sup>2</sup>) em relação aos grupos SHAM ( $0,79 \pm 0,06$  mm<sup>2</sup>) e tratados com BMC (mIM+BMC:  $0,79 \pm 0,05$ ; e IM+BMC:  $0,77 \pm 0,06$  mm<sup>2</sup>).

Após estabilização das preparações dos músculos papilares em  $L_{m\acute{a}x}$ , foram determinados os valores dos parâmetros de contratilidade (Figura 9). Os valores de tensão desenvolvida (TD) pelos músculos papilares apresentaram-se deprimidos de forma significativa nos grupos mIM ( $3,85 \pm 0,38$  g.mm<sup>-2</sup>;  $p < 0,01$ ) e IM ( $2,38 \pm 0,25$  g.mm<sup>-2</sup>;  $p < 0,001$ ) quando comparados ao grupo SHAM ( $6,07 \pm 0,31$  g.mm<sup>-2</sup>). O mesmo comportamento foi notado para a máxima derivada positiva de tensão ( $+dT/dt_{m\acute{a}x}$ ), menores em mIM ( $34,2 \pm 3,2$  g.mm<sup>-2</sup>/s;  $p < 0,01$ ) e IM ( $20,4 \pm 2,28$  g.mm<sup>-2</sup>/s;  $p < 0,001$ ) que em SHAM ( $51,4 \pm 2,3$  g.mm<sup>-2</sup>/s). Contudo, os grupos tratados com BMC apresentaram níveis equivalentes aos SHAM tanto para TD (mIM+BMC:  $5,51 \pm 0,50$  g.mm<sup>-2</sup>; IM+BMC:  $5,64 \pm 0,41$  g.mm<sup>-2</sup>) quanto para  $+dT/dt_{m\acute{a}x}$  (mIM+BMC:  $46,0 \pm 4,1$  g.mm<sup>-2</sup>/s; IM+BMC:  $46,5 \pm 3,1$  g.mm<sup>-2</sup>/s). Vale a pena destacar que o grupo IM+BMC apresentou valores estatisticamente superiores ( $p < 0,001$ ) que seu grupo par não tratado (IM). A máxima derivada negativa da tensão ( $-dT/dt_{m\acute{a}x}$ ) estava moderadamente deprimida em mIM ( $-16,1 \pm 1,9$  g.mm<sup>-2</sup>/s) e de forma estatisticamente significativa em IM ( $-11,9 \pm 1,3$  g.mm<sup>-2</sup>/s;  $p < 0,05$ ) em relação ao SHAM ( $-21,8 \pm 1,4$  g.mm<sup>-2</sup>/s), enquanto os grupos mIM+BMC ( $-21,5 \pm 2,9$  g.mm<sup>-2</sup>/s) e IM+BMC ( $-21,7 \pm 1,8$  g.mm<sup>-2</sup>/s) apresentaram esse parâmetro em níveis normais. Ademais, apesar das diferenças numéricas, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi notada entre os grupos quando se avaliou a tensão de repouso (SHAM:  $1,10 \pm 0,10$ ; mIM:  $1,06 \pm 0,12$ ; mIM+BMC:  $1,01 \pm 0,07$ ; IM:  $1,10 \pm 0,12$ ; IM+BMC:  $1,07 \pm 0,10$  g.mm<sup>-2</sup>;  $p = 0,9658$ ); o tempo para atingir o pico de

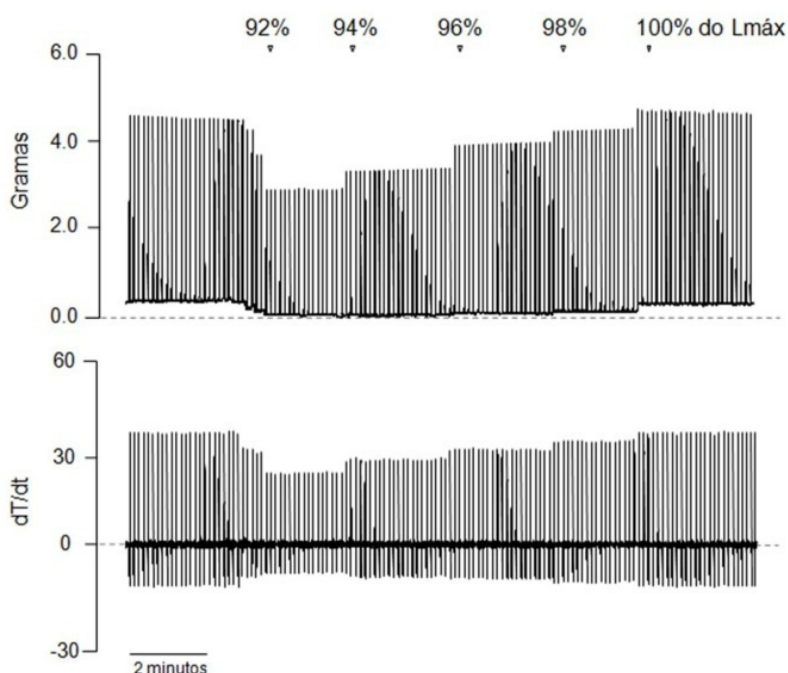


tensão (SHAM:  $189 \pm 12$ ; mIM:  $206 \pm 13$ ; mIM+BMC:  $195 \pm 8$ ; IM:  $220 \pm 8$ ; IM+BMC:  $189 \pm 8$  milissegundos;  $p = 0,3397$ ); e o tempo para atingir 50% do relaxamento (SHAM:  $193 \pm 12$ ; mIM:  $198 \pm 21$ ; mIM+BMC:  $183 \pm 13$ ; IM:  $227 \pm 15$ ; IM+BMC:  $181 \pm 13$  milissegundos;  $p = 0,2798$ ).



**Figura 9** – Média  $\pm$  e.p.m. dos parâmetros analisados da mecânica dos músculos papilares.  $dT/dt_{máx}$  = derivadas máximas positiva e negativa de tensão; TPT = tempo para atingir o pico de tensão; e TR 50% = tempo para relaxar 50%. \* $p < 0,05$  vs. SHAM; # $p < 0,05$  vs. não-tratado. ANOVA 1-via seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni.

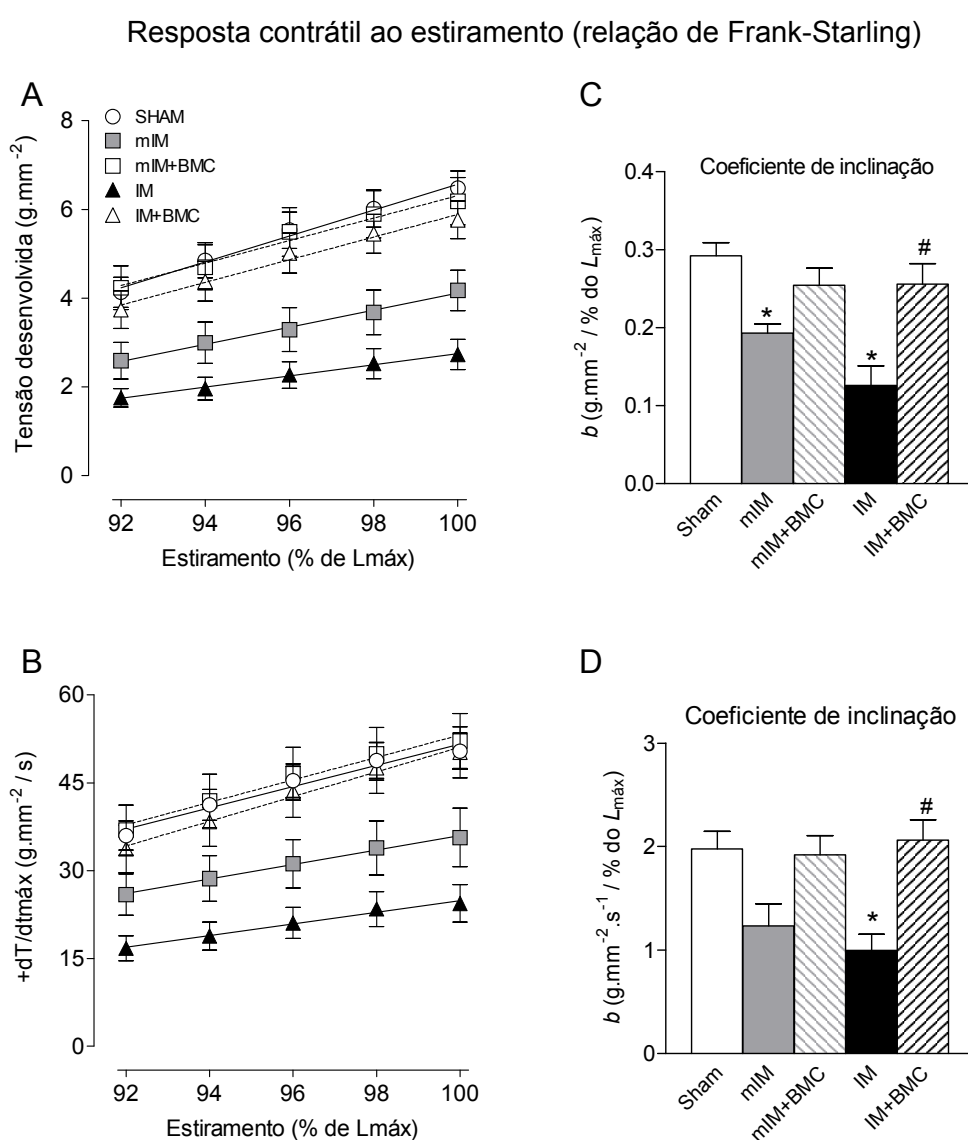
#### 4.9.1. Relação entre estiramento miocárdico e tensão



**Ilustração 4** – Registros típicos da força desenvolvida e derivada de força durante estiramento progressivo dos músculos papilares de 92 a 100% do  $L_{máx}$ . Registros foram obtidos em um animal controle (SHAM).

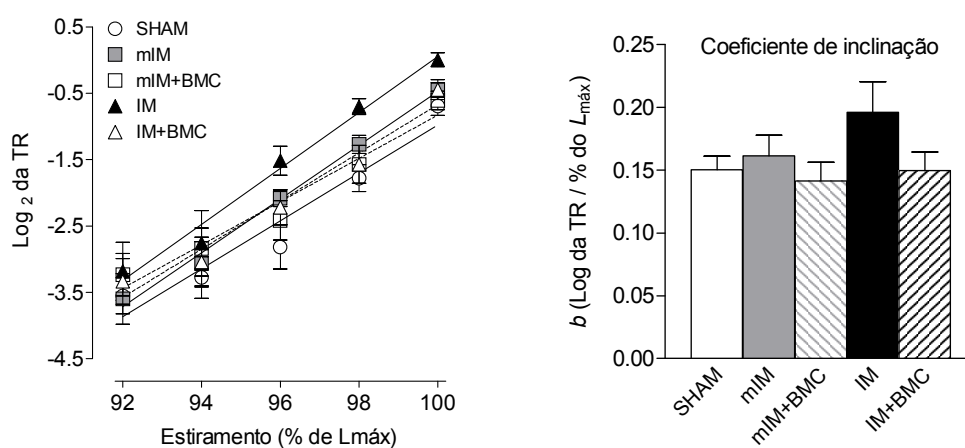
A projeção, no plano cartesiano, da tensão desenvolvida em função dos comprimentos em repouso utilizados (de 92 a 100% do comprimento ótimo,  $L_{máx}$ ) resultou em regressões lineares, conforme pode ser observado no respectivo gráfico da Figura 10 e expressos pela equação  $y = b.x + a$ . Os coeficientes de determinação da regressão linear ( $r^2$ ) foram estatisticamente significantes com valores médios em: SHAM =  $0,97 \pm 0,01$ ; mIM =  $0,96 \pm 0,01$ ; mIM+BMC =  $0,93 \pm 0,02$ ; IM =  $0,97 \pm 0,01$ ; e IM+BMC =  $0,94 \pm 0,02$ . Os coeficientes de inclinação dessas retas de regressão ( $b$ , em  $g.mm^{-2} / \% \text{ do } L_{máx}$ ) se mostraram sensivelmente deprimidos nos grupos infartados (mIM:  $0,193 \pm 0,011$ ;  $p < 0,05$ ; e IM:  $0,126 \pm 0,024$ ;  $p < 0,001$ ) comparados ao grupo SHAM ( $0,292 \pm 0,016$ ) sugerindo sensibilidade miocárdica ao estiramento deprimida, enquanto mIM+BMC ( $0,2546 \pm 0,021$ ;  $p < 0,05$  vs. mIM) e IM+BMC ( $0,256 \pm 0,026$ ;  $p < 0,01$  vs. IM) foram estatisticamente indistinguíveis de SHAM. As distribuições dos valores da  $+dT/dt_{máx}$  em função dos diferentes comprimentos musculares utilizados (Figura 10) também formaram regressões lineares com satisfatórios coeficientes de determinação das

retas ( $r^2 =$  SHAM:  $0,93 \pm 0,01$ ; mIM:  $0,96 \pm 0,01$ ; mIM+BMC:  $0,95 \pm 0,01$ ; IM:  $0,95 \pm 0,01$ ; e IM+BMC:  $0,95 \pm 0,02$ ). Dessa forma, o aumento da capacidade contrátil em resposta ao estiramento se mostrou deprimido no grupo IM, considerando seu coeficiente de inclinação  $b$  (em  $\text{g}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1} / \% \text{ do } L_{\text{máx}}$ ) em comparação ao grupo SHAM (IM:  $0,99 \pm 0,15$  vs. SHAM:  $1,98 \pm 0,17$ ;  $p < 0,01$ ). Apesar de numericamente menor, mIM ( $1,23 \pm 0,21$ ;  $p > 0,05$ ) não foi estatisticamente diferente de SHAM. Todavia, este parâmetro analisado nos grupos submetidos à terapia celular foi semelhante ao do grupo SHAM, com IM+BMC apresentando inclinações estatisticamente superiores que IM ( $2,06 \pm 0,19$ ;  $p < 0,01$ ).



**Figura 10** – Relação entre estiramento (% do  $L_{\text{máx}}$ ) e tensão desenvolvida (**A**) e derivada máxima de tensão (**B**). Os gráficos de barras representam (média  $\pm$  e.p.m.) dos coeficientes de inclinação (em **C** e **D**) das curvas **A** e **B** respectivamente. \* $p < 0,05$  vs. SHAM; # $p < 0,05$  vs. não-tratado. ANOVA 1-via seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni.

Como a disposição no plano cartesiano da tensão passiva frente ao estiramento configurou-se como uma regressão não-linear, foi feita transformação dos seus valores para logaritmo (Figura 11). Após esta transformação, foi possível observar que quando submetido ao estiramento, a TR dos músculos do grupo IM elevou-se para níveis visivelmente maiores e com inclinação numericamente superior em (IM:  $0,196 \pm 0,024$  Log TR / % do  $L_{m\acute{a}x}$ ) que nos demais (SHAM:  $0,150 \pm 0,010$ ; mIM:  $0,161 \pm 0,016$ ; mIM+BMC:  $0,141 \pm 0,015$ ; e IM+BMC:  $0,149 \pm 0,014$ ) embora sem alcançar significância estatística ( $p = 0,0558$ ).

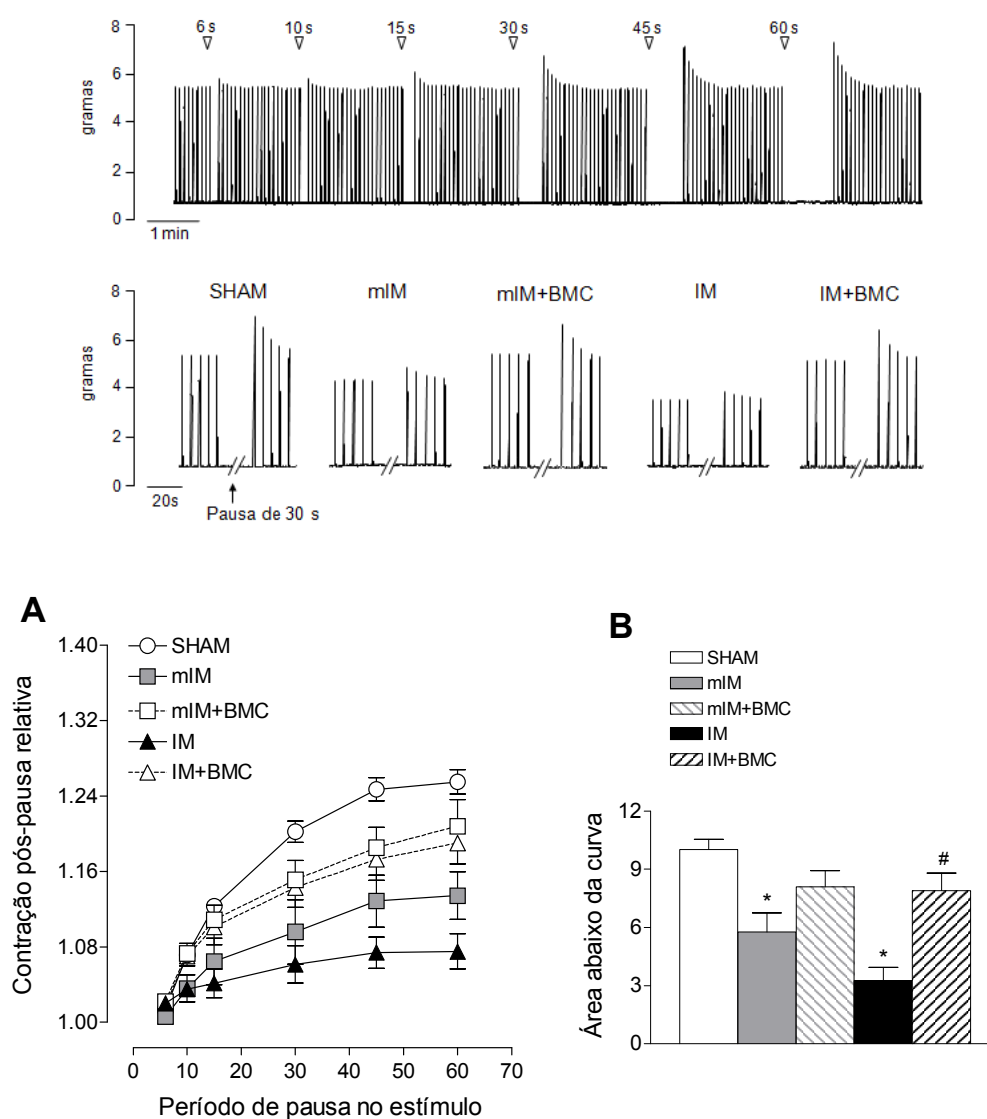


**Figura 11** – Relação entre estiramento (% do  $L_{m\acute{a}x}$ ) e tensão de repouso. Os gráficos de barras representam (média  $\pm$  e.p.m.) dos coeficientes de inclinação das retas. Não foi identificada significância estatística ( $p = 0,1961$ ). ANOVA 1-via seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni.

#### 4.9.2. Resposta contrátil após pausa de estímulo

Conforme ilustrado na Figura 12, a execução deste protocolo demonstrou que, no miocárdio saudável, a contração pós-pausa de estímulos elétricos é superior à contração anterior, e que a potenciação da contração é proporcional ao tempo de pausa utilizado. Entretanto, a potenciação pós-pausa foi substancialmente deprimida em mIM e quase abolida em IM. A contração relativa (contração pós-pausa/contração pré-pausa) para a maior pausa utilizada (60 segundos) foi significativamente inferior em mIM ( $1,13 \pm 0,02$ ) e IM ( $1,07 \pm 0,01$ ) em relação ao SHAM ( $1,26 \pm 0,01$ ). Os músculos dos grupos tratados com BMC exibiram comportamento melhor que os não tratados e sem diferença estatística em relação ao SHAM, ainda que apresentassem níveis numericamente inferiores a este (mIM+BMC:  $1,21 \pm 0,02$ ; e IM+BMC:  $1,19 \pm 0,02$ ). Para simplificação da análise

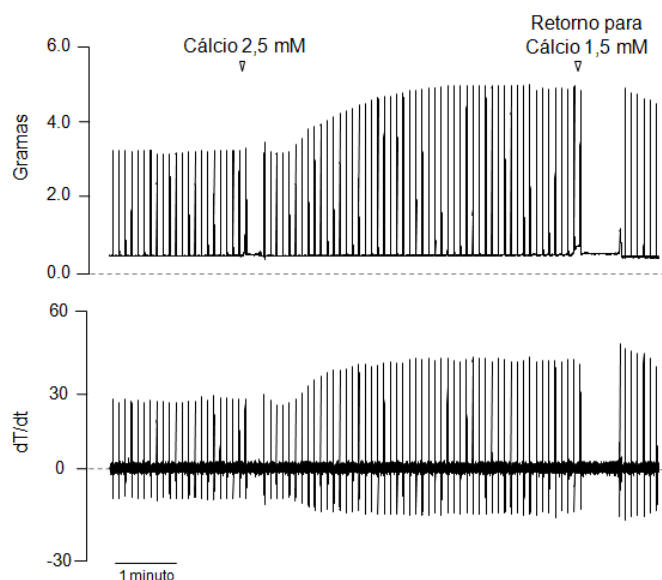
estatística desses resultados, foram calculadas as áreas compreendidas abaixo das curvas formadas pela relação entre a contração pós-pausa e o tempo de pausa de estímulo. Dessa maneira, notaram-se valores estatisticamente inferiores nos grupos mIM ( $5,77 \pm 0,96$  unidades arbitrárias;  $p < 0,01$ ) e IM ( $3,25 \pm 0,67$  u.a.;  $p < 0,001$ ) em relação ao SHAM ( $10,0 \pm 0,5$  u.a.) enquanto nos grupos mIM+BMC ( $8,08 \pm 0,84$  u.a.;  $p = 0,09$  vs. mIM, não significativa) e IM+BMC ( $7,90 \pm 0,90$  u.a.;  $p < 0,001$  vs. IM) foram superiores aos não tratados e próximos ao SHAM.



**Figura 12** – Ilustrações (acima) mostram a resposta frente à pausa de estímulos elétricos em um experimento controle (SHAM) e exemplos típicos de cada grupo para pausa de 30 s. Os gráficos: **A**, Relação entre duração da pausa no estímulo elétrico e a contração relativa (pós-pausa / pré-pausa). **B**, Média  $\pm$  e.p.m. das áreas abaixo das curvas de A. \* $p < 0,05$  vs. SHAM; # $p < 0,05$  vs. não-tratado. ANOVA 1-va seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni.

### 4.9.3. Resposta contrátil miocárdica ao cálcio 2,5 mM

O aumento na concentração de cálcio na solução nutritora para o músculo papilar de 1,5 mM para 2,5 mM promoveu elevação na contratilidade (Ilustração 5) e os dados referentes aos grupos experimentais estão representados na Figura 13.

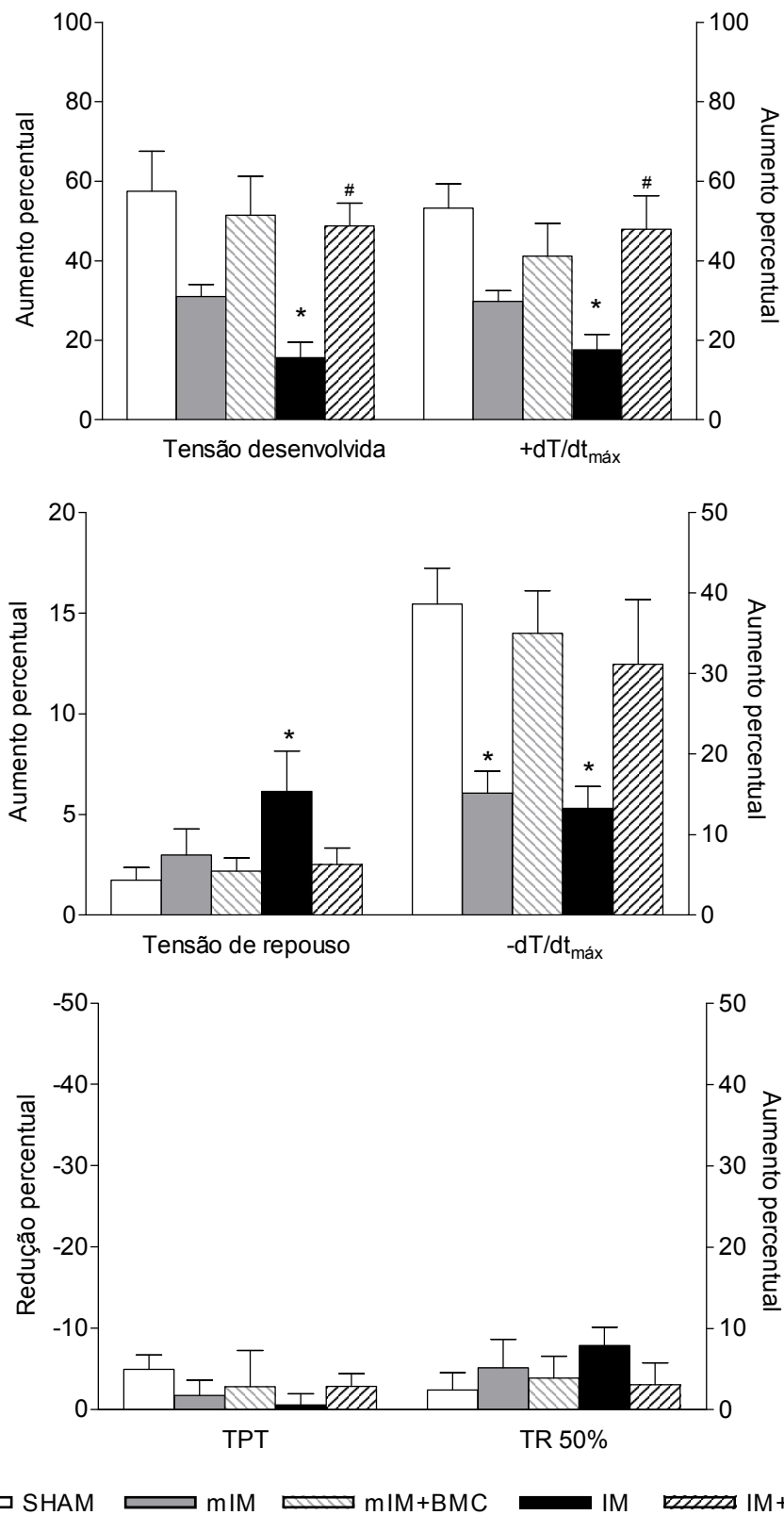


**Ilustração 5** – Registro típico da resposta contrátil frente ao aumento da concentração de  $\text{Ca}^{+2}$  na solução nutritora. Registro obtido em um animal controle (SHAM).

O aumento da TD com cálcio 2,5 mM foi estatisticamente inferior somente em IM ( $15,6 \pm 3,8\%$  de aumento;  $p < 0,05$ ) em relação ao SHAM ( $57,4 \pm 10,0\%$ ). O grupo mIM também teve aumento inferior ( $31,0 \pm 3,0\%$ ), mas abaixo do nível de significância ( $p = 0,1130$ ). Entretanto, os grupos mIM+BMC e IM+BMC elevaram a TD em níveis indistinguíveis do SHAM ( $51,4 \pm 9,8$ ; e  $48,7 \pm 5,7\%$  respectivamente,  $p > 0,05$ ).

Comportamento semelhante foi evidenciado para a  $+dT/dt_{\text{máx}}$ , com aumentos em mIM+BMC ( $41,2 \pm 8,1\%$ ) e IM+BMC ( $47,9 \pm 8,4\%$ ) superiores a mIM ( $29,7 \pm 2,7\%$ ) e IM ( $17,6 \pm 3,7\%$ ) e próximos ao SHAM ( $53,2 \pm 6,0\%$ ). Resultados similares foram verificados para a  $-dT/dt_{\text{máx}}$  (SHAM:  $38,6 \pm 4,4$ ; mIM:  $15,2 \pm 2,6$ ; IM:  $13,3 \pm 2,6$ ; mIM+BMC:  $35,0 \pm 5,2$ ; e IM+BMC:  $31,1 \pm 8,0\%$ ).

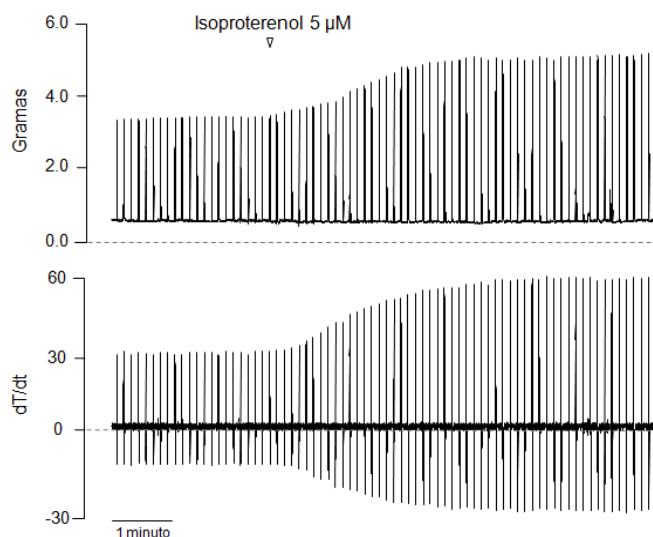
Na avaliação da TR, embora a análise de variância não tenha alcançado nível de significância estatística ( $p = 0,054$ ), o teste *post-hoc* de Bonferroni evidenciou aumento de  $6,3 \pm 2,0\%$  no grupo IM significativamente maior ( $p < 0,05$ ), sem diferenças importantes entre os demais grupos (SHAM:  $1,7 \pm 0,6$ ; mIM:  $2,9 \pm 1,3$ ; mIM+BMC:  $2,1 \pm 0,6$ ; e IM+BMC:  $2,5 \pm 0,8\%$ ).



**Figura 13** – Efeito do aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  na solução nutritora (2,5 mM) sobre os parâmetros contráteis do músculo papilar isolado. As barras representam médias  $\pm$  e.p.m. das alterações relativas. \* $p < 0,05$  vs. SHAM; # $p < 0,05$  vs. não-tratado. ANOVA 1-via seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni.

Apesar das diferenças entre os aumentos nas velocidades de contração ( $+dT/dt_{\text{máx}}$ ) e relaxamento ( $-dT/dt_{\text{máx}}$ ), nenhuma diferença foi observada entre o comportamento dos parâmetros temporais de contração (TPT) e relaxamento (TR 50%) dos grupos estudados.

#### 4.9.4. Resposta contrátil ao isoproterenol



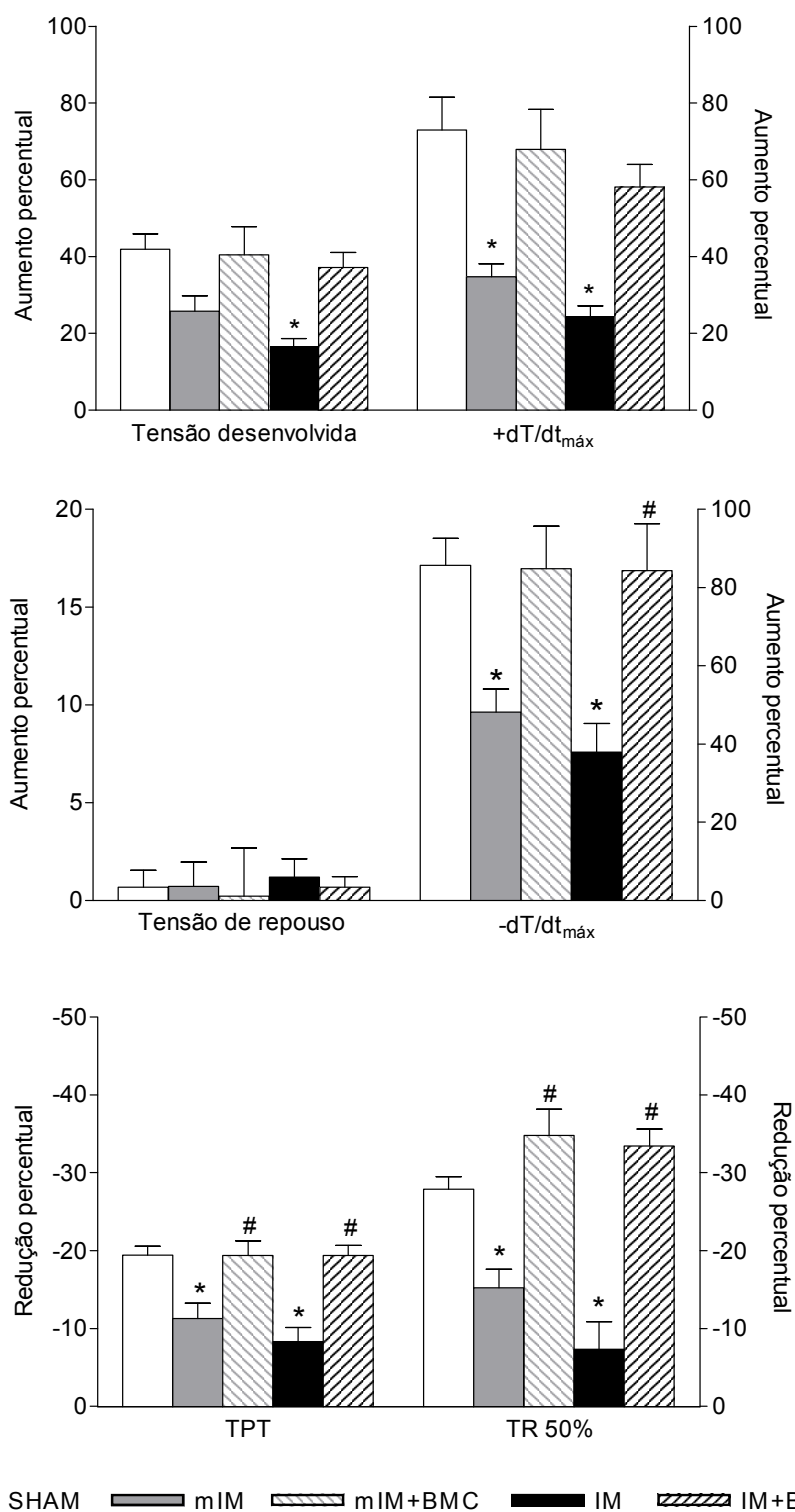
**Ilustração 6** – Registro típico da resposta contrátil à de isoproterenol à solução nutritora. Registro obtido em músculo papilar de animal controle (SHAM).

A adição do agonista  $\beta$ -adrenérgico isoproterenol à solução nutriente cursou com efeito inotrópico positivo no grupo SHAM (Ilustração 6 e Figura 14). Entretanto, o aumento da TD dos grupos mIM ( $25,8 \pm 3,9\%$ ;  $p < 0,05$ ) e IM ( $16,5 \pm 2,1\%$ ;  $p < 0,01$ ) mostraram-se deprimidos quando comparados ao grupo SHAM ( $41,9 \pm 4,0\%$ ), mas em mIM+BMC e IM+BMC o aumento ( $40,4 \pm 7,3\%$  e  $37,2 \pm 3,8\%$  respectivamente) foi equivalente aos controles. A elevação da  $+dT/dt_{\text{máx}}$  foi de  $73,0 \pm 8,5\%$  no grupo SHAM, e os grupos infartados mIM ( $34,7 \pm 3,4\%$ ;  $p < 0,05$ ) e IM ( $24,3 \pm 2,9\%$ ;  $p < 0,01$ ) tiveram aumentos significativamente inferiores. Porém, os grupos tratados com BMC apresentaram respostas numericamente superiores e indistinguíveis de SHAM do ponto de vista estatístico (mIM+BMC:  $67,9 \pm 10,4\%$ ; e IM+BMC:  $58,2 \pm 5,8\%$ ).

Ademais, o tempo de contração também reduziu com o isoproterenol. O TPT diminuiu em aproximadamente  $19,4 \pm 1,1\%$  nos SHAM, mas esta redução foi menor em mIM ( $11,3 \pm 1,9\%$  de redução;  $p < 0,01$  vs. SHAM) e IM ( $8,3 \pm 1,8\%$  de redução;



$p < 0,001$  vs. SHAM) e preservada em mIM+BMC ( $-19,4 \pm 1,8\%$  de redução;  $p < 0,05$  vs. mIM) e IM+BMC ( $-19,4 \pm 1,3\%$  de redução;  $p < 0,001$  vs. IM).



**Figura 14** – Efeito do isoproterenol (5  $\mu$ M) na solução nutritora sobre os parâmetros contráteis (média  $\pm$  e.p.m. das alterações % em relação ao basal). \* $p < 0,05$  vs. SHAM; # $p < 0,05$  vs. não-tratado. ANOVA 1-via seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni.

Embora a tensão de repouso das preparações não tenha se modificado de forma significante (SHAM:  $0,6 \pm 0,8\%$ ; mIM:  $0,7 \pm 1,2\%$ ; IM:  $1,1 \pm 0,9\%$ ; mIM+BMC:  $0,2 \pm 2,4\%$ ; e IM+BMC:  $0,6 \pm 0,5\%$  de aumento), o isoproterenol estimulou também o relaxamento miocárdio, indicado pelo aumento na  $-dT/dt_{\text{máx}}$  de forma importante no grupo SHAM ( $85,6 \pm 7,0\%$  de aumento). Todavia, com comportamento semelhante ao dos parâmetros sistólicos, esta resposta também foi deprimida em IM ( $37,9 \pm 7,3\%$  de aumento;  $p < 0,05$  vs. SHAM) e mesmo nos mIM ( $48,2 \pm 5,8\%$ ;  $p < 0,05$  vs. SHAM), mas superiores aos não tratados e similares ao SHAM nos grupos tratados com BMC (mIM+BMC:  $87,8 \pm 12,7\%$ ; e IM+BMC:  $84,3 \pm 11,9\%$ ).

O tempo de relaxamento reduziu  $27,9 \pm 1,6\%$  no SHAM, mas apenas  $15,2 \pm 2,4\%$  ( $p < 0,05$  vs. SHAM) e  $7,3 \pm 3,5\%$  ( $p < 0,001$  vs. SHAM) nos mIM e IM respectivamente, também inferiores aos mIM+BMC ( $34,8 \pm 3,3\%$  de redução;  $p < 0,001$  vs. mIM) e IM+BMC ( $33,5 \pm 2,6\%$ ;  $p < 0,001$  vs. mIM e IM).

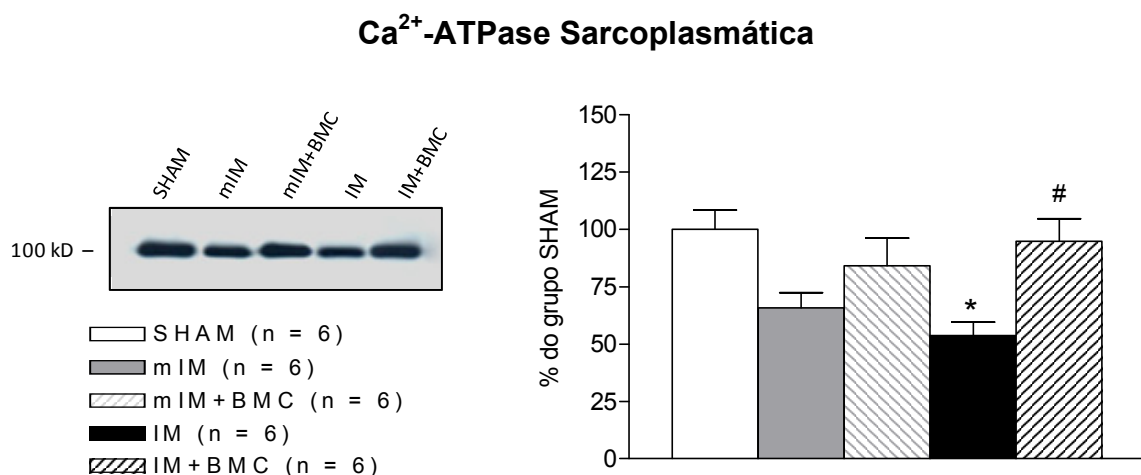
#### 4.10. Western blotting das proteínas relacionadas à cinética do cálcio.

A análise do nível de expressão das proteínas estudadas (Figuras 15 a 19) foi feita pela leitura da densidade óptica absoluta das bandas seguida pela indexação desses valores como percentual do grupo SHAM para as amostras de cada membrana de PVDF. Esta manobra manteve as características identificadas, com a vantagem de que os desvios em relação à média de cada grupo foram reduzidos e, dessa maneira, o poder estatístico das análises aumentou.

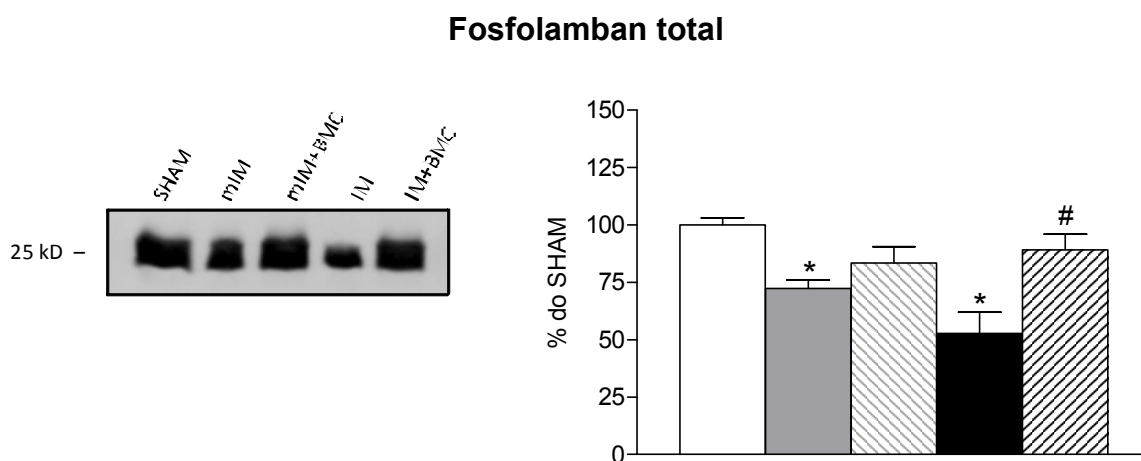
O conteúdo da SERCA2 (Figura 15) detectado no grupo mIM foi numericamente menor, com expressão protéica de  $65,8 \pm 6,6\%$  em relação ao SHAM, embora não alcançasse nível estatístico de significância ( $p > 0,05$ ). Já a análise do grupo IM demonstrou significativa diminuição da densidade óptica com apenas  $53,6 \pm 5,8\%$  da medida dos SHAM ( $p < 0,01$ ). Ademais, os grupos tratados tiveram níveis próximos ao SHAM e superiores aos dos grupos não tratados (mIM+BMC:  $84,2 \pm 11,9\%$  do SHAM,  $p > 0,05$  vs. mIM; e IM+BMC:  $94,8 \pm 9,8\%$  do SHAM,  $p < 0,05$  vs. IM).

Como representado nos gráficos da Figura 16 e 17, os grupos com infartos também apresentaram níveis inferiores tanto na expressão do PLB total (mIM:  $72,3 \pm 3,7\%$  do SHAM,  $p < 0,05$ ; e IM:  $52,6 \pm 9,3\%$  do SHAM,  $p < 0,001$ ), quanto da sua forma fosforilada na serina-16 ( $71,0 \pm 6,0\%$  do SHAM,  $p > 0,05$ ; e IM:  $35,0 \pm 10,3\%$  do SHAM,  $p < 0,001$ ). Porém, essas alterações pareceram ser prevenidas nos

animais BMC (PLB = mIM+BMC:  $83,4 \pm 7,1$  % do SHAM, apesar de  $p > 0,05$  vs. mIM; e IM+BMC:  $89,2 \pm 6,7$  % do SHAM,  $p < 0,01$  vs. IM; e PLB-Ser<sup>16</sup> = mIM+BMC:  $104,2 \pm 14,5$  % do SHAM, apesar de  $p > 0,05$  vs. mIM; e IM+BMC:  $90,0 \pm 7,8$  % de SHAM,  $p < 0,01$  vs. IM).

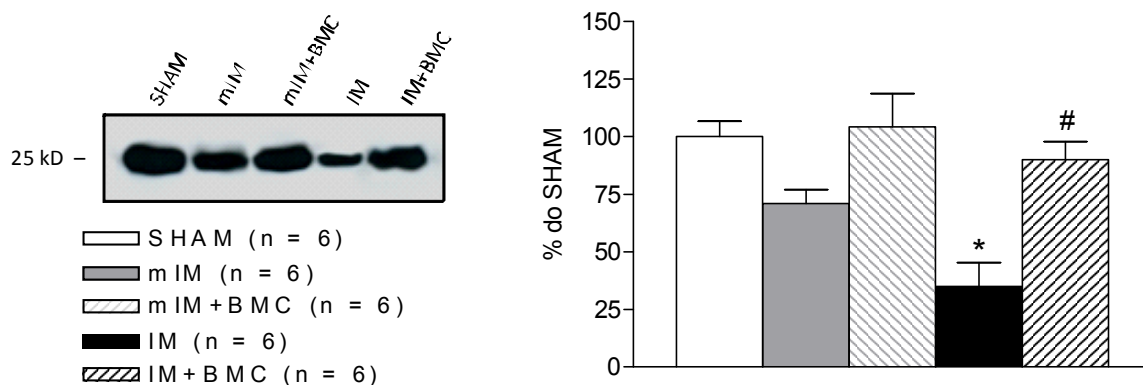


**Figura 15** – Radiofotografia das bandas típicas de western blot e respectivos níveis de expressão protéica (% em relação ao SHAM) da Ca<sup>2+</sup>-ATPase sarcoplasmática no miocárdio remoto ao infarto. As barras representam médias  $\pm$  e.p.m. \* $p < 0,05$  vs. SHAM; # $p < 0,05$  vs. não-tratado. ANOVA 1-via seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni.



**Figura 16** – Radiofotografias das bandas típicas de western blot e respectivos níveis de expressão protéica (% em relação ao SHAM) do fosfolamban total nas mesmas amostras colhidas no miocárdio remoto ao infarto ( $n = 6$  para cada grupo). As barras representam médias  $\pm$  e.p.m. \* $p < 0,05$  vs. SHAM; # $p < 0,05$  vs. não-tratado. ANOVA 1-via seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni.

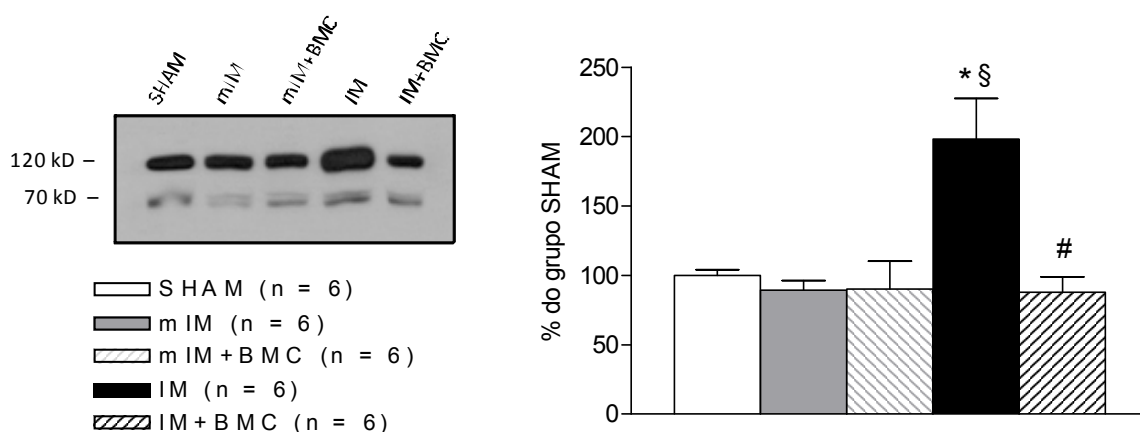
### Fosfolamban fosforilado (Ser<sup>16</sup>)



**Figura 17** – Radiografias das bandas típicas de western blot e respectivos níveis de expressão protéica (% em relação ao SHAM) do fosfolamban fosforilado na serina-16 nas amostras colhidas no miocárdio remoto ao infarto. As barras representam médias  $\pm$  e.p.m. \* $p < 0,05$  vs. SHAM; # $p < 0,05$  vs. não-tratado. ANOVA 1-via seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni.

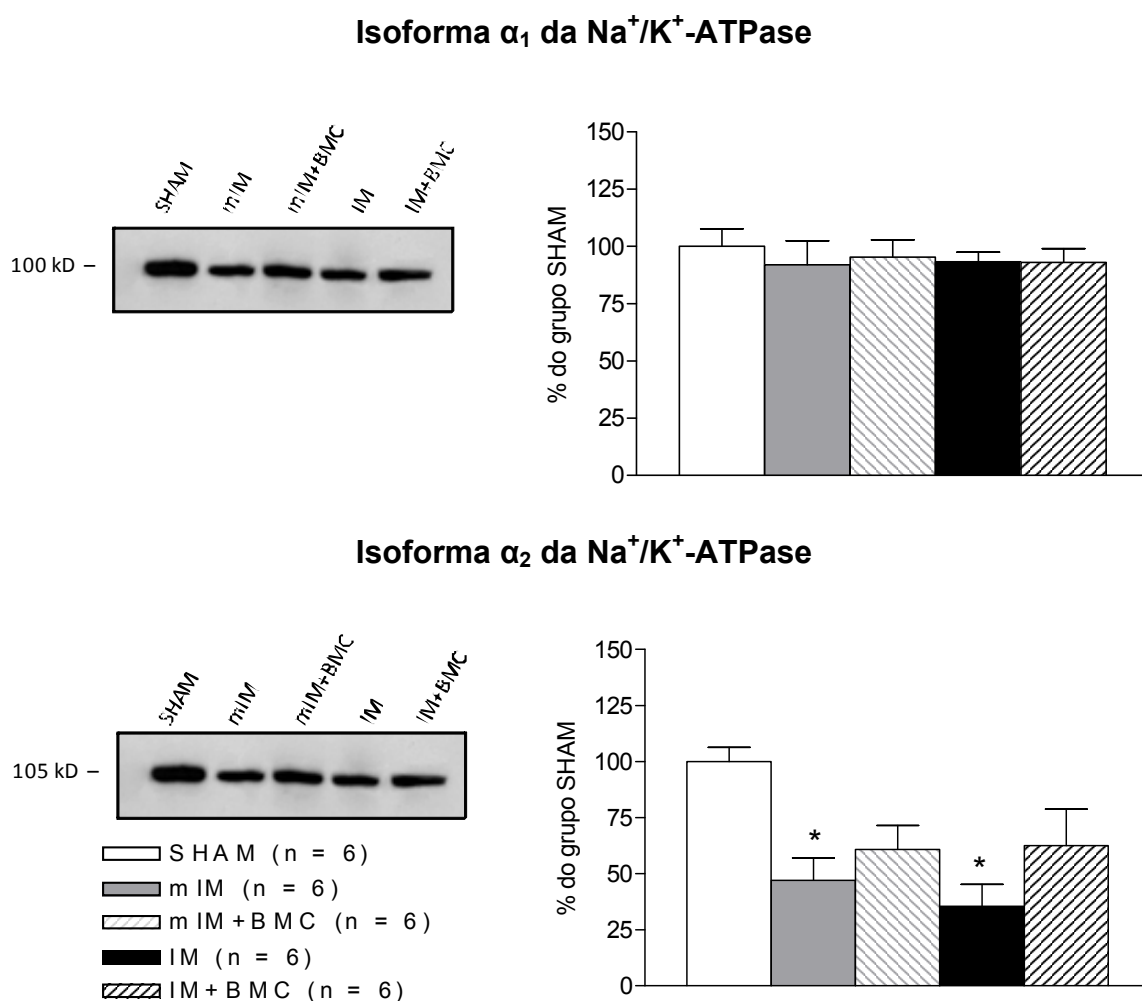
O remodelamento do miocárdio remoto ao infarto também cursou com alterações na expressão protéica do NCX como pode ser observado na Figura 18. Todavia, ainda que não tenham sido identificadas alterações perceptíveis nos animais com moderados infartos (mIM:  $89,2 \pm 6,9$  % do SHAM; e mIM+BMC:  $90,3 \pm 19,8$  % do SHAM), o aumento significativo na expressão desta proteína encontrado no grupo IM ( $198,3 \pm 29,2$  % do SHAM,  $p < 0,05$  vs. SHAM) foi totalmente prevenido no grupo IM+BMC ( $87,8 \pm 11,1$  % do SHAM,  $p < 0,01$  vs. IM).

### Trocador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>



**Figura 18** – Radiografia das bandas típicas de western blot e respectivos níveis de expressão protéica (% em relação ao SHAM) do trocador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> em amostras do miocárdio remoto ao infarto. As barras representam médias  $\pm$  e.p.m. \* $p < 0,05$  vs. SHAM; # $p < 0,05$  vs. não-tratado; e § $p < 0,05$  vs. mIM. ANOVA 1-via seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni.

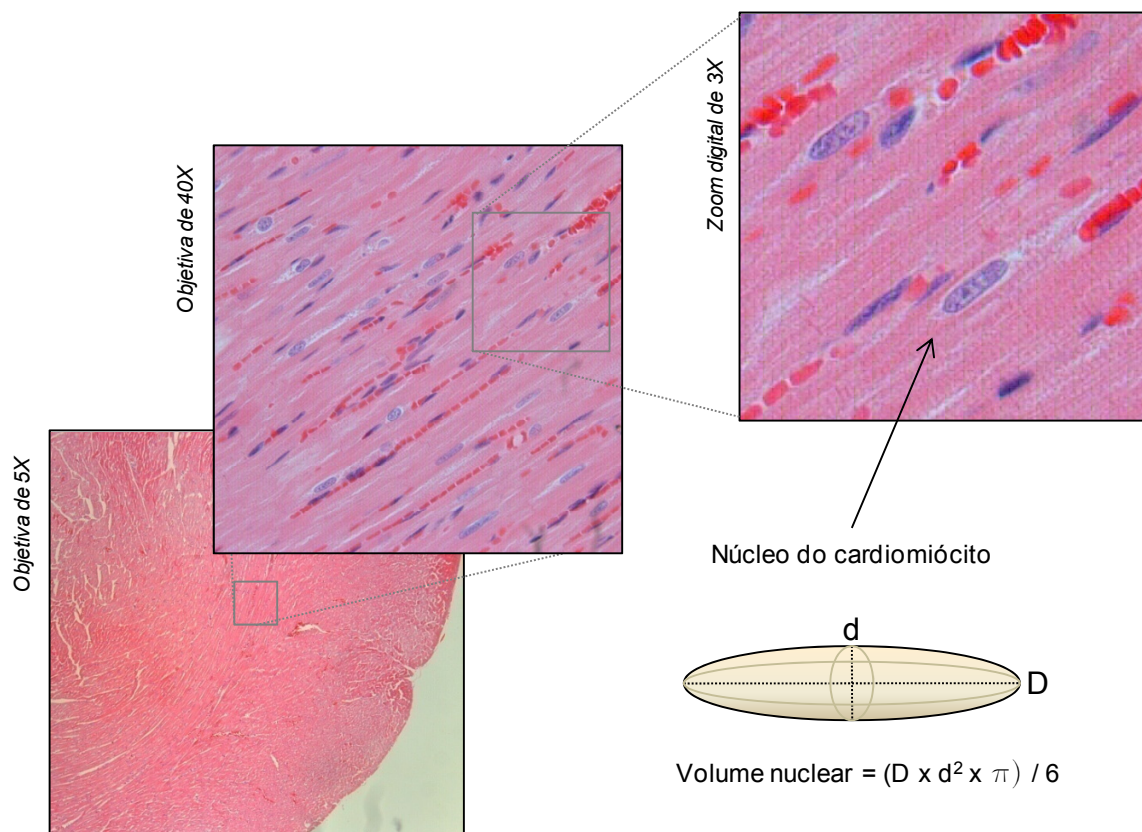
No estudo das isoformas 1 e 2 da subunidade  $\alpha$  da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase representado nos gráficos da Figura 19, nenhuma alteração foi identificada ( $p = 0,9369$ ) na expressão protéica da isoforma  $\alpha_1$  entre os grupos estudados (mIM:  $92,0 \pm 10,5\%$ ; mIM+BMC:  $95,3 \pm 7,5\%$ ; IM:  $93,3 \pm 4,1\%$ ; e IM+BMC:  $93,0 \pm 6,0\%$  do SHAM). Todavia, a expressão da isoforma  $\alpha_2$  foi significativamente inferior nos grupos mIM ( $47,0 \pm 9,9\%$ ;  $p < 0,01$  vs. SHAM) e IM ( $35,5 \pm 9,7\%$ ;  $p < 0,01$  vs. SHAM), e em níveis intermediários e estatisticamente indistinguíveis do grupo SHAM nos mIM+BMC ( $60,8 \pm 10,5\%$  do SHAM) e IM+BMC ( $62,5 \pm 16,2\%$  do SHAM) embora ainda exibissem valores reduzidos.



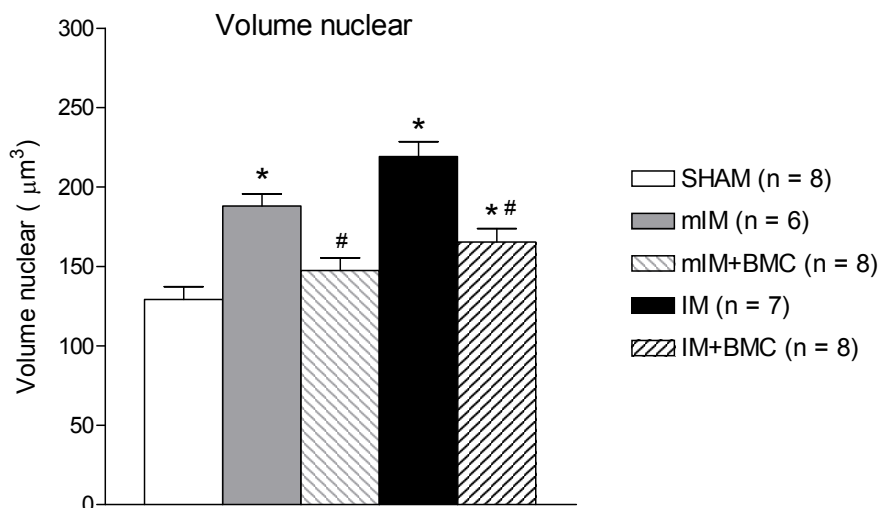
**Figura 19** – Radiografias das bandas típicas de western blot e respectivos níveis de expressão protéica (% em relação ao SHAM) das subunidades  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase de amostras do miocárdio remoto ao infarto. As barras representam médias  $\pm$  e.p.m. \* $p < 0,05$  vs. SHAM; # $p < 0,05$  vs. não-tratado. ANOVA 1-va seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni.

## 4.11. Estudos morfológicos por histologia

### 4.11.1. Volume nuclear do cardiomiócito remanescente ao infarto

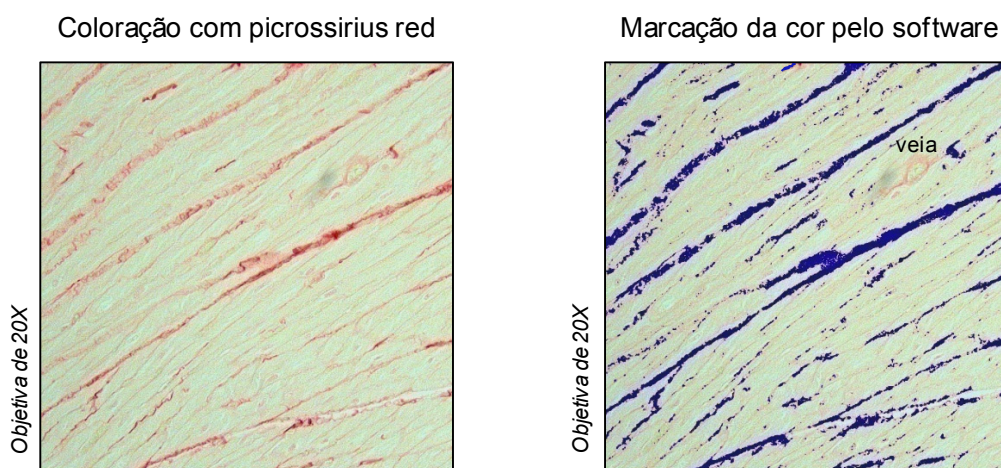


A Figura 20 representa graficamente as medidas do volume nuclear, usado como índice de hipertrofia do cardiomiócito, e que foi significativamente aumentado nos grupos mIM ( $188,3 \pm 7,5 \mu\text{m}^3$ ) e IM ( $219,3 \pm 9,3 \mu\text{m}^3$ ) comparado ao volume nuclear calculado a partir de regiões equivalentes de corações do grupo SHAM ( $129,3 \pm 7,9 \mu\text{m}^3$ ). De forma interessante, ambos os grupos submetidos à terapia celular apresentaram volumes nucleares estatisticamente menores que seus respectivos grupos não tratados (mIM+BMC:  $147,5 \pm 7,8 \mu\text{m}^3$ ;  $p < 0,05$  vs. mIM, e IM+BMC:  $165,3 \pm 8,4 \mu\text{m}^3$ ;  $p < 0,001$  vs. IM). Todavia, o grupo IM+BMC ainda se mostrou diferente do grupo SHAM ( $p < 0,05$ ), sugerindo prevenção parcial em relação aos grupos infartados e mantendo, portanto, certo grau de hipertrofia.



**Figura 20** – Volume nuclear dos cardiomiócitos (média ± e.p.m.) calculados de amostras da parede miocárdica septal. \* $p < 0,05$  vs. SHAM; # $p < 0,05$  vs. não-tratado. ANOVA 1-via seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni.

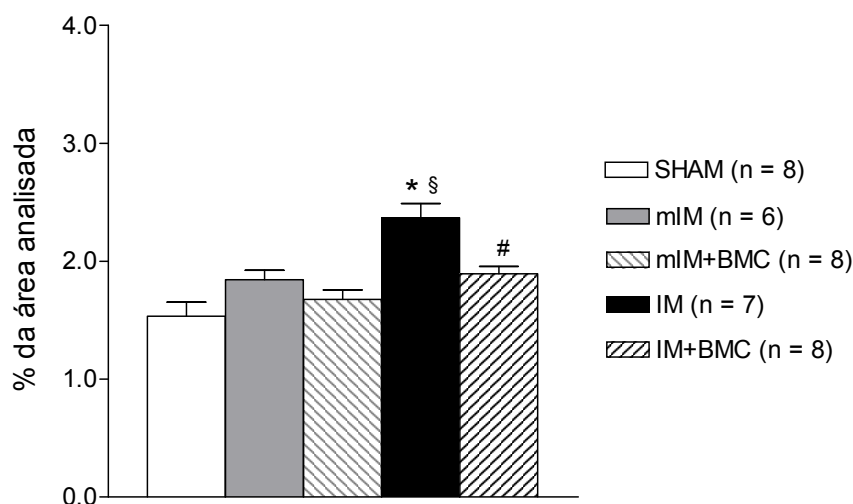
#### 4.11.2. Quantificação do colágeno no miocárdio remanescente ao infarto



$$\text{Percentual de colágeno intersticial} = \frac{\text{área marcada}}{\text{área total do campo}} \times 100$$

A quantificação do percentual de colágeno intersticial (Figura 21) no miocárdio remanescente nos mIM ( $1,84 \pm 0,08\%$  da área analisada) não foi estatisticamente diferente ( $p = 0,0679$ ) das medidas adquiridas em regiões equivalentes no SHAM ( $1,53 \pm 0,12\%$ ). Ainda que a média dos mIM+BMC (mIM+BMC:  $1,67 \pm 0,08\%$ ) fosse intermediária, não foi estatisticamente diferente do mIM ( $p = 0,1753$ ). Contudo, a fibrose intersticial do miocárdio remoto do grupo IM foi

significativa ( $2,37 \pm 0,12\%$ ;  $p < 0,001$  vs. SHAM e  $p < 0,01$  vs. mIM) enquanto os valores do grupo IM+BMC foram menores ( $1,89 \pm 0,06\%$ ;  $p < 0,01$  vs. IM) e estatisticamente indistinguíveis do grupo SHAM.



**Figura 21** – Fibrose intersticial do miocárdio remanescente ao infarto (percentagem de colágeno na área analisada) marcada pela coloração com picrossirius red. \* $p < 0,05$  vs. SHAM; # $p < 0,05$  vs. não-tratado; e § $p < 0,05$  vs. mIM. ANOVA 1-*via* seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni.

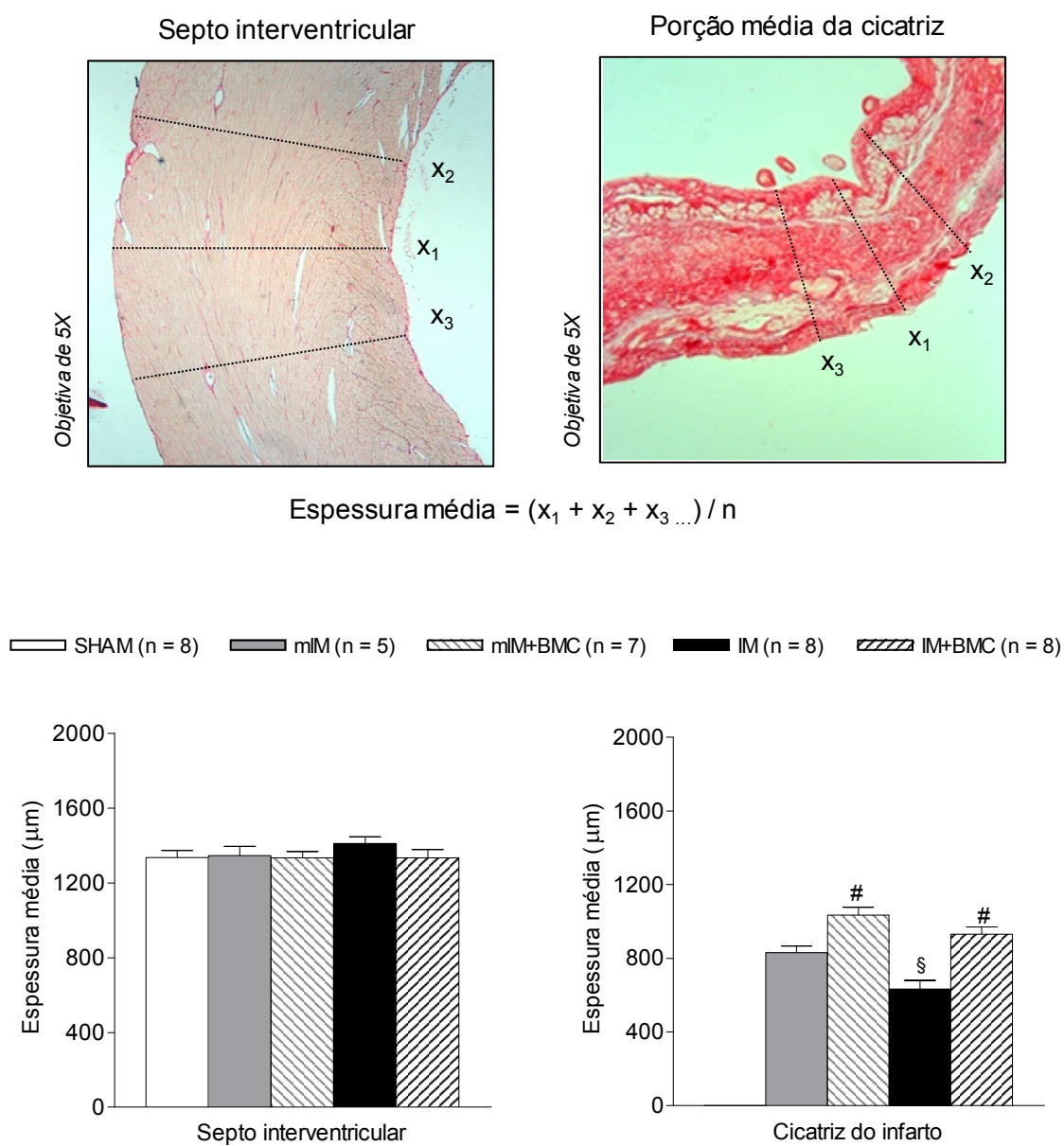
#### 4.11.3. Espessura média do miocárdio remanescente e da cicatriz do infarto

Estes resultados encontram-se graficamente representados na Figura 22. A espessura média da parede miocárdica representada pelo septo interventricular apresentou-se inalterada em todos os grupos estudados (SHAM:  $1.335 \pm 37$ ; mIM:  $1.346 \pm 48$ ; mIM+BMC:  $1.335 \pm 33$ ; IM:  $1.411 \pm 36$ ; e IM+BMC:  $1.333 \pm 44$   $\mu\text{m}$  de espessura,  $p = 0,5508$ ).

Já a avaliação da espessura do miocárdio intimamente envolvido pelo infarto, mostrou que a espessura da porção média da cicatriz formada pelo infarto foi, como já esperado, menor que a medida na parede tanto nos corações com moderados (mIM:  $829 \pm 37$   $\mu\text{m}$ ;  $p < 0,001$ ) e grandes infartos (IM:  $634 \pm 46$   $\mu\text{m}$ ;  $p < 0,001$ ), quanto dos grupos tratados mIM+BMC ( $1.035 \pm 42$   $\mu\text{m}$ ;  $p < 0,001$ ) e IM+BMC ( $930 \pm 41$   $\mu\text{m}$ ,  $p < 0,001$ ). Não obstante, a análise em separado da espessura média da cicatriz dos grupos experimentais ainda demonstrou que a espessura da porção média da cicatriz do infarto foi estatisticamente maior nos grupos tratados com BMC



em relação aos seus respectivos grupos não tratados ( $p < 0,05$  mIM+BMC vs. mIM; e  $p < 0,001$  IM+BMC vs. IM).



**Figura 22** – Espessura média da parede miocárdica remota a área de infarto (septo interventricular) e da porção média da cicatriz do infarto. As barras representam médias  $\pm$  e.p.m. # $p < 0,05$  vs. não-tratado; e § $p < 0,05$  vs. mIM. ANOVA 1-va seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni.

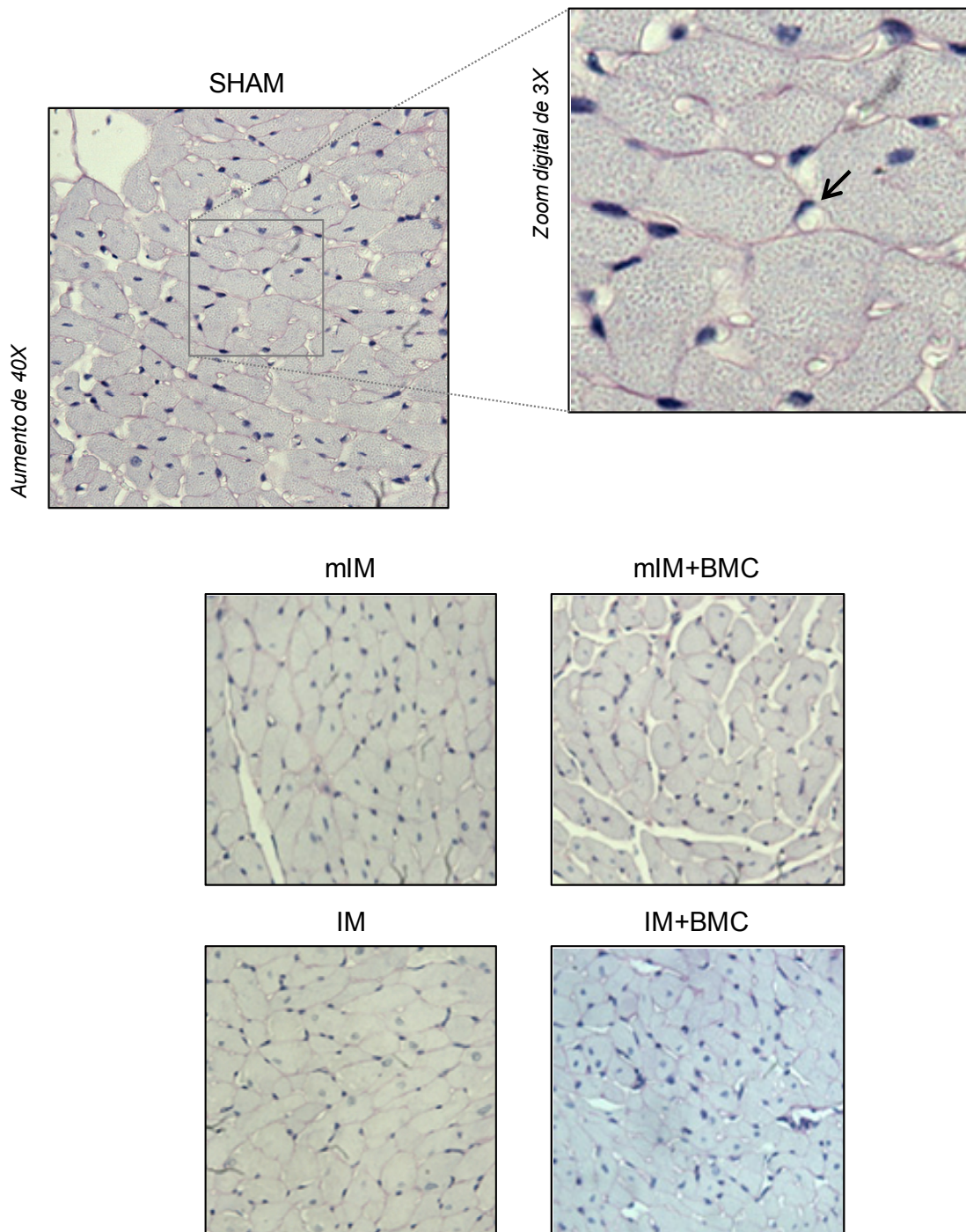
#### **4.11.4. Análise dos capilares sangüíneos na zona de transição e no miocárdio remoto ao infarto**

Considerando que trabalhos prévios da literatura demonstraram aumento significativo da angiogênese na zona de transição entre o infarto e o tecido viável, fez-se necessário para a presente investigação a quantificação dos capilares sangüíneos nestes grupos experimentais (exemplos típicos na Figura 23).

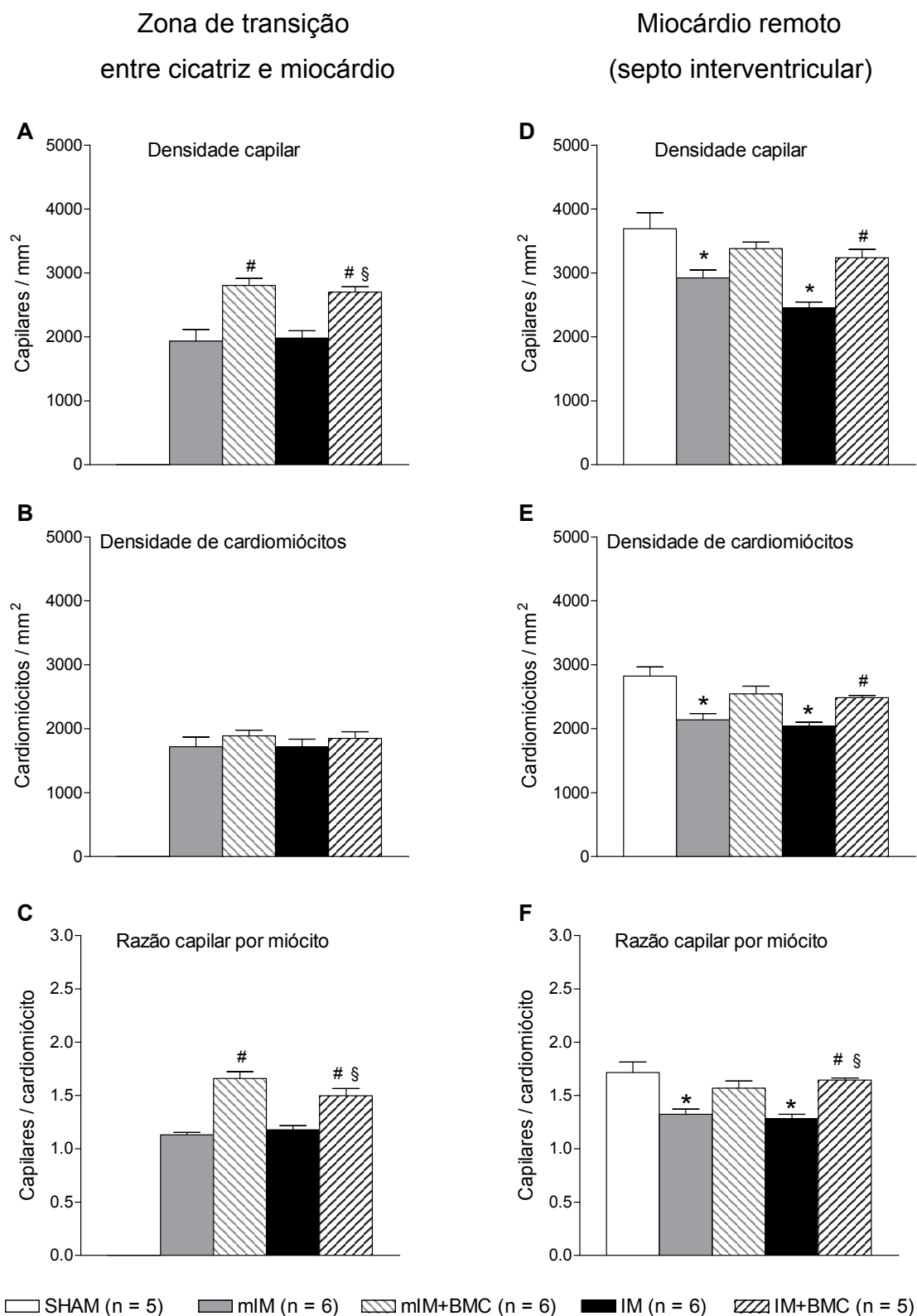
Para tanto, os cortes histológicos foram submetidos à coloração de PAS e os resultados encontram-se representados graficamente na Figura 24. A respeito da zona de transição, é digno de nota que além da terapia celular promover aumento na densidade capilar tanto nos moderados (mIM+BMC:  $2805 \pm 109$  vs. mIM:  $1933 \pm 183$  capilares/mm<sup>2</sup>;  $p < 0,001$ ) quanto grandes infartos (IM+BMC:  $2702 \pm 81$  vs. IM:  $1981 \pm 115$  capilares/mm<sup>2</sup>;  $p < 0,01$ ), também houve aumento significativo na relação capilar/cardiomiócito (mIM+BMC:  $1,658 \pm 0,065$  vs. mIM:  $1,130 \pm 0,023$ ,  $p < 0,001$ ; e IM+BMC:  $1,498 \pm 0,065$  vs. IM:  $1,178 \pm 0,036$ ,  $p < 0,01$ ), sem modificações na densidade de cardiomiócitos (mIM+BMC:  $1.887 \pm 89$ ; mIM:  $1,719 \pm 151$ ; IM+BMC:  $1,849 \pm 103$ ; e IM:  $1,714 \pm 123$  cardiomiócitos/mm<sup>2</sup>,  $p = 0,6499$ )

Em relação ao miocárdio remoto, a densidade capilar foi significativamente diminuída nos grupos infartados em relação ao grupo SHAM (mIM:  $2.924 \pm 120$ ,  $p < 0,01$ ; e IM:  $2.454 \pm 90$ ,  $p < 0,001$  vs. SHAM:  $3.691 \pm 248$  capilares/mm<sup>2</sup>), enquanto foi semelhante ao SHAM nos grupos tratados (mIM+BMC:  $3.379 \pm 103$ ; e IM+BMC:  $3.239 \pm 129$  capilares/mm<sup>2</sup>). Apesar da relação entre capilar/cardiomiócito estar menor nos grupos infartados (mIM:  $1,323 \pm 0,048$ ; e IM:  $1,282 \pm 0,042$  capilares/cardiomiócitos), estes valores adquiridos no miocárdio remoto ao infarto ainda se mostraram superiores àqueles da *border zone* ( $p = 0,0208$  para mIM; e  $p = 0,0232$  para IM). Ademais, a relação capilares/cardiomiócitos teve níveis equivalentes ao SHAM nos grupos tratados com BMC (mIM+BMC:  $1,568 \pm 0,066$ ; e IM+BMC:  $1,644 \pm 0,020$  capilares/cardiomiócito). Finalmente, a quantidade de cardiomiócitos observados por área foi estatisticamente menor em mIM ( $2.139 \pm 100$  cardiomiócitos/mm<sup>2</sup>,  $p < 0,001$  vs. SHAM) e IM ( $2.039 \pm 60$ ,  $p < 0,001$  vs. SHAM) enquanto nos animais submetidos à terapia celular, houve preservação quase total deste índice (mIM+BMC:  $2.544 \pm 122$ ,  $p = 0,0518$  vs. mIM; e IM+BMC:  $2.483 \pm 37$  cardiomiócitos/mm<sup>2</sup>,  $p < 0,05$  vs. IM) com valores semelhantes aos do grupo SHAM ( $2.823 \pm 142$  cardiomiócitos/mm<sup>2</sup>).

## Análise da densidade capilar por histoquímica



**Figura 23** – Microfotografias representativas dos grupos experimentais obtidas pela coloração com PAS, e visualização (contagem) dos capilares sanguíneos. A seta aponta para um típico capilar em detalhe maior aumento.



**Figura 24** – Análise dos capilares sanguíneos realizada na zona de transição entre cicatriz e miocárdio, e no tecido remoto ao infarto, avaliando densidade capilar (**A** e **D**), densidade de cardiomiócitos (**B** e **E**) e relação capilar por cardiomiócito (**C** e **F**). As barras representam médias  $\pm$  e.p.m. \* $p < 0,05$  vs. SHAM; # $p < 0,05$  vs. não-tratado; e § $p < 0,05$  vs. mIM. ANOVA 1-via seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni.

## **5. DISCUSSÃO**

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Aspectos metodológicos

#### 5.1.1. O animal de experimentação

Os estudos experimentais de fisiologia e fisiopatologia cardiovascular têm se valido quase exclusivamente da utilização do rato e de outras espécies de pequeno porte. O modelo experimental do IM no rato, utilizado neste trabalho, já está suficientemente consolidado na literatura como modelo de insuficiência cardíaca, desde seus primeiros princípios técnicos inicialmente descritos por Heimburger (1946) e Johns & Olson (1954) até os mais recentes trabalhos (Fishbein *et al.*, 1978; Litwin, 1995; Francis *et al.*, 2001) que caracterizaram repercussões cardíacas e sistêmicas bastante semelhantes às dos humanos. Há algumas décadas, o desenvolvimento de modelos geneticamente modificados transferiu ao camundongo grande popularidade nos estudos experimentais em cardiologia (Field, 1993). A facilidade na reprodução e rápido ciclo de vida também aumentam a vantagem do seu uso. Especialmente envolvendo terapias gênicas e celulares no infarto, o camundongo vem sendo utilizado em importantes trabalhos (Orlic *et al.*, 2001a; Hiasa *et al.*, 2004; Soares *et al.*, 2004; Ebel *et al.*, 2007; Iso *et al.*, 2007). Todavia, devido à nossa pouca experiência com essa espécie e à necessidade de adaptação e padronização das diversas metodologias abordadas neste trabalho para o novo animal de experimentação, optamos pela utilização dos ratos que satisfaria nossos propósitos.

A escolha da linhagem e do sexo dos animais é de relevante menção. A maioria dos trabalhos com ratos utiliza as linhagens Wistar ou Sprague-Dawley. Entretanto, apesar da facilidade de obtenção dessas linhagens, e do freqüente uso

em investigação cardiovascular, optamos pelo uso da linhagem *Lewis-inbred*, visto que em estudos envolvendo transplante de órgãos, células, sangue ou derivados, é importante que o desenho experimental permita um procedimento sem possibilidades de rejeição. De fato, são freqüentes os estudos com terapia celular utilizando ratos *Lewis-inbred* (Jain *et al.*, 2001; Nagaya *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004a; Qian *et al.*, 2007; Hale *et al.*, 2008). Além disso, sua escolha tem se mostrado bastante útil, pois a linhagem *Lewis-inbred* possui menor variabilidade no padrão de distribuição da vasculatura coronariana e no tamanho do IM produzido pela oclusão vascular, além de menor mortalidade aguda (11% nas primeiras 24h) e tardia (9% até seis meses pós-cirurgia), quando comparado a linhagens não isogênicas (Liu *et al.*, 1997). Em nossa casuística, dos 64 animais submetidos à oclusão coronariana, somente 11 (17%) tiveram tamanho do infarto inferior a 30% do VE, demonstrando aceitável uniformidade dos infartos. Ademais, a mortalidade durante as 48 horas seguintes à oclusão coronariana foi de apenas 6%, e durante as seis semanas seguintes foi de 4,5% para os infartados sem terapia e 0% para os tratados, corroborando a idéia proposta para a linhagem *Lewis-inbred*.

Outra particularidade metodológica envolvendo o animal de experimentação é o sexo. A grande maioria dos autores utiliza ratos machos para reproduzir o modelo de infarto (Fishbein *et al.*, 1978; Spadaro *et al.*, 1980; Litwin *et al.*, 1994; Wagner *et al.*, 1997; Yamaguchi *et al.*, 1997; Gosselin *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 2000; Jain *et al.*, 2001). Todavia, também é freqüente o uso de fêmeas no estudo do infarto do miocárdio e IC (Pfeffer *et al.*, 1979; Pfeffer *et al.*, 1991; Opitz *et al.*, 1995; Kanashiro *et al.*, 2002; Agbulut *et al.*, 2006; Flumignan *et al.*, 2006; Kanashiro *et al.*, 2006; Peron *et al.*, 2006; dos Santos, 2008). Neste trabalho, a utilização de fêmeas para o infarto deveu-se principalmente ao implante de células de machos em corações infartados de fêmeas possibilitar a identificação de células implantadas pelo cromossomo Y do rato macho (An *et al.*, 1997; Müller-Ehmsen *et al.*, 2002). Neste sentido, são freqüentes os trabalhos com transplante de células de macho em fêmeas infartadas (Müller-Ehmsen *et al.*, 2002; Limbourg *et al.*, 2005; Müller-Ehmsen *et al.*, 2006; de Macedo Braga *et al.*, 2008a; de Macedo Braga *et al.*, 2008b; Frantz *et al.*, 2008; Imanishi *et al.*, 2008; Mazo *et al.*, 2008). Vale mencionar que, para evitar possível reação imunológica causada pela imunização peri-natal materna, somente utilizamos no estudo ratas fêmeas nuli-gestas.

### **5.1.2. A terapia celular**

No que se refere à terapia celular, existem vários pontos metodológicos de escolha que, provavelmente, influenciaram em nossos resultados. Um deles foi o momento para aplicação da terapia. Optamos por implantar as células 48 horas após oclusão coronariana, pois na evolução natural do IM em ratos, este é um período em que a necrose já está completa, o processo inflamatório reduziu mas ainda mantém sinalizações quimiotáticas importantes, e ainda não são evidenciados os efeitos deletérios do remodelamento cardíaco.

As reações inflamatórias na fase aguda do infarto do miocárdio exercem papel relevante na terapia celular, embora algumas citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas do oxigênio possam comprometer a sobrevivência de células recém chegadas ao tecido acometido (Vandervelde *et al.*, 2005). No rato, estudos descreveram que ocorre maior presença das células implantadas e benefícios sobre a função cardíaca quando o procedimento é realizado dentro na primeira ou segunda semana pós-injúria, em comparação ao implante imediatamente após o IM ou demasiadamente tardio (Li *et al.*, 2001; Hu *et al.*, 2007). Ademais, há referências de aumento significativo na expressão de moléculas responsáveis pela atração e fixação de células precursoras como tendo seu pico de expressão miocárdica entre as 24 e 72 horas do pós-infarto (Abbott *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2005). De fato, para maior fixação, sobrevivência e efeitos biológicos, a terapia celular deve ser instituída em um período no qual o processo inflamatório esteja diminuído, mas que vários dos mecanismos de sinalização, taxa e reparação tecidual estejam atuantes (Vandervelde *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2007).

Apesar destas concepções, a escolha do momento depende primariamente do objetivo terapêutico: Para impedir a perda de cardiomiócitos durante a isquemia e limitar a extensão da necrose, os estudos têm se valido do implante imediatamente após ou dentro de alguns minutos após oclusão coronariana, mesmo contando com o ambiente menos propício para sobrevivência das células (Min *et al.*, 2002; Hiasa *et al.*, 2004; Nagaya *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004a; Limbourg *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2005; Yamada *et al.*, 2006; Boomsma *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2007; Burchfield *et al.*, 2008; Imanishi *et al.*, 2008). Se o objetivo não é necessariamente evitar a necrose isquêmica e sim amenizar o processo de resolução do IM e remodelamento ventricular, a terapia tem sido instituída preferencialmente após a



amenização da reação inflamatória aguda, geralmente entre o primeiro e o sétimo dia após IM (Hiasa *et al.*, 2004; Dai *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2005; Uemura *et al.*, 2006; de Macedo Braga *et al.*, 2008a; de Macedo Braga *et al.*, 2008b; Frantz *et al.*, 2008). Por último, nos estudos que avaliaram a capacidade dessa terapia regenerar o tecido perdido ou restaurar a função cardíaca deteriorada, implantes tão tardios quanto semanas até um mês após oclusão são descritos (Tomita *et al.*, 1999; Olivares *et al.*, 2004; Agbulut *et al.*, 2006; Hou *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2008; Mazo *et al.*, 2008).

Dessa forma, os dados existentes atualmente apontam evidências de que a terapia celular pode prevenir ou mesmo reverter o processo deletério que se segue após o infarto do miocárdio, de acordo com o momento em que é realizado. Ao decidirmos pela injeção após 48 horas, seria eliminada a possibilidade de a terapia celular agir sobre a sobrevida do miocárdio isquêmico, e dessa maneira os possíveis efeitos benéficos adviriam de sua modulação sobre o processo de resolução da cicatriz e de remodelamento do tecido remanescente.

Outro ponto de decisão na terapia celular é a escolha do tipo celular e sua origem. As células-tronco utilizadas experimentalmente no IM podem ser de origem embrionária ou adulta. Embora os estudos utilizando células-tronco embrionárias mostrem fixação no miocárdio, evidências de diferenciação ou fusão celular e melhora da função cardíaca (Min *et al.*, 2002; Roell *et al.*, 2002; Kolossov *et al.*, 2006; Ebel *et al.*, 2007), seu uso em humanos implica em reflexões éticas, risco de transformação neoplásica e imunorrejeição ou reação enxerto/hospedeiro (Evans, 2005; Kolossov *et al.*, 2006; Šaric *et al.*, 2008). O uso de células precursoras encontradas no indivíduo adulto é uma opção bastante estudada atualmente por possibilitar transplantes autólogos e fácil aplicação clínica. Nas duas últimas décadas, estudos experimentais e clínicos com implante de mioblastos esqueléticos adultos descreveram resultados benéficos sobre o IM (Reffelmann & Kloner, 2003; Smits, 2004; Wollert & Drexler, 2006), mas existem também limitações ao seu uso. Sua relativa escassez no indivíduo adulto e seu potencial arritmogênico (Reinecke *et al.*, 2000; Léobon *et al.*, 2003) têm incentivado a busca de fontes alternativas.

A medula-óssea adulta possui células progenitoras, multipotentes, as quais podem se diferenciar em vários tipos não sanguíneos como músculo, cartilagem, osso, gordura e neurônios e, dessa forma, poderiam ser classificadas também como

células-tronco (Reffelmann & Kloner, 2003; Anversa *et al.*, 2006). Nesta última década, as células-tronco adultas derivadas da medula-óssea têm sido freqüentemente utilizadas em Cardiologia, obtendo resultados positivos tanto em estudos experimentais, quanto clínicos (Reffelmann & Kloner, 2003; Charwat *et al.*, 2008; Segers & Lee, 2008; Wollert, 2008). Além do potencial regenerativo e de possibilitar transplante autólogo, postula-se também que estas células possuam a capacidade de produzir diversos fatores que auxiliariam no recrutamento de células-tronco do próprio indivíduo (Kamihata *et al.*, 2001; Tang *et al.*, 2005; Gneocchi *et al.*, 2006; Takahashi *et al.*, 2006; Uemura *et al.*, 2006; Iso *et al.*, 2007; Frantz *et al.*, 2008), induziriam neovasculogênese (Kamihata *et al.*, 2001; Tang *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2005; Berry *et al.*, 2006; Gneocchi *et al.*, 2006; Takahashi *et al.*, 2006; Uemura *et al.*, 2006; Iso *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2007), influenciariam no processo inflamatório (Kamihata *et al.*, 2001; Lin, 2004; Takahashi *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2007; Iso *et al.*, 2007; Burchfield *et al.*, 2008; Frantz *et al.*, 2008; Imanishi *et al.*, 2008) e impediriam apoptose e perda celular seguintes ao infarto (Kamihata *et al.*, 2001; Lin, 2004; Tang *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2005; Gneocchi *et al.*, 2006; Uemura *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2007; Iso *et al.*, 2007).

Embora importantes estudos se valessem do uso de subtipos ou linhagens específicas contidas na medula, grande parte dos trabalhos experimentais e a maioria dos estudos clínicos, ao abordar células da MO, utilizaram sua fração mononuclear, formada por um conjunto de células de potencialidades e características fenotípicas distintas, contendo precursoras hematopoiéticas e mesenquimais (Segers & Lee, 2008). Esse *pool* celular merece destaque por sua utilização na prática médica, pois é extraído, separado e implantado em poucas horas, sem necessidade de passagens em cultura celular. Com isso, pensando na facilidade técnica de obtenção, e na melhor aproximação dos resultados já obtidos por vários trabalhos experimentais e grandes estudos clínicos, optamos pela utilização das células da fração mononuclear da medula-óssea, para melhor entender seus efeitos sobre o remodelamento do miocárdio remoto ao infarto.

Não obstante, recentemente foi proposto que outras fontes de células-tronco no indivíduo adulto possuam utilidade promissora, como as células obtidas do tecido adiposo. Estudos demonstrando que estas células são capazes de se diferenciarem *in vitro* em vários tipos celulares, incluindo miócitos (Zuk *et al.*, 2002; Rangappa *et*

*al.*, 2003), secretar fatores angiogênicos e anti-apoptóticos (Rehman *et al.*, 2004), e promover benefícios no IM experimental (Rehman *et al.*, 2004; Yamada *et al.*, 2006; Mazo *et al.*, 2008), refletem o potencial do uso de células-tronco derivadas do tecido adiposo no futuro próximo.

Ademais, as escolhas da via de administração e do local de injeção destas células, podem ser também decisivas. O implante de células-tronco pode ser realizado por três vias: intravascular, intracavitária ou intramiocárdica. Embora a via intravenosa tenha sido utilizada em alguns estudos experimentais (Barbash *et al.*, 2003; Nagaya *et al.*, 2004; Boomsma *et al.*, 2007) como um procedimento pouco invasivo e que possibilita a administração de uma grande quantidade de células, essa rota cursa com insuficiente migração e fixação no coração infartado e com retenção significativa das células em outros órgãos (Barbash *et al.*, 2003; Freyman *et al.*, 2006; Hale *et al.*, 2008). A infusão intracoronariana, apesar de impossibilitar a implantação celular nas áreas em que a reperfusão não se estabelece (Wang *et al.*, 2001; Strauer *et al.*, 2002), é um método aplicável durante procedimentos menos invasivos que a toracotomia, e sua segurança e eficácia têm sido descritas em vários estudos clínicos já finalizados ou em andamento (Charwat *et al.*, 2008; Segers & Lee, 2008). É possível, também, que injeções intramiocárdicas sejam realizadas por via intravascular, por meio de cateteres especialmente desenhados que, por um acesso arterial, adentram a cavidade ventricular esquerda (Perin, 2004; Fuchs *et al.*, 2006) de forma mais eficiente que por cirurgia (Chachques *et al.*, 2007).

Já nos estudos experimentais em animais de pequeno porte, a injeção intracoronariana é tecnicamente muito difícil, havendo raras descrições na época do desenvolvimento do nosso projeto de pesquisa. Naquela ocasião, o implante diretamente no miocárdio era o método experimental mais comumente utilizado (Tomita *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2001; Orlic *et al.*, 2001a; Roell *et al.*, 2002; Agbulut *et al.*, 2003; Mangi *et al.*, 2003; Olivares *et al.*, 2004) e com resultados superiores aos de outras rotas (Hayashi *et al.*, 2004; Hale *et al.*, 2008). Todavia, mais recentemente foram publicados alguns estudos utilizando a via intracoronariana para injeção de BMC em ratos, concluindo-se como um procedimento factível (Agnoletti *et al.*, 2007; Qian *et al.*, 2007). Nós optamos pela via intramiocárdica de administração no presente estudo, pois o procedimento cirúrgico não cursaria com demasiada

mortalidade dos animais e a injeção poderia ser feita em áreas específicas de interesse, sem excessivas perdas e aumentando a probabilidade de fixação miocárdica local.

Com a escolha do tipo celular, momento da injeção e via de administração, a eficácia do procedimento costuma ser avaliada pela pesquisa das células no local implantado. Inúmeros são os métodos utilizados para marcação e posterior identificação celular após o implante. Boa parte dos estudos experimentais utiliza marcadores intracitoplasmáticos ou nucleares incubados com as células, para serem captados e posteriormente identificados por métodos radiométricos, colorimétricos, histoquímicos ou imunohistoquímicos (Tang *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2005; Berry *et al.*, 2006; Boomsma *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2007). Outra opção freqüentemente utilizada é o uso de células provenientes de animais geneticamente modificados ou mesmo células modificadas *in vitro* para produzir uma proteína fluorescente (*green fluorescent protein*), que possibilite sua identificação por métodos de fluorescência (Min *et al.*, 2002; Fukuhara *et al.*, 2005; Gnechchi *et al.*, 2006; Uemura *et al.*, 2006; Iso *et al.*, 2007).

Em nosso trabalho, a presença das células implantadas foi avaliada, por amostragem, através da pesquisa do cromossomo Y das células de ratos machos no coração das fêmeas infartadas e submetidas ao implante. Este tipo de identificação das células transplantadas em experimentos sexo-cruzados tem sido freqüentemente utilizada (Müller-Ehmsen *et al.*, 2002; Limbourg *et al.*, 2005; de Macedo Braga *et al.*, 2008a; de Macedo Braga *et al.*, 2008b; Frantz *et al.*, 2008), seja utilizando métodos quantitativos (PCR em tempo real, ou hibridização *in situ*) ou qualitativos (PCR simples) de análise. Nossos ensaios de PCR produziram polimerização da seqüência específica do cromossomo Y em amostras de VE colhidas após dez minutos da injeção, indicando que o procedimento de implante foi eficaz. Ademais, amostras de VE colhidas após um, dois e cinco dias após a injeção também mostraram produtos do PCR positivos para Sry com intensidade relativamente menor que aquela após dez minutos. Finalmente, a intensidade da banda do PCR diminuiu progressivamente na primeira semana e foi quase imperceptível na sexta semana, sugerindo que, provavelmente, um número muito pequeno dessas células permaneceu no coração infartado, corroborando outros autores (Limbourg *et al.*, 2005; Müller-Ehmsen *et al.*, 2006; Frantz *et al.*, 2008).

De fato, existem estudos mostrando que as células implantadas podem estar em número muito reduzido ou, até mesmo, não serem mais encontradas após três ou quatro semanas de implante (Limbourg *et al.*, 2005; Uemura *et al.*, 2006; Iso *et al.*, 2007; de Macedo Braga *et al.*, 2008b; Frantz *et al.*, 2008), apesar dos resultados benéficos sobre a função cardíaca permanecerem. Estes resultados reforçam a hipótese de que existe um papel mediador das BMC, talvez mais importante que sua presença no coração infartado.

### **5.1.3. A questão do exame ecocardiográfico na quantificação do IM**

A deterioração da função cardíaca em ratos é intimamente dependente da extensão do infarto produzido pela oclusão coronariana. Depois dos primeiros trabalhos aplicarem a ecocardiografia a ratos submetidos ao IM (Baily *et al.*, 1993; Litwin *et al.*, 1994; Schwarz *et al.*, 1998; Moisés *et al.*, 2000), os estudos morfo-funcionais cardíacos ganharam a importante possibilidade do acesso *in vivo*, *in situ* e com medidas repetidas no acompanhamento das doenças cardiovasculares e das repercussões terapêuticas testadas. Soma-se aos dados morfo-funcionais, a capacidade deste exame também quantificar a extensão do miocárdio envolvido no processo isquêmico-necrótico de forma não invasiva (Baily *et al.*, 1993; Pawlusch *et al.*, 1993; Litwin *et al.*, 1994; Schwarz *et al.*, 1998; Sjaastad *et al.*, 2000; Cury *et al.*, 2005; Nozawa *et al.*, 2006; Ahmet *et al.*, 2008).

Entretanto, como nossa avaliação de controle, antes da randomização dos grupos experimentais, seria feita às 48 horas após oclusão coronariana, e não havia dados na literatura sobre a estimativa do tamanho do infarto pelo ECO num período tão precoce, foi necessária a realização do estudo preliminar descrito no Anexo 2. Nestes experimentos, dos quais parte resultou em uma publicação (dos Santos, 2008), evidenciamos satisfatória concordância entre a avaliação ecocardiográfica do tamanho do IM em comparação à medida da porção necrótica analisada por histoquímica, quando realizadas tão precoce quanto dois e sete dias, como também tardiamente após oclusão. Esses dados nos transmitiram segurança em analisar os resultados de tamanho do IM obtidos nos momentos estudados.

#### **5.1.4. A questão da avaliação hemodinâmica sob condições basais**

Ao se estudar a progressão da disfunção ventricular após o infarto, parece consenso que em quatro semanas evidenciam-se sinais de insuficiência ventricular ou disfunção sistólica em ratos portadores de grandes infartos (Pfeffer *et al.*, 1979; Fletcher *et al.*, 1981; Anand *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1997). Porém, mesmo neste período pós-cicatrização, é freqüente encontrar parâmetros hemodinâmicos normais ou muito próximos à normalidade quando avaliados sob condições basais (Pfeffer *et al.*, 1979; dos Santos *et al.*, 2006). Dessa forma, foi necessário encontrar métodos capazes de evidenciar o prejuízo no desempenho ventricular nestes casos. Em outro estudo preliminar, testamos o estresse súbito da pós-carga sobre a hemodinâmica de ratos saudáveis e infartados. Este procedimento foi capaz de identificar depressões do desempenho cardíaco em ratos infartados de diversos tamanhos de IM, mesmo quando os parâmetros hemodinâmicos se apresentaram normais ou muito próximos a normalidade, quando avaliados sob condições basais (dos Santos *et al.*, 2006). Resultados semelhantes foram descritos anteriormente por outros autores estudando sobrecargas hemodinâmicas em ratos e cães com IC (Hood *et al.*, 1969; Pfeffer *et al.*, 1979; Fletcher *et al.*, 1981; Fletcher *et al.*, 1982).

#### **5.1.5. Área de secção transversa e a força desenvolvida pelo músculo papilar**

Nas preparações de músculo papilar isolado de ratos, a nutrição é feita por difusão pela embebição em soluções oxigenadas. Dessa maneira, admite-se que a área seccional transversa (AS) dos músculos exerça influência sobre a força desenvolvida, tanto pela quantidade de sarcômeros envolvidos, quanto pela difusão de nutrientes e oxigênio para as áreas mais centrais do músculo (Frezza & Bing, 1976; Paradise *et al.*, 1981; Widén & Barclay, 2005). Conseqüentemente, o ideal é que se utilizem músculos papilares com AS equivalentes ou menores possíveis e normalize a força pela AS de cada músculo (Frezza & Bing, 1976; Paradise *et al.*, 1981).

No presente estudo, somente os papilares do grupo IM apresentaram AS estatisticamente maior que a dos demais. Com essa preocupação, somente utilizamos para as análises os músculos papilares com área AS inferior a 1,5 mm<sup>2</sup>, e normalizamos parâmetros de força pela respectiva AS.

## 5.2. Avaliação de controle ou pré-terapia

O ECO realizado antes da randomização dos grupos tratados ou não tratados evidenciou disfunção sistólica proporcional à extensão do infarto. Apesar de pequenas diferenças no tempo decorrido após oclusão coronariana para avaliação ecodopplercardiográfica em ratos, há concordância entre os nossos dados e os relatados na literatura (Litwin *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1997; Litwin *et al.*, 1999; Solomon *et al.*, 1999; Moisés *et al.*, 2000; Sjaastad *et al.*, 2000; Burstein *et al.*, 2007; Miranda *et al.*, 2007; Sallinen *et al.*, 2007), ao se caracterizar disfunção ventricular já na fase aguda pós-IM. Além disso, particularmente nos ratos com grandes infartos, identificamos também disfunção diastólica e pequena dilatação ventricular, mas nenhuma sugestão de hipertensão pulmonar. De fato, Solomon *et al.* (1999) realizaram avaliações morfo-funcionais seriadas por ECO na fase aguda do infarto em ratos e descreveram que, após 48 horas da oclusão coronariana, há depressão na função cardíaca global em todos os animais, enquanto o aumento no volume diastólico do VE somente foi detectado nos grandes infartos. Recentemente, Sallinen *et al.* (2007) e Miranda *et al.* (2007) observaram dilatação ventricular, já ao fim das primeiras 24 horas, também nos animais portadores de grandes infartos. Após esta fase aguda, compreendida pelas primeiras 72 horas, as características morfo-funcionais se mantêm relativamente estáveis até o sétimo dia, quando são notadas alterações progressivamente mais intensas e próprias do remodelamento cardíaco.

Portanto, a obtenção desses dados basais, antes da terapia experimental, nos permitiu evidenciar que já havia disfunção sistólica causada pela acinesia da parede ventricular infartada, com algum grau de dilatação ventricular e disfunção diastólica principalmente nos grandes infartos, mas ainda sem sinais sugestivos de IC. Além disso, possibilitou também examinar a evolução temporal ao fim das seis semanas de acompanhamento em comparação a esta avaliação basal.

Ademais, após a randomização dos grupos experimentais a serem submetidos à injeção de salina ou BMC, pudemos compará-los a fim de assegurar sua adequada homogeneidade. A análise estatística permitiu concluir que não houve nenhuma diferença entre os grupos tratados e não tratados, em relação aos parâmetros morfológicos ou funcionais, e aos tamanhos dos infartos. Dessa maneira, as diferenças observadas na avaliação após o implante puderam ser atribuídas à intervenção terapêutica com maior segurança.

### 5.3. Avaliação terapêutica sobre a função cardíaca global

A escolha do período de seguimento de seis semanas após a produção do infarto e o implante celular baseou-se na concepção de que após esse período já se estabelecem, nesta linhagem isogênica e outras linhagens de ratos, as características relativas ao remodelamento cardíaco - hipertrofia, dilatação e disfunção cardíacas, e congestão pulmonar - típicas da IC (Litwin *et al.*, 1991; Litwin & Morgan, 1992; Litwin *et al.*, 1994; Anand *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1997; Litwin *et al.*, 1999; Gupta *et al.*, 2000; Wasserstrom *et al.*, 2000; Sande *et al.*, 2002; Sjaastad *et al.*, 2005; Kanashiro *et al.*, 2006). Como queríamos estudar o efeito do implante celular sobre o remodelamento global e miocárdico, este pareceu-nos um momento adequado.

#### 5.3.1. Dados ponderais

A comparação das massas corpóreas dos animais no momento do primeiro exame ecocardiográfico demonstrou que os grupos não diferiram. Ademais, comparando as massas obtidas ao fim das seis semanas de seguimento em relação à massa inicial, notamos que o ganho nas ratas SHAM foi de 10%, não diferindo, também neste momento, dos demais grupos, que demonstraram ganho ponderal de 10 a 13%. O ganho ponderal desses animais foi equivalente aos dados fornecidos pelo Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB-UNICAMP), mantenedor e fornecedor desta linhagem para nosso trabalho, para ratas Lewis-*inbred* adultas jovens.

Além disso, nossos dados sugerem que mesmo a IC presente nos grandes infartos não interferiu significativamente na curva de ganho ponderal esperada para os animais, e corroboram os descritos por Liu *et al.* (1997) e Jain *et al.* (2001) também em ratos Lewis-*inbred*. Portanto, também não foi possível identificar diferença entre as massas dos grupos tratados e não tratados. Como consequência, naqueles parâmetros rotineiramente normalizados pela massa corpórea, esta indexação não interferiu na análise dos resultados e comparações entre os grupos.



### **5.3.2. Sobrevida aguda e no seguimento de seis semanas**

Como já mencionado anteriormente, a mortalidade acumulada nas primeiras 48 horas seguintes à oclusão coronariana foi de apenas 6%. Apesar da equivalência desta incidência de mortes em relação aos 11% obtidos por Liu *et al.* (1997) e aos 15% obtidos por Jain *et al.* (2001) com essa mesma linhagem isogênica, nota-se clara divergência com os números normalmente descritos na literatura utilizando outras linhagens de ratos (Opitz *et al.*, 1995; Leenen & Yuan, 2001; Chen *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2006). Vale notar que essas variações são decorrentes da linhagem de ratos utilizada, do sexo, do anestésico, das técnicas cirúrgicas e das condições de manejo no pós-operatório. A maioria dos estudos utilizando ratos fêmeas e machos, de linhagens como Wistar ou Sprague-Dawley, descreve mortalidade aguda de 30% a 65% nas primeiras 24 a 48 horas, causada principalmente por arritmias (Opitz *et al.*, 1995; Leenen & Yuan, 2001; Chen *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2006). De fato, parece consenso que, nas primeiras horas seguintes à oclusão coronariana, ocorre uma série de eventos arrítmicos, principalmente taquicardia ventricular e fibrilação ventricular, concentradas em dois momentos críticos: entre o pós-cirúrgico imediato e os 30 minutos; e entre os 90 minutos e nove horas pós-oclusão arterial (Opitz *et al.*, 1995). É descrito que após estes dois momentos, geralmente ocorre um “silêncio” nos episódios de arritmias letais que se perduram pelos primeiros dois ou três dias. Todavia, acreditamos que a razão da baixa mortalidade encontrada no nosso estudo deriva principalmente da combinação do uso de fêmeas, e desta linhagem isogênica, que também cursa com menor mortalidade após oclusão coronariana (Liu *et al.*, 1997).

Após essas 48 horas iniciais, nosso procedimento de anestesia para avaliação ecocardiográfica pré-terapia cursou com dois óbitos, somente no grupo infartado. Apesar de não termos feito necropsia dos animais, temos experiência de que os ratos que morrem em decorrência de anestesia neste período, geralmente possuem grandes infartos e sinais de congestão pulmonar (Flumignan *et al.*, 2006). Outro ponto importante é a mortalidade ocasionada pelo procedimento de implante celular, feito por meio de nova toracotomia. Em nossa casuística, este segundo procedimento cirúrgico levou a ocorrência de raros óbitos, e em magnitude semelhante nos grupos, mesmo considerando os animais não infartados e submetidos à injeção de salina. De fato, apesar de pouco mencionado na literatura, a mortalidade durante o procedimento de implante celular não difere do seu controle

placebo (Jain *et al.*, 2001; Min *et al.*, 2003), mostrando ser procedimento relativamente seguro na experimentação animal.

No período de seguimento das seis semanas ao IM, também não encontramos diferença significativa entre os grupos, provavelmente porque a sobrevida nos primeiros meses seguintes à oclusão coronariana, de 0% nos infartos moderados e 7% nos infartos grandes, não foi diferente dos ratos não infartados. Vale mencionar que, apesar de originados de uma linhagem distinta e mais resistente à oclusão coronariana (Liu *et al.*, 1997), os presentes dados contrariam um estudo prévio de nosso laboratório, em que Nozawa *et al.* (2006) observaram mortalidade próxima a 40% ao fim de cinco semanas após IM em ratas Wistar fêmeas. Ademais, alguns autores utilizando ratos machos (Miyahara *et al.*, 2006) e outros utilizando ratas fêmeas espontaneamente hipertensas (de Macedo Braga *et al.*, 2008a; de Macedo Braga *et al.*, 2008b), também descreveram elevada mortalidade de 40 a 65% já nos primeiros dois meses pós-IM e até evidenciaram benefício da terapia celular na sobrevida dos animais neste breve período. Entretanto, a maioria absoluta dos estudos demonstra que a mortalidade dos ratos com infarto somente torna-se maior que a dos não infartados, do ponto de vista estatístico, a partir do quarto ou sexto mês após IM (Pfeffer *et al.*, 1987; Liu *et al.*, 1997; Jain *et al.*, 2001; Min *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004; Ahmet *et al.*, 2008). Dessa forma, estudos envolvendo implante celular ou outras terapias sobre a mortalidade corroboram a idéia de que nenhum benefício pode ser detectado nos períodos precoces (Pfeffer *et al.*, 1987; Jain *et al.*, 2001; Min *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2004; Ahmet *et al.*, 2008; Frantz *et al.*, 2008). Conseqüentemente, acreditamos que somente o acompanhamento dos nossos animais por períodos bem mais prolongados poderia identificar algum impacto das BMC sobre a sobrevida após o infarto em ratos.

Quanto às mortes ocorridas durante a segunda anestesia, para realização do ECO pós-terapia e do procedimento cirúrgico para o estudo hemodinâmico, não notamos diferenças entre os grupos estudados, provavelmente porque foram raros os casos de óbito. As mortes poderiam ser esperadas, de forma mais freqüente, nos animais com grandes infartos. Todavia, não temos informações que permitem justificar porque apenas 12% (1 de 8 animais) e 21% (3 de 14) nos grupos mIM e IM respectivamente morreram, comparados aos 12% (2 de 16) de morte do grupo SHAM. Por conseguinte, os 12% (1 de 8) e 8% (1 de 13) de morte em mIM+BMC e IM+BMC não foram estatisticamente diferentes dos seus grupos não tratados.

### **5.3.3. Tamanho do infarto do miocárdio**

O exame ecocardiográfico após seis semanas de acompanhamento evidenciou que o tamanho do infarto, relativo ao perímetro do VE, não modificou nos animais infartados não-tratados. A literatura é conflitante no que diz respeito à evolução temporal do infarto. Em um dos trabalhos pioneiros, que analisou ratos sacrificados em diferentes dias seguintes à oclusão coronariana, (Fishbein *et al.*, 1978) descreveram que tanto o volume, quanto a área do infarto, em relação ao VE, são progressivamente menores com o decorrer de 21 dias. Em contrapartida, um grupo de pesquisadores tem descrito significativo aumento do tamanho do IM, iniciando de forma discreta na segunda semana e intensificando nos meses seguintes (Ahmet *et al.*, 2008). Finalmente, parece que a maior parte dos trabalhos da literatura corrobora nossos resultados, demonstrando que o tamanho do infarto, representado em relação ao VE, não difere entre os primeiros dias e após um mês da oclusão coronariana, tanto por avaliações de ratos sacrificados em tempos sucessivos (Pfeffer *et al.*, 1991; Xu *et al.*, 2005; Payne *et al.*, 2007; dos Santos, 2008) quanto pela estimativa ecocardiográfica em avaliações seriadas (Oliveira, 2007).

Todavia, a terapia com BMC reduziu a extensão do infarto, relativa ao perímetro do VE, tanto em comparação à avaliação de base, quanto em comparação aos animais não tratados. Menor tamanho do infarto após terapia celular já foi reportado em diversos trabalhos experimentais em ratos e camundongos infartados, envolvendo uso de células mononucleares (Hiasa *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004a; Burchfield *et al.*, 2008; de Macedo Braga *et al.*, 2008b; Mazo *et al.*, 2008) e mesenquimais de MO (Nagaya *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2007; Iso *et al.*, 2007; de Macedo Braga *et al.*, 2008a; Liu *et al.*, 2008), assim como de outras fontes (Min *et al.*, 2002; Yamada *et al.*, 2006; Ebelt *et al.*, 2007; Mazo *et al.*, 2008). Apesar disso, existem alguns resultados divergentes. Mesmo que a maioria apresente menor infarto após a terapia, propondo que a regeneração tecidual faça parte do seu mecanismo, alguns autores não encontraram diferença entre a extensão do IM nos grupos tratados, mesmo na presença de benefício sobre a função cardíaca (Limbourg *et al.*, 2005; Piao *et al.*, 2005; Berry *et al.*, 2006; Uemura *et al.*, 2006; Boomsma *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2007; Frantz *et al.*, 2008).

A análise em separado, da evolução dos comprimentos da porção infartada e da porção não infartada do VE em seu plano transversal, possibilitou interpretação ainda não considerada. Nos animais não tratados, o comprimento médio da porção remanescente ao IM aumentou com o decorrer das seis semanas seguintes à avaliação controle. Paralelamente, houve aumento significativo e em proporções equivalentes no comprimento da porção infartada. Dessa forma, entende-se porque o tamanho do IM, em relação ao VE, não se modificou durante o seguimento. Contrariamente, nos animais que receberam terapia com BMC, o aumento no comprimento da porção não infartada do VE não foi acompanhado de modificações na extensão média da porção infartada. Em consequência, o tamanho do IM, em relação ao VE, foi identificado como reduzido após seis semanas de terapia.

O aumento da porção infartada nos animais sem terapia deve ter ocorrido principalmente nos primeiros dias, e pode ser entendido pelo conceito de expansão do infarto ou *infarct expansion* (Hutchins & Bulkley, 1978). Após o infarto, ocorrem estiramento e aumento da região infartada, não mais por necrose adicional, mas sim, por apoptose, rearranjo e deslizamento do tecido necrótico friável, que se iniciam agudamente e podem persistir até a completa resolução da cicatrização (Weisman & Healy, 1987; Olivetti *et al.*, 1990; Swynghedauw, 1999; Opie *et al.*, 2006). Este processo é parte integrante do remodelamento agudo no pós-infarto (Swynghedauw, 1999; Opie *et al.*, 2006) e está intimamente relacionado à formação de aneurismas e rupturas ventriculares (Weisman & Healy, 1987). Dessa forma, os resultados sugerem que a terapia celular evitou o aumento da zona infartada, não por reduzir necrose miocárdica, mas provavelmente por deixar essas regiões resistentes ao estresse imposto, evitando seu estiramento. De fato, a terapia celular poderia amenizar a expansão do infarto, tal como propõe Novotny *et al.* (2008) em recente revisão, devido à: redução da apoptose e do processo inflamatório, melhora da perfusão nas áreas de maior tensão e regulação da deposição da matriz extracelular nas zona infartada e de transição.

Concomitante ao aumento na extensão do infarto, normalmente evidencia-se afinamento progressivo da porção infartada do VE, o que reforça a idéia de seu estiramento persistente (Fishbein *et al.*, 1978). Ao avaliarmos a espessura média da cicatriz do IM, notou-se que os animais tratados tiveram cicatrizes significativamente mais espessas que os não tratados, reforçando a sugestão de que o implante de BMC influencie positivamente sobre o remodelamento do miocárdio infartado.

Nossos resultados corroboram trabalhos da literatura, os quais evidenciaram que, até nos casos onde o tamanho do IM não modificou com a terapia celular, houve prevenção importante do adelgaçamento da cicatriz miocárdica (Tomita *et al.*, 1999; Piao *et al.*, 2005; Berry *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2006; Uemura *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2007).

Com o implante das BMC, a restrição na expansão do IM, e conseqüente redução da cicatriz do infarto em relação ao tamanho do VE, certamente repercutiram positivamente sobre a função cardíaca global. Assim como há melhora na função cardíaca após terapias capazes de reduzir o IM em ratos (Jin *et al.*, 2002; Ahmet *et al.*, 2008), poderíamos creditar boa parte dos benefícios identificados simplesmente a este singular efeito da terapia celular.

#### **5.3.4. Morfologia cardíaca**

As alterações morfológicas típicas do remodelamento cardíaco pós-IM foram avaliadas por meio de diversas metodologias.

A massa cardíaca foi elevada de forma proporcional ao tamanho do IM nos grupos não tratados, assim como as massas do VE e do VD. Esses resultados sugerem que o processo hipertrófico nas câmaras cardíacas, decorrente da sobrecarga de trabalho, já promoveu modificações significantes. A massa do VE indexada pela massa corpórea dos grupos mIM e IM foi 20% e 30% maior que a do grupo SHAM, respectivamente, de forma semelhante às informações já divulgadas por nosso laboratório e por outros autores que descreveram aumento na massa cardíaca depois de seis semanas de IM, principalmente nos animais portadores de grandes infartos (Pfeffer *et al.*, 1991; Anand *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1997; Wagner *et al.*, 1997; Yoshiyama *et al.*, 1997; Gosselin *et al.*, 1998; Wasserstrom *et al.*, 2000; Jain *et al.*, 2001; Min *et al.*, 2001; Zimmerman *et al.*, 2001; Min *et al.*, 2002; Sjaastad *et al.*, 2005). Contudo, nos animais submetidos ao implante celular, a massa do VE não foi diferente do grupo SHAM, indicando que a terapia foi capaz de promover redução no tamanho IM associada à atenuação significativa do aumento da massa ventricular, assim como descreveram outros autores utilizando BMC (Zhang *et al.*, 2004a; Limbourg *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2005; Frantz *et al.*, 2008) e outros tipos celulares (Min *et al.*, 2002; Ebel *et al.*, 2007).

A massa do VD, tanto na forma absoluta quanto indexada, só foi significativamente elevada no grupo IM, enquanto os IM+BMC foram semelhantes

aos SHAM. Como já esperado para esse período de seguimento, somente identificam-se sinais de sobrecarga e hipertrofia ventricular direita nos ratos com IM extensos (Anversa *et al.*, 1984; Pfeffer *et al.*, 1991; Litwin *et al.*, 1994; Nahrendorf *et al.*, 2003). A hipertrofia do VD na história natural do IM é resultado da sobrecarga produzida pela hipertensão pulmonar crônica causada pelo aumento da pressão diastólica final do VE. Dessa maneira, nossos dados sugerem que terapia celular foi capaz de abrandar o aparecimento da hipertrofia do VD, provavelmente por melhorar a função do VE infartado.

A segunda metodologia que avaliou a influência das BMC sobre as repercussões morfológicas pós-IM foi o exame ecocardiográfico. As dimensões cardíacas foram analisadas imediatamente antes e seis semanas depois do implante da BMC. Foi possível notar que houve aumento expressivo nas dimensões ventriculares após seis semanas do IM, como já classicamente descrito na literatura (Litwin *et al.*, 1994; Litwin *et al.*, 1999; Moisés *et al.*, 2000; Sjaastad *et al.*, 2005; Burstein *et al.*, 2007; Ahmet *et al.*, 2008). Quando essas alterações foram avaliadas como percentual de dilatação ventricular, dado pelo aumento na AdVE em relação à avaliação prévia, evidenciamos que a intensa dilatação ocorrida no grupo IM (aproximadamente 85%) foi parcialmente prevenida no grupo IM+BMC (50% de aumento). Porém, não identificamos atenuação deste processo quando comparamos mIM e mIM+BMC, com ambos os grupos apresentando aumento em torno de 45% na AdVE. Esse efeito da terapia celular sobre o processo de dilatação ventricular no pós-IM não são inéditos e assemelham-se aos vários resultados já divulgados para pequenos roedores (Tang *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004a; Dai *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2005; Agbulut *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2007; Iso *et al.*, 2007; Burchfield *et al.*, 2008; de Macedo Braga *et al.*, 2008a; de Macedo Braga *et al.*, 2008b; Frantz *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008).

Ademais, quando associados aos resultados referentes ao comprimento da porção miocárdica remanescente, discutidos na sessão anterior, podemos especular que embora os corações tratados com BMC também aumentem sua dimensão, a ausência de expansão do infarto e menor sobrecarga resultante sobre o miocárdio remanescente podem ter contribuído para prevenção de maiores acréscimos nas dimensões ventriculares.

### 5.3.5. Função cardíaca global

Após seis semanas de acompanhamento foram evidenciados sinais de disfunção sistólica e diastólica em intensidade proporcional ao tamanho do infarto, porém a terapia celular foi capaz de amenizar essas alterações. Nossa análise da função cardíaca global foi composta pelo exame ecocardiográfico Doppler e pelo exame hemodinâmico.

Avaliando especificamente a função sistólica, notamos que a FEAT deprimida, que refletia disfunção no esvaziamento ventricular já nas primeiras 48 horas seguintes a oclusão coronariana, persistiu até a sexta semana nos grupos não tratados, enquanto o grupo IM+BMC cursou com recuperação de cerca de 20%, aproximando seus valores dos grupos mIM e mIM+BMC. Esse efeito benéfico da terapia com BMC em restabelecer parcialmente a função sistólica pós-IM em ratos e camundongos avaliados ao ECO parece consenso na maioria dos estudos (Nagaya *et al.*, 2004; Olivares *et al.*, 2004; Dai *et al.*, 2005; Limbourg *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2005; Agbulut *et al.*, 2006; Berry *et al.*, 2006; Templin *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2007; Hou *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2007; Iso *et al.*, 2007; Frantz *et al.*, 2008). Alguns autores apresentam, até mesmo, total normalização dos índices ecocardiográficos de função sistólica (Zhang *et al.*, 2004a; Li *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008) e alguns poucos estudos descrevem fracasso terapêutico (Kolossoff *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007; Mazo *et al.*, 2008). Semelhante aos estudos clínicos, essa divergência dos resultados divulgados é conseqüência, provavelmente, da população celular usada, da via de administração e do momento de instalação da terapia durante o processo de remodelamento e disfunção cardíacos (Murry *et al.*, 2006; Rosenzweig, 2006).

Nas avaliações hemodinâmicas com os animais anestesiados e sob condições basais, a depressão da  $+dP/dt_{\max}$  identificada no grupo IM foi prevenida no grupo IM+BMC, corroborando os dados ecocardiográficos de função sistólica e dados hemodinâmicos divulgados por outros autores que também utilizaram a mesma terapia (Kamihata *et al.*, 2001; Nagaya *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2005; Berry *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2006; Boomsma *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2007).

Quanto à função diastólica, pareceu-nos evidente que principalmente os animais com grandes infartos apresentaram sinais de disfunção, representados por elevação da razão E/A e da PDfVE. Os dados ecocardiográficos de aumento da onda E, redução da onda A e aumento da razão E/A indicam dificuldade de esvaziamento do átrio esquerdo no grupo IM. Todavia, os animais tratados não

foram diferentes dos SHAM. Os dados da literatura sugerem que, nesse período, essas alterações patológicas estejam mais presentes nos corações com grandes infartos (Baily *et al.*, 1993; Litwin *et al.*, 1994; Moisés *et al.*, 2000; Kanashiro *et al.*, 2006; Nozawa *et al.*, 2006; Miranda *et al.*, 2007), o que, provavelmente, justifica os efeitos das BMC sobre a disfunção diastólica, visto que o tamanho do infarto, em relação ao VE, foi significativamente reduzido. Enquanto o grupo IM cursou com redução em cerca de 26% na onda A e elevação de 93% na relação E/A, no grupo IM+BMC a velocidade da onda A aumentou 40% e a relação E/A reduziu 10% em relação à primeira avaliação.

Ademais, houve redução significativa na incidência de hipertensão pulmonar e menor teor de água no pulmão dos animais com BMC. Como a hipertensão e congestão pulmonares presentes na IC são conseqüência da disfunção do VE (Litwin *et al.*, 1994; Francis *et al.*, 2001; Saito *et al.*, 2002), quando nossos dados são analisados em conjunto, percebe-se que houve disfunção sistólica e diastólica do VE principalmente no grupo IM, com alta incidência de hipertensão e congestão pulmonar e conseqüentemente hipertrofia do VD. Em contrapartida, a melhora da função do VE no grupo IM+BMC levou à atenuação dessas repercussões sobre os pulmões e o VD.

A avaliação hemodinâmica sob condições basais mostrou elevação significativa na PDfVE no grupo IM, sugerindo volume residual elevado por dificuldade no esvaziamento do VE, enquanto valores semelhantes aos do grupo SHAM foram obtidos em todos os animais tratados com BMC.

Em resumo, podemos afirmar que a dilatação e disfunção ventriculares são amenizadas com a redução do tamanho do IM promovida pela terapia celular, ratificando a idéia inicialmente proposta por diversos autores (Tomita *et al.*, 1999; Orlic *et al.*, 2001a; Roell *et al.*, 2002) de que o meio pelo qual as células precursoras exerceriam seu benefício seria restringir a extensão da lesão miocárdica. E apenas pelos dados discutidos até o momento, realmente seria crível que esses efeitos positivos sobre a morfologia e função cardíaca fossem atribuídos, basicamente, à redução na participação do infarto sobre o VE, visto que os IM+BMC apresentaram características muito semelhantes aos animais mIM, os quais não se diferenciaram muito dos SHAM ou dos mIM+BMC.

Todavia, a aparente normalidade nos parâmetros hemodinâmicos dos animais com infartos de tamanhos moderados pode não refletir desempenho



ventricular totalmente preservado. Curiosamente, até mesmo os ratos com grandes infartos apresentaram ejeção ventricular, avaliada pelo débito cardíaco e volume ejetado, e capacidade de geração de trabalho cardíaco normais em relação ao grupo SHAM, apesar dos sinais de IC identificados. Apesar disso, esses corações podem cursar com moderado ou alto grau de disfunção quando submetidos a sobrecargas hemodinâmicas (Hood *et al.*, 1969; Pfeffer *et al.*, 1979; Fletcher *et al.*, 1982; Leite-Moreira *et al.*, 1999; dos Santos *et al.*, 2006).

Na terapia celular em seu *lato sensu*, Jain *et al.* (2001) usando mioblastos esqueléticos em ratos infartados e de Macedo Braga *et al.* (2008a e 2008b), com células de medula em ratos hipertensos infartados, descreveram melhora na capacidade funcional avaliada sob estresse do exercício de corrida em esteira. Especificamente com uso de células de MO em animais normotensos infartados, Berry *et al.* (2006) e Boomsma *et al.* (2007) descreveram melhora da geração de trabalho sensível à sobrecarga de volume em corações submetidos ao implante de células mesenquimais derivadas de MO. Com exceção dos autores citados, não encontramos mais estudos que avaliaram a performance ventricular frente a testes de sobrecarga hemodinâmica.

O aumento súbito da pós-carga, utilizado por nós como método de estresse hemodinâmico, apresenta singular importância. Em corações saudáveis, a resistência elevada ao esvaziamento ventricular inicia respostas cardíacas que, em última instância, levam ao aumento da capacidade de gerar pressão e conseqüente manutenção da ejeção cardíaca, pelo menos até certos níveis de sobrecarga (Leite-Moreira *et al.*, 1999; dos Santos *et al.*, 2006). De fato, nos ratos saudáveis, o aumento súbito da pós-carga resultou em elevação da  $+dP/dt_{máx}$  e geração de trabalho sistólico e, conseqüentemente, apenas queda discreta na ejeção ventricular. Não obstante, os grupos mIM e IM cursaram com reduzido recrutamento inotrópico, aumento na PDfVE, e queda expressiva no trabalho e ejeção cardíacos. E de forma surpreendente, a resposta exibida por todos os animais submetidos à terapia com BMC foi equivalente àquela do SHAM e significativamente melhor que os não tratados. Esses resultados são admiráveis visto que todos os animais tratados apresentaram resposta eficiente, mesmo que ainda fossem portadores de tamanhos consideráveis de infarto, comparáveis ou até maiores que os do grupo mIM, o qual cursou com queda no desempenho frente à sobrecarga.

A partir desses dados, a dissociação entre o tamanho do infarto e o desempenho ventricular sugeriu-nos que os benefícios proporcionados pela terapia celular não estariam relacionados exclusivamente à redução do infarto, e que, provavelmente, envolveria outros mecanismos de ação sobre a função cardíaca. Tal como afirma Fletcher *et al.* (1981), o prejuízo no desempenho ventricular realmente está relacionado não só ao tamanho do IM, mas também à intensidade do remodelamento ocorrido e conseqüente repercussão sobre a habilidade de gerar força e pressão pela câmara cardíaca.

Podemos assumir que a resposta cardíaca ao aumento súbito da pós-carga é basicamente dependente: 1) do inotropismo miocárdico; 2) da resposta ao estiramento miocárdico, refletindo o mecanismo de Frank-Starling; e 3) do tamanho da cavidade (Bugge-Asperheim & Kiil, 1969; MacGregor *et al.*, 1974; Leite-Moreira *et al.*, 1999). Quando esse conjunto de fatores não está adequadamente íntegro, caracteriza-se o chamado desajuste da pós-carga ou *afterload mismatch* (Ross, 1976).

Considera-se a dilatação ventricular como um fator importante nas implicações funcionais decorrentes do infarto do miocárdio (Pfeffer & Braunwald, 1990; Pfeffer *et al.*, 1991; dos Santos & Tucci, 2007), pois as relações entre a força desenvolvida pelo miocárdio e a pressão gerada no interior da cavidade são definidas pela lei de Laplace: a força miocárdica é diretamente proporcional à pressão intracavitária e ao raio da cavidade, e inversamente proporcional à espessura da parede. Dessa forma, a dilatação implica em maior esforço miocárdico e menor eficiência da bomba. Como a terapia celular tem sido descrita como capaz de reduzir a dilatação da cavidade ventricular, a preservação do desempenho cardíaco frente ao estresse da pós-carga seria sustentado, pelo menos em parte, por este benefício.

Todavia, como a disfunção ventricular do remodelamento também é resultado de modificações no tecido remanescente (Swynghedauw, 1999; dos Santos & Tucci, 2007), é muito provável que a melhora no desempenho ventricular promovida pela BMC seja decorrente de sua influência sobre o miocárdio remoto ao IM, fato pouco explorado na literatura.

## 5.4. Avaliação terapêutica sobre o miocárdio remoto ao IM

### 5.4.1. Mecânica contrátil

Investigamos a contratilidade do miocárdio remanescente ao IM, na suspeita de que sua preservação também teria exercido papel importante na influência da terapia celular sobre o desempenho cardíaco. O estudo *in vitro* da função miocárdica pode ser feita por meio de várias metodologias com suas particulares vantagens e desvantagens. Nos estudos envolvendo infarto, preparações multicelulares do miocárdio, como a do músculo papilar isolado, isentam as interpretações de influências da geometria ventricular e do tecido infartado, mantendo exclusivamente as propriedades mecânicas do miocárdio remanescente.

Nossos dados relativos à função mecânica dos músculos papilares estão em concordância com a literatura especializada (Litwin *et al.*, 1991; Litwin & Morgan, 1992; Wagner *et al.*, 1997; Min *et al.*, 2001) ao indicarem prejuízo na contração e no relaxamento após seis semanas de infarto. A intensidade das alterações na contratilidade do miocárdio também foi relacionada ao tamanho do infarto, com o grupo IM apresentando piores parâmetros que mIM. Entretanto, os papilares obtidos dos dois grupos tratados com BMC tiveram contratilidade totalmente preservada, independente da permanência de infartos nesses corações.

Na análise da resposta contrátil dos músculos papilares ao estiramento, as retas formadas permitiram avaliar a integridade da relação de Frank-Starling. Embora existam referências de depressão no mecanismo de Frank-Starling no coração pós-IM no homem (Kitzman *et al.*, 1991; Schwinger *et al.*, 1994) e no cão (Komamura *et al.*, 1993; Gill *et al.*, 2006), e alguma dúvida para o coração de rato avaliado sob contração isovolumétrica (Mill *et al.*, 1990; Mill *et al.*, 1991; Stefanon *et al.*, 1994), não há registros da resposta ao estiramento pelo miocárdio analisado isoladamente. No presente estudo, os papilares dos animais infartados tiveram resposta contrátil ao estiramento deprimida, sugerindo prejuízo ou exaustão no mecanismo de Frank-Starling no miocárdio remodelado pós-IM, mesmo no grupo mIM. A resposta contrátil ao estiramento é geralmente descrita como relacionada ao aumento no número e melhor disposição das pontes cruzadas entre os miofilamentos contráteis (Yagi *et al.*, 2004), aumento na sensibilidade dos miofilamentos ao  $Ca^{2+}$  e diminuição do espaçamento entre os miofilamentos no *lattice spacing* (Allen & Kentish, 1985; Irving *et al.*, 2000), e que também seja

modulada pela titina (Fukuda *et al.*, 2001). Ademais, a tensão de repouso (TR) dos músculos papilares do grupo IM cursou com maior elevação frente ao estiramento do que os demais grupos. No coração normal, o comportamento da TR durante estiramento em níveis fisiológicos está relacionado principalmente às propriedades biofísicas da proteína titina, enquanto no miocárdio remodelado, está relacionado às propriedades estruturais e físicas do tecido conectivo, basicamente o colágeno (Heerkens *et al.*, 1987; Wu *et al.*, 2000). Por isso, as propriedades diastólicas frente ao estiramento podem refletir a rigidez do miocárdio estudado. De forma surpreendente, os músculos dos dois grupos submetidos à terapia com BMC apresentaram os parâmetros sistólicos e diastólicos totalmente preservados na análise das curvas de estiramento-tensão. Estes dados ajudaram a entender porque os animais tratados responderam de forma eficiente ao estresse hemodinâmico imposto, mesmo que ainda possuísem tamanhos consideráveis de IM, visto que, a capacidade contrátil e mecanismo de Frank-Starling do miocárdio remanescente estão preservados após terapia celular. Também se assemelham aos únicos trabalhos que, utilizando terapia celular no IM experimental, descreveram melhora na resposta do coração infartado ao estiramento, tanto avaliada *in vivo* (Berry *et al.*, 2006) quanto *in vitro* (Jain *et al.*, 2001).

Outro protocolo utilizado neste trabalho foi o estudo da contração após pausa de estímulos elétricos, manobra experimental que permite avaliar, indiretamente, o equilíbrio entre o papel captador, armazenador e liberador de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático (RS) e a extrusão de  $\text{Ca}^{2+}$  da célula através do sarcolema (Mill *et al.*, 1992; Bers, 2002). É descrito que a pausa de estímulos provoca potenciação da próxima contração em consequência: 1) do acúmulo de  $\text{Ca}^{2+}$  no RS durante a pausa; 2) do aumento na liberação fracional deste íon pelo RS; e 3) da reduzida participação, especialmente no rato, do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  em retirar o  $\text{Ca}^{2+}$  através do sarcolema (Abreu *et al.*, 1987; Mill *et al.*, 1992; Bers, 2002). No estudo da contração pós-pausa no infarto do miocárdio, os trabalhos são raros, mas ao que parece, são consensuais. Tanto Novaes *et al.* (1996) quanto Wagner *et al.* (1997) constataram potenciação deprimida seguinte à pausa de estímulos em músculos papilares de ratos infartados em relação a ratos controles, ou mesmo ausência de qualquer potenciação em infartos mais extensos. Tais características foram também evidenciadas em nossos estudos, mostrando diminuição da potenciação pós-pausa em todos os animais infartados sem terapia, mais acentuada em IM do que mIM.

Porém, nos grupos BMC, este prejuízo foi parcialmente prevenido, com o comportamento da potenciação em função da duração da pausa não sendo diferente do SHAM, pelo menos do ponto de vista estatístico. Este resultado sugere, indiretamente, que a terapia celular também foi capaz de interferir, independente da extensão do infarto, no prejuízo do acoplamento excitação-contração relacionado ao remodelamento miocárdico.

Finalmente, avaliamos a resposta contrátil ao aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  na solução nutritora, e à adição do agonista beta-adrenérgico isoproterenol. Como já descrito (Mill *et al.*, 1991; Cheung *et al.*, 1994; Stefanon *et al.*, 1994; Qi & Rouleau, 1996; Li *et al.*, 1997; Holt *et al.*, 1998; Gupta *et al.*, 2000; Wisløff *et al.*, 2002; Sjaastad *et al.*, 2005; Pinto *et al.*, 2007), as respostas foram consideravelmente deprimidas nos grupos infartados sem terapia, com maior prejuízo no grupo IM do que mM.

Enquanto o aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  induziu menor elevação dos parâmetros sistólicos e diastólicos do grupo IM em relação ao SHAM, houve efeito inotrópico positivo nos grupos tratados com BMC, em níveis equivalentes ao SHAM. Um fato interessante foi que este aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  na solução nutritora de 1,5 para 2,5 mM foi capaz de elevar significativamente a TR nos papilares de animais com grandes IM, refletindo o comprometimento da cinética do  $\text{Ca}^{2+}$  e a já descrita sobrecarga diastólica deste íon pela dificuldade de sua recaptção para os estoques intracelulares (Cheung *et al.*, 1994; Gupta *et al.*, 2000; Wisløff *et al.*, 2002). Ademais, não foi verificado aumento significante da TR no grupo IM+BMC.

No protocolo seguinte, a adição de isoproterenol para concentração final de 5  $\mu\text{M}$  seguiu-se de aumento importante na TD,  $+dT/dt_{\text{máx}}$  e  $-dT/dt_{\text{máx}}$ , associado à redução nos parâmetros temporais de contração e relaxamento. Tanto o aumento na geração de força, quanto a aceleração da contração e relaxamento com o estímulo beta-adrenérgico é consequência do aumento do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo sarcolema e sua mais eficiente recaptção pelo RS (Opie & Paterson, 2004). Embora seja proposto que, em preparações de miocárdio isolado de ratos, o efeito inotrópico positivo do isoproterenol seja muito discreto em concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  acima de 1,25 devido à saturação dos estoques intracelulares nessas condições (Vassallo *et al.*, 1994), foi curioso que tenhamos encontrado tão evidente estímulo. Infelizmente não temos informações que justifiquem este acontecido. Ademais, como já apresentado por alguns autores (Litwin & Morgan, 1992; Qi & Rouleau,

1996; Pinto *et al.*, 2007), houve depressão da resposta beta-adrenérgica em nossos músculos papilares de animais infartados não tratados. A depressão na resposta inotrópica ao estímulo beta-adrenérgico na IC é geralmente creditada à expressão diminuída de adrenoceptores e dos componentes da via de sinalização (Sanbe & Takeo, 1995; Sethi *et al.*, 2006). Por outro lado, os animais tratados com BMC responderam de forma equivalente aos SHAM, com aumento na TD e aceleração tanto da contração quanto do relaxamento, em níveis significativamente superiores mesmo àqueles apresentados pelo grupo mIM, novamente reforçando a independência do tamanho do infarto nos efeitos benéficos identificados com a BMC. Dentre os inúmeros estudos experimentais que utilizaram a terapia celular no pós-IM, somente um único trabalho com células embrionárias, e nenhum utilizando BMC, investigou a contratilidade do miocárdio remoto ao infarto. Min *et al.* (2002) avaliou ratos submetidos à injeção intramiocárdica de células embrionárias após 30 minutos de oclusão coronariana, e descreveu que a contratilidade dos músculos papilares dos animais tratados apresentava-se preservada, assim como a resposta inotrópica ao  $Ca^{2+}$  e ao isoproterenol. Nesta ocasião, ao identificarem as células somente no local de injeção e não nos músculos estudados, propuseram que essas células seriam capazes de liberar fatores de crescimento que agiriam benéficamente sobre o miocárdio distante. Idéia que, diante dos nossos resultados, poderia ser ampliada também ao uso de BMC. Além do estudo mencionado, Roell *et al.* (2002), utilizando tiras musculares retiradas das áreas infartadas submetidas ao implante de células-tronco embrionárias, descreveram efeitos benéficos sobre a contratilidade miocárdica avaliada *in vitro*, mas sem nenhuma menção sobre o miocárdio remoto. Dessa maneira, o nosso estudo parece ser o primeiro que, utilizando terapia com BMC, demonstra melhora significativa da contratilidade do miocárdio remoto ao infarto e à zona de implante celular, e de forma independente da redução do tamanho do infarto.

#### **5.4.2. Proteínas relacionadas à cinética do cálcio e contração miocárdica**

No cardiomiócito, o  $Ca^{2+}$  participa ativamente de diversas funções intracelulares, dentre elas, o acoplamento entre a excitação e a contração. Nesse sentido, alterações na concentração intracelular e no manejo deste íon nos diversos compartimentos celulares condicionam, significativamente, a disfunção resultante do remodelamento pós-IM (Mittmann *et al.*, 1998; Sjaastad *et al.*, 2005; Bers, 2006).

Com o potencial de ação, a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  pelos canais voltagem-dependentes estimula a liberação de consideráveis quantidades deste íon a partir dos estoques do RS para ser utilizado na contração. E no relaxamento, o  $\text{Ca}^{2+}$  é basicamente recaptado para o RS ou transportado para o meio extracelular. Dentre os passos principais da cinética intracelular do  $\text{Ca}^{2+}$  para a contração, escolhemos dois potencialmente implicados nas disfunções identificadas: a função recaptadora do RS e o mecanismo de extrusão do  $\text{Ca}^{2+}$  através do sarcolema, durante a diástole. Apesar disso, não se deve ignorar que existam alterações, não menos importantes, nas diversas estruturas responsáveis pela entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  durante o potencial de ação e pela liberação deste íon pelo RS (Mittmann *et al.*, 1998; Swynghedauw, 1999).

Na diástole, a retirada do  $\text{Ca}^{2+}$  para o exterior do cardiomiócito é feita pela  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do sarcolema e pelo trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX). Poucos estudos têm investigado a atividade ou expressão da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase sarcolemal durante o remodelamento miocárdico, mas acredita-se que sua função está inalterada a despeito de todas as modificações fenotípicas presentes no cardiomiócito de ratos (Dixon *et al.*, 1992). Já em relação ao NCX, tem sido consenso que sua densidade molecular e atividade estão aumentadas durante quase todo o processo de remodelamento e sensivelmente super-expresso nos estágios avançados de IC tanto experimental (Litwin & Bridge, 1997; Yoshiyama *et al.*, 1997; Gupta *et al.*, 2000; Wasserstrom *et al.*, 2000; Gomez *et al.*, 2002) quanto em humanos (Lehnart *et al.*, 1998; Alpert *et al.*, 2000). Desta forma, nossos resultados são concordantes ao descrevermos aumento significativo na expressão protéica do NCX no miocárdio de animais do grupo IM, justamente aqueles que apresentam sinais mais evidentes de insuficiência ventricular e disfunção miocárdica. Esta alteração pode contribuir com a diminuição da força gerada, explicando principalmente a depressão da potenciação pós-pausa, devido à maior retirada do  $\text{Ca}^{2+}$  do mioplasma, que seria recaptado pelo RS e utilizado na contração (Bassani & Bers, 1994; Litwin & Bridge, 1997). No miocárdio dos animais infartados e tratados com BMC, a preservação dos níveis protéicos do NCX sugere que a terapia celular também exerceu benefícios sobre o remodelamento molecular após IM.

A  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (NKA), expressão bioquímica da bomba de sódio do sarcolema, exerce um papel indiscutível na manutenção do potencial de repouso celular e é capaz de influenciar, indiretamente, na contração e relaxamento do

miócito (Blaustein *et al.*, 1998; Ziegelhöffner *et al.*, 2000). A análise da expressão protéica da isoforma 1 da subunidade  $\alpha$  da NKA não foi diferente entre os nossos grupos, mas notamos redução significativa do conteúdo da isoforma  $\alpha_2$  em ambos os grupos infartados sem terapia, independente do tamanho do IM. É bem aceito que a inibição da NKA no coração, por digitálicos exógenos ou ligantes endógenos, cursa com aumento na contração devido às modificações na atividade do NCX frente ao acúmulo intracelular de  $\text{Na}^+$  (Blaustein *et al.*, 1998). A redução na expressão da  $\alpha_2$ -NKA encontrada em nossas amostras apresenta especial importância, visto que essa isoforma é preferencialmente relacionada ao aumento no  $\text{Ca}^{2+}$  no mioplasma por sua interação funcional com o NCX (Swift *et al.*, 2008). Embora as alterações na NKA identificadas no presente trabalho contribuam, em parte, para a depressão contrátil do miocárdio remanescente ao IM, como descrito em outros estudos (Dixon *et al.*, 1992; Semb *et al.*, 1998; Swift *et al.*, 2008), nossos resultados sugerem que a terapia celular não foi capaz de prevenir significativamente a redução no conteúdo protéico da isoforma  $\alpha_2$  da NKA.

A recaptação do  $\text{Ca}^{2+}$  para o RS durante a diástole é feita pela  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo (SERCA2) e modulada negativamente pelo fosfolamban (PLB), quando em seu estado desfosforilado. No presente trabalho, encontramos níveis protéicos reduzidos de SERCA2 e PLB no miocárdio remoto ao infarto após seis semanas de oclusão, principalmente nas amostras de animais do grupo IM. Estes resultados corroboram a idéia de que há depressão da quantidade tanto de RNAm (Yoshiyama *et al.*, 1997; Gupta *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2005) quanto de proteína da SERCA2 (Zhang *et al.*, 1999; Sande *et al.*, 2002; Wisløff *et al.*, 2002; Sallinen *et al.*, 2007) no remodelamento miocárdico em ratos, assim como diminuição na expressão gênica e protéica do PLB (Shao *et al.*, 1999; Shao *et al.*, 2005). Entretanto, a redução na quantidade do PLB, em teoria, não seria deletéria, visto que é uma proteína inibidora da recaptação de  $\text{Ca}^{2+}$  pela SERCA2. Nesse sentido, foi esclarecedor quando identificamos que o conteúdo da forma fosforilada PLB-Ser<sup>16</sup> estava sensivelmente reduzido nas amostras de ratos infartados. De fato, uma explicação proposta é que alterações no equilíbrio da relação entre a relação SERCA2 e PLB, assim com nos mecanismos de fosforilação do PLB no resíduo da serina-16, possam ser responsáveis pela recaptação deficiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Huang *et al.*, 1999; Schmidt *et al.*, 1999; Schwinger *et al.*, 1999; Sande *et al.*, 2002). De forma interessante, os níveis protéicos tanto da SERCA2, quanto do PLB e PLB-Ser<sup>16</sup>



estavam significativamente preservados no miocárdio dos animais infartados e tratados com BMC. Logicamente, o mecanismo pelo qual se justifica a preservação na contratilidade do miocárdio remoto ao infarto após a terapia celular deve ser a manutenção da quantidade de SERCA2 e principalmente do PLB-Ser<sup>16</sup>, associada à prevenção da super-expressão do NCX. Como a redução da atividade do NCX e aumento na atividade da SERCA2 contribuem para maior capacidade de armazenamento de Ca<sup>2+</sup> pelo RS, parece-nos evidente o motivo de observarmos melhores respostas frente à pausa de estímulos nos músculos papilares dos grupos tratados com BMC.

Finalmente, ainda que não tenhamos investigado todos os passos do acoplamento excitação-contração no miocárdio remanescente ao infarto, e que nos restringíssemos a analisar indiretamente a integridade funcional e molecular de seus componentes, a importância da terapia instituída para este *milieu* intracelular e o manejo do Ca<sup>2+</sup> na disfunção contrátil foi inquestionável e nunca antes descrita na literatura internacional. Exceção é dada a um único estudo, publicado em uma revista chinesa e escrito no próprio idioma (Fan *et al.*, 2007), ao qual não tivemos acesso à versão do texto na íntegra, em língua inglesa. No resumo em inglês, os autores indicam que após quatro semanas de injeções intracoronarianas de células mononucleares ou células mesenquimais de MO em coelhos com IC produzida por adriamicina, houve melhora da atividade da NKA e da SERCA2 nestes corações, mas sem qualquer menção a respeito da região avaliada e de maiores estudos funcionais e de biologia molecular para tais estruturas.

### **5.4.3. Histopatologia**

Os efeitos promovidos pelo implante celular sobre os aspectos histomorfológicos da zona infartada e da região de transição são bem descritos na literatura. Todavia, pouco se sabe a respeito das suas conseqüências sobre o tecido remoto ao infarto. Após o período de quatro a seis semanas de infarto no rato, já se identifica hipertrofia dos cardiomiócitos da zona de transição, associada à diminuição na quantidade de capilares sanguíneos e também na relação capilar e miócitos (Olivetti *et al.*, 1986). Concomitantemente, ocorrem alterações no perfil da matriz extracelular tanto na porção infartada quanto na zona de transição, que envolvem processos de síntese e degradação de colágeno, o principal componente da matriz extracelular (Olivetti *et al.*, 1986; Spinale, 2007). Em nossas análises, a

densidade capilar e a relação entre o número de capilares por miócitos observadas na zona de transição dos infartos sem terapia estavam menores que aquelas de áreas remotas. Porém, os grupos mIM+BMC e IM+BMC tiveram valores significativamente superiores, sugerindo aumento na quantidade de capilares nessas áreas mais sujeitas a episódios de isquemias relativas e arritmias. Provavelmente, a angiogênese na região de transição pode ter contribuído com a não ocorrência da expansão do infarto com a terapia celular.

Em relação ao tecido remanescente, remoto ao infarto, o remodelamento cursa com hipertrofia dos cardiomiócitos e alterações em todos os componentes no tecido cardíaco, inclusive, com maior deposição de colágeno no interstício (Swynghedauw, 1999). Após as seis semanas de oclusão, evidenciamos aumento significativo da fibrose intersticial no miocárdio remoto ao infarto, o que está de acordo com a maioria dos estudos que demonstraram aumento da síntese e deposição de colágeno no interstício e na vasculatura com o remodelamento pós-IM em ratos (Litwin *et al.*, 1991; Cleutjens *et al.*, 1995; Zimmerman *et al.*, 2001; Jin *et al.*, 2002), também de forma proporcional ao tamanho do IM. De fato, em nossa análise da porcentagem da área intersticial ocupada pelas fibras colágenas, apenas o grupo com grandes IM alcançou significância estatística em relação ao grupo SHAM. A disfunção cardíaca do remodelamento depende das alterações na matriz extracelular da mesma forma que daquelas ocorridas no cardiomiócito, principalmente no que diz respeito às mudanças na rigidez e tamanho cardíacos (Spinale, 2007). No presente trabalho, a injeção da fração mononuclear de MO foi capaz de prevenir significativamente a fibrose intersticial avaliada no miocárdio remoto à área de infarto e reparação, o que sugere ações importantes dessas células em modular, mesmo que à distância, as alterações na matriz extracelular. Neste sentido, as BMC têm sido descritas como eficientes também em amenizar a fibrose, tanto nas regiões infartadas e adjacentes (Kamihata *et al.*, 2001; Berry *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2007; Hou *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2008; Mazo *et al.*, 2008), quanto no miocárdio remanescente ao infarto (Xu *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2007; Burchfield *et al.*, 2008). Embora não tenhamos investigado os mecanismos pelos quais a terapia com BMC pode ter agido em favor da menor deposição de colágeno no interstício, podemos crer que algumas características já foram esclarecidas em estudos anteriores. Do ponto de vista molecular, Guo *et al.* (2007) avaliando o miocárdio adjacente à zona de infarto, e Xu *et al.* (2005) no miocárdio remoto,

descreveram menor fibrose e deposição de colágeno, associadas à reduzida expressão gênica e protéica dos colágenos I e III, MMP-1, TIMP-1 e do fator de crescimento TGF- $\beta$ 1 após quatro semanas de implante de células mesenquimais de MO. Vale lembrar que o desequilíbrio nas quantidades dessas moléculas com aumento na relação entre MMP/TIMP está associado à maior grau de dilatação e disfunção ventriculares (Spinale, 2007). Por outro lado, da mesma forma que o aumento na quantidade das TIMPs, o TGF- $\beta$ 1 super-expresso participa do aumento de fibrose, estimulando a proliferação de fibroblastos, promovendo a deposição e inibindo a degradação de colágeno (Lijnen *et al.*, 2000; Spinale, 2007). Como o acúmulo descontrolado da matriz extracelular por proteínas estruturais como o colágeno pode comprometer substancialmente a elasticidade do tecido miocárdico (Van Kerckhoven *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2000), este poderia ser o substrato estrutural da razão pela qual a terapia celular foi capaz de amenizar a disfunção diastólica e a resposta alterada da TR ao estiramento do músculo papilar dos animais com grandes infartos.

O remodelamento pós-IM ocorre de forma assimétrica, com hipertrofia do músculo remanescente, importante contribuinte da disfunção ventricular (Swynghedauw, 1999; dos Santos & Tucci, 2007). A hipertrofia do cardiomiócito é ilustrada pelo aumento do tamanho celular e nuclear, e da produção e reorganização dos seus componentes (Gerdes *et al.*, 1994; dos Santos & Tucci, 2007). Nesse sentido, o aumento do volume nuclear dos cardiomiócitos remodelados nas áreas remotas ao infarto, nos animais mIM e IM, confirma que a hipertrofia miocárdica está presente. Em contrapartida, a análise de áreas equivalentes, nos grupos tratados, evidenciou volumes nucleares significativamente menores que os dos não tratados, indicando que também o processo de hipertrofia foi influenciado pela terapia celular.

Além disso, no remodelamento miocárdico patológico há hipertrofia dos cardiomiócitos, sem, no entanto, haver concomitante adaptação da microvasculatura o que resulta em rarefação capilar no miocárdio em remodelamento (Anversa *et al.*, 1990; Xie *et al.*, 1997), como também foi identificado no presente trabalho. A redução da densidade capilar por área, e da quantidade de capilar por miócito, sugere que também ocorreu relativa perda do número de capilares sangüíneos. Entretanto, estas alterações foram quase totalmente prevenidas com a injeção da fração mononuclear da MO, o que nos faz acreditar que, por evitar a redução da

razão capilar/miócitos e a rarefação capilar e miocítica, essa terapia possa ter prevenido a perda capilar ou até mesmo promovido angiogênese no miocárdio remoto ao infarto.

Atualmente, a neoformação vascular tem sido um dos efeitos mais intensamente investigados nos estudos envolvendo implante de células derivadas da MO. Todavia, quase a totalidade dos trabalhos experimentais em animais que investigaram se a terapia celular poderia induzir angiogênese ou vasculogênese, o fez, essencialmente, pela observação da zona infartada e de transição (Tomita *et al.*, 1999; Lin, 2004; Nagaya *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004b; Piao *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2006; Uemura *et al.*, 2006; Hou *et al.*, 2007; Zeng *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2008; Mazo *et al.*, 2008). Os mecanismos propostos são fusão ou diferenciação em células endoteliais ou musculares lisas (Lin, 2004; Nagaya *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004b; Dai *et al.*, 2005; Hou *et al.*, 2007; Zeng *et al.*, 2007) e/ou liberação de fatores de crescimento e formação vascular pelas células implantadas (Lin, 2004; Zhang *et al.*, 2004b; Tang *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2006; Uemura *et al.*, 2006; Hou *et al.*, 2007; Iso *et al.*, 2007; Imanishi *et al.*, 2008). Nesse aspecto, é mais consensual a idéia de que a neoangiogênese e neovasculogênese produzida pela terapia com a fração mononuclear ou com células mesenquimais de MO seja, em sua maior parte, resultado de ação parácrina. De fato, não são raros os autores que descreveram aumento na expressão gênica e protéica de fatores de crescimento vascular e endotelial nos tecidos submetidos à terapia celular (Hiasa *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004b; Tang *et al.*, 2005; Uemura *et al.*, 2006; Imanishi *et al.*, 2008), e mesmo aqueles que evidenciaram produção desses fatores *in vitro* pelos tipos celulares candidatos à terapia (Hiasa *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 2006; Uemura *et al.*, 2006; Iso *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2007), e até mostrando que o próprio meio de cultura em que essas células permaneceram pode ter efeitos positivo quanto injetado no coração isquêmico (Gnecchi *et al.*, 2006; Takahashi *et al.*, 2006).

Como já mencionado, poucos estudos buscaram analisar essas características no miocárdio remoto à área de implante com o objetivo de avaliar a capacidade de essas substâncias agirem à distância na modulação do remodelamento miocárdico. Templin *et al.* (2006) descreveu aumento da capilarização na zona de transição, mas não encontrou diferença no miocárdio remoto, quatro semanas após a infusão transcoronariana de BMC em relação ao

grupo não tratado. Os referidos autores não discutem a diferença entre os efeitos das BMC nas duas regiões. Foi utilizada isquemia-reperfusão, sem caracterização de alterações nos capilares do miocárdio remoto dos não tratados. Conseqüentemente, somente foi evidenciado algum benefício na zona de transição, onde a rarefação capilar foi evidente. Hiasa *et al.* (2004) também não evidenciaram melhora na capilarização do miocárdio remanescente ao IM em camundongos após terapia com BMC. Porém, o fato de realizarem as análises apenas dois dias após a terapia, sugere a precocidade das avaliações. Dessa forma, o presente trabalho parece ser o primeiro a demonstrar efeito da terapia celular sobre a densidade capilar no tecido distante do infarto.

Finalmente, vale a menção de que os efeitos secretórios descritos para as células precursoras derivadas de medula-óssea não se restringem ao campo da neovascularização. Muitas outras substâncias biologicamente ativas são descritas como sendo produzidas e liberadas pelas BMC, capazes de influenciar pontos importantes do remodelamento do miocárdio isquêmico e não isquêmico (Limbourg *et al.*, 2005; Crisostomo *et al.*, 2007; Charwat *et al.*, 2008). E tais benefícios podem ocorrer mesmo na ausência de modificações no infarto e de regeneração tecidual (Fazel *et al.*, 2005; Berry *et al.*, 2006; Chien, 2006; Hou *et al.*, 2007; Burchfield *et al.*, 2008). Além de envolver moléculas envolvidas no processo de deposição e reabsorção da matriz extracelular e fatores de crescimento endotelial e vascular; estudos indicaram capacidade de modulação da apoptose e produção de fatores de crescimento e sobrevivência celulares (Kamihata *et al.*, 2001; Lin, 2004; Tang *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2005; Berry *et al.*, 2006; Gneccchi *et al.*, 2006; Uemura *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2007; Iso *et al.*, 2007); modulação inflamatória (Kamihata *et al.*, 2001; Lin, 2004; Takahashi *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2007; Iso *et al.*, 2007; Burchfield *et al.*, 2008; Frantz *et al.*, 2008; Imanishi *et al.*, 2008); e finalmente, mas não menos importante, liberação de quimiotáticos para células precursoras do próprio organismo migrarem a essas regiões (Kamihata *et al.*, 2001; Tang *et al.*, 2005; Gneccchi *et al.*, 2006; Takahashi *et al.*, 2006; Uemura *et al.*, 2006; Iso *et al.*, 2007; Frantz *et al.*, 2008).

## **6. CONCLUSÕES**

## **6. CONCLUSÕES**

### **6.1. Conclusões específicas**

O tamanho do infarto relativo ao VE foi discretamente menor após terapia com BMC. A análise do comprimento absoluto demonstrou que não houve expansão do infarto nos grupos mIM+BMC e IM+BMC;

A hipertrofia, dilatação e disfunção ventriculares, assim com a hipertensão e congestão pulmonares, foram parcialmente prevenidas pela terapia celular;

IM e mesmo os mIM apresentaram desempenho ventricular comprometido frente ao estresse de pós-carga, enquanto os animais tratados foram equiparáveis aos SHAM;

A contratilidade basal e estimulada, a contração após pausa de estímulos e a relação entre o estiramento e força contrátil foram preservadas nos grupos tratados, melhores mesmo que o mIM, de tamanho do infarto equivalente;

As proteínas relacionadas à cinética intramiocitária do cálcio, assim com a hipertrofia, fibrose intersticial e vascularização do miocárdio remoto ao infarto apresentaram-se praticamente normais após BMC, apesar da pequena redução no tamanho do infarto.

## **6.2. Conclusão geral**

Este presente trabalho reúne um conjunto de resultados que complementam as informações da literatura a respeito dos efeitos da injeção de células mononucleares derivadas da medula-óssea sobre o infarto do miocárdio e a disfunção cardíaca no rato. Ademais, apresenta novas informações que envolvem os benefícios dessa terapia sobre o remodelamento estrutural, molecular e funcional do tecido remoto à zona de infarto e reparação, de forma independente ao tamanho do infarto, que reforçam a hipótese dessas células agirem, no tecido hospedeiro, mediadas principalmente por substâncias ou fatores biologicamente ativos.

Isso certamente implica na investigação e descrição dos mecanismos pelos quais a presença dessas células parece interferir nas alterações protéicas associadas à depressão contrátil do miocárdio remanescente, em associação à angiogênese e modulação da hipertrofia miocítica e fibrose intersticial. Ao identificarmos detalhadamente esses aspectos, talvez possamos, enfim, definir o exato papel terapêutico das células precursoras para a prática médica e, dessa forma, encontrar as melhores estratégias para os diversos processos patológicos potencialmente envolvidos.



***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbate A, Biondi-Zoccai GGL, Agostoni P, Lipinski MJ, Vetrovec GW. Recurrent angina after coronary revascularization: A clinical challenge. *Eur Heart J*. 2007; 28(9):1057-65.
- Abbott JD, Huang Y, Liu D, Hickey R, Krause DS, Giordano FJ. Stromal cell-derived factor-19 $\alpha$  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*. 2004; 110(21):3300-05.
- Abreu G, Vassallo D, Mill J. The Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange mechanism as a regulator of post rest contractions in cardiac muscle. *Braz J Med Biol Res*. 1987; 20(6):817-20.
- Agbulut O, Mazo M, Bressolle C, Gutierrez M, Azarnoush K, Sabbah L, *et al*. Can bone marrow-derived multipotent adult progenitor cells regenerate infarcted myocardium? *Cardiovasc Res*. 2006; 72(1):175-83.
- Agbulut O, Menot M-L, Li Z, Marotte F, Paulin D, Hagege AA, Chomienne C, Samuel J-L, Menasche P. Temporal patterns of bone marrow cell differentiation following transplantation in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Cardiovasc Res*. 2003; 58(2):451-59.
- Agnoletti G, Cargnoni A, Agnoletti L, Di Marcello M, Balzarini P, Gitti L, Martina P, Grigolato PG, Ferrari R. Percutaneous coronary injection of bone marrow cells in small experimental animals: Small is not too small. *Pathol Res Pract*. 2007; 203(11):801-08.
- Ahmet I, Krawczyk M, Zhu W, Woo AY-H, Morrell C, Poosala S, Xiao R-p, Lakatta EG, Talan MI. Cardioprotective and survival benefits of long-term combined therapy with  $\beta$ -2 adrenoreceptor (AR) agonist and  $\beta$ -1 AR blocker in dilated cardiomyopathy postmyocardial infarction. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008; 325(2):491-99.
- Allen D, Kentish J. The cellular basis of the length-tension relation in cardiac muscle. *J Mol Cell Cardiol*. 1985; 17(9):821-40.
- Alpert NR, Hasenfuss G, Leavitt BJ, Ittleman FP, Pieske B, Mulieri LA. A mechanistic analysis of reduced mechanical performance in human heart failure. *Jpn Heart J*. 2000; 41(2):103-16.

- An J, Beauchemin N, Albanese J, Abney TO, Sullivan AK. Use of a rat cDNA probe specific for the Y chromosome to detect male-derived cells. *J Androl.* 1997; 18(3):289-93.
- Anand IS, Liu D, Chugh SS, Prahash AJC, Gupta S, John R, Popescu F, Chandrashekhar Y. Isolated myocyte contractile function is normal in postinfarct remodeled rat heart with systolic dysfunction. *Circulation.* 1997; 96(11):3974-84.
- Anversa P, Beghi C, McDonald S, Levicky V, Kikkawa Y, Olivetti G. Morphometry of right ventricular hypertrophy induced by myocardial infarction in the rat. *Am J Pathol.* 1984; 116(3):504-13.
- Anversa P, Capasso J, Sonnenblick E, Olivetti G. Mechanisms of myocyte and capillary growth in the infarcted heart. *Eur Heart J.* 1990; 11(Suppl B):123-32.
- Anversa P, Leri A, Kajstura J. Cardiac regeneration. *J Am Coll Cardiol.* 2006; 47(9):1769-76.
- Anversa P, Li P, Zhang X, Olivetti G, Capasso JM. Ischaemic myocardial injury and ventricular remodelling. *Cardiovasc Res.* 1993; 27(2):145-57.
- Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, *et al.* Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation.* 2002; 106(24):3009-17.
- Baily RG, Lehman JC, Gubin SS, Musch TI. Non-invasive assessment of ventricular damage in rats with myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 1993; 27(5):851-55.
- Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, Feinberg MS, Etzion S, Tessone A, *et al.* Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: Feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation.* 2003; 108(7):863-68.
- Bassani RA, Bers DM. Na-Ca exchange is required for rest-decay but not for rest-potential of twitches in rabbit and rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 1994; 26(10):1335-47.
- Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, *et al.* Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell.* 2003; 114(6):763-76.
- Berry MF, Engler AJ, Woo YJ, Pirolli TJ, Bish LT, Jayasankar V, Morine KJ, Gardner TJ, Discher DE, Sweeney HL. Mesenchymal stem cell injection after myocardial infarction improves myocardial compliance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006; 290(6):H2196-203.
- Bers DM. Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. 2nd ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 2002.
- Bers DM. Altered cardiac myocyte Ca regulation in heart failure. *Physiology.* 2006; 21(6):380-87.
- Blaustein M, Juhaszova M, Golovina V. The cellular mechanism of action of cardiotonic steroids: A new hypothesis. *Clin Exp Hypertens.* 1998; 20(5-6):691-703.

- Bonilha AMM, Saraiva RM, Kanashiro RM, Portes LA, Antonio EL, Tucci PJF. A routine electrocardiogram cannot be used to determine the size of myocardial infarction in the rat. *Braz J Med Biol Res.* 2005; 38:615-19.
- Boomsma RA, Swaminathan PD, Geenen DL. Intravenously injected mesenchymal stem cells home to viable myocardium after coronary occlusion and preserve systolic function without altering infarct size. *Int J Cardiol.* 2007; 122(1):17-28.
- Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72:248-54.
- Bugge-Asperheim B, Kiil F. Cardiac response to increased aortic pressure. Changes in output and left ventricular pressure pattern at various levels of inotropy. *Scand J Clin Lab Invest.* 1969; 24(4):345-60.
- Burchfield JS, Iwasaki M, Koyanagi M, Urbich C, Rosenthal N, Zeiher AM, Dimmeler S. Interleukin-10 from transplanted bone marrow mononuclear cells contributes to cardiac protection after myocardial infarction. *Circ Res.* 2008; 103(2):203-11.
- Burstein B, Maguy A, Clement R, Gosselin H, Poulin F, Ethier N, Tardif J-C, Hebert TE, Calderone A, Nattel S. Effects of resveratrol (trans-3,5,4'-trihydroxystilbene) treatment on cardiac remodeling following myocardial infarction. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007; 323(3):916-23.
- Chachques JC, Azarine A, Mousseaux E, El-Serafi M, Cortes-Morichetti M, Carpentier AF. MRI evaluation of local myocardial treatments: Epicardial versus endocardial (cell-fix catheter) injections. *J Interv Cardiol.* 2007; 20(3):188-96.
- Charwat S, Gyöngyösi M, Lang I, Graf S, Beran G, Hemetsberger R, Nyolczas N, Sochor H, Glogar D. Role of adult bone marrow stem cells in the repair of ischemic myocardium: Current state of the art. *Exp Hematol.* 2008; 36(6):672-80.
- Chen Y, Escoubet B, Prunier F, Amour J, Simonides WS, Vivien B, *et al.* Constitutive cardiac overexpression of sarcoplasmic/endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase delays myocardial failure after myocardial infarction in rats at a cost of increased acute arrhythmias. *Circulation.* 2004; 109(15):1898-903.
- Cheung JY, Musch TI, Misawa H, Semanchick A, Elensky M, Yelamarty RV, Moore RL. Impaired cardiac function in rats with healed myocardial infarction: Cellular vs. Myocardial mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol.* 1994; 266(1):C29-36.
- Chien K. Molecular advances in cardiovascular biology. *Science.* 1993; 260(5110):916-7.
- Chien K. Lost and found: Cardiac stem cell therapy revisited. *J Clin Invest.* 2006; 116(7):1838-40.
- Cleutjens JPM, Kandala JC, Guarda E, Guntaka RV, Weber KT. Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 1995; 27(6):1281-92.
- Crisostomo P, Wang M, Markel T, Lahm T, Abarbanell A, Herrmann J, Meldrum D. Stem cell mechanisms and paracrine effects: Potential in cardiac surgery. *Shock.* 2007; 28(4):375-83.

- Cury AF, Bonilha A, Saraiva R, Campos O, Carvalho ACC, De Paola ÂAV, Fischer C, Tucci PF, Moises VA. Myocardial performance index in female rats with myocardial infarction: Relationship with ventricular function parameters by doppler echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr*. 2005; 18(5):454-60.
- Dai W, Hale SL, Martin BJ, Kuang J-Q, Dow JS, Wold LE, Kloner RA. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: Short- and long-term effects. *Circulation*. 2005; 112(2):214-23.
- de Macedo Braga L, Lacchini S, Schaan B, Rodrigues B, Rosa K, De Angelis K, Borges L, Irigoyen M, Nardi N. In situ delivery of bone marrow cells and mesenchymal stem cells improves cardiovascular function in hypertensive rats submitted to myocardial infarction. *J Biomed Sci*. 2008a; 15(3):365-74.
- de Macedo Braga LMG, Rosa K, Rodrigues B, Malfitano C, Camassola M, Chagastelles P, et al. Systemic delivery of adult stem cells improves cardiac function in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2008b; 35(2):113-19.
- Dixon IM, Hata T, Dhalla NS. Sarcolemmal calcium transport in congestive heart failure due to myocardial infarction in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1992; 262(5):H1387-94.
- dos Santos L, Antônio EL, Souza AFM, Tucci PJF. Sudden afterload stress identifies contractile depression in infarcted rats with normal basal cardiac performance. *41st Congress of Brazilian Physiology Society & Joint Meeting with The Physiological Society*; Ribeirão Preto, 2006.
- dos Santos L, Tucci PJF. Remodelamento miocárdico: O cardiomiócito, a função do órgão. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo*. 2007; 3:196-205.
- dos Santos LM, A. F. S.; Antonio, E. L.; Tucci, P. J. F. Determination of myocardial infarction size in rats by echocardiography and tetrazolium staining: Correlation, agreements, and simplifications. *Braz J Med Biol Res*. 2008; 41(3):199-201.
- Dzau VJ, Morishita R, Gibbons GH. Gene therapy for cardiovascular disease. *Trends Biotechnol*. 1993; 11(5):205-10.
- Ebelt H, Jungblut M, Zhang Y, Kubin T, Kostin S, Technau A, et al. Cellular cardiomyoplasty: Improvement of left ventricular function correlates with the release of cardioactive cytokines. *Stem Cells*. 2007; 25(1):236-44.
- Evans M. Ethical sourcing of human embryonic stem cells: Rational solutions? *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005; 6(8):663-67.
- Fan Z, Chen M, Deng J, Liu X, Zhang L, Rao L, Yang Q, Huang D. Changes of sarcolemma Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase and sarcoplasmic reticulum membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase activity after stem cell transplantation in chronic heart failure. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*. 2007; 24(1):136-39.
- Fazel S, Chen L, Weisel RD, Angoulvant D, Seneviratne C, Fazel A, et al. Cell transplantation preserves cardiac function after infarction by infarct stabilization: Augmentation by stem cell factor. *J Thorac Cardiovasc Sur*. 2005; 130(5):1310.e1-1310.e10.

- Field LJ. Transgenic mice in cardiovascular research. *Annual Review of Physiology*. 1993; 55(1):97-114.
- Fishbein M, Maclean D, Maroko P. Experimental myocardial infarction in the rat: Qualitative and quantitative changes during pathologic evolution. *Am J Pathol*. 1978; 90(1):57-70.
- Fishbein M, Meerbaum S, Rit J, Lando U, Kanmatsuse K, Mercier J, Corday E, Ganz W. Early phase acute myocardial infarct size quantification: Validation of the triphenyl tetrazolium chloride tissue enzyme staining technique. *Am Heart J*. 1981; 101(5):593-600.
- Fletcher P, Pfeffer J, Pfeffer M, Braunwald E. Left ventricular diastolic pressure-volume relations in rats with healed myocardial infarction. Effects on systolic function. *Circ Res*. 1981; 49(3):618-26.
- Fletcher PJ, Pfeffer JM, Pfeffer MA, Braunwald E. Effects of hypertension on cardiac performance in rats with myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 1982; 50(3):488-96.
- Flumignan RLG, Kanashiro RM, Saraiva RM, Portes LA, Antonio EL, Ishigai MMS, Tucci PJF. Incidence of heart failure in infarcted rats that die spontaneously. *Braz J Med Biol Res*. 2006; 39:1323-28.
- Francis J, Weiss RM, Wei SG, Johnson AK, Felder RB. Progression of heart failure after myocardial infarction in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001; 281(5):R1734-45.
- Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2002; 53(1):31-47.
- Frantz S, Vallabhapurapu D, Tillmanns J, Brousos N, Wagner H, Henig K, Ertl G, Müller AM, Bauersachs J. Impact of different bone marrow cell preparations on left ventricular remodelling after experimental myocardial infarction. *Eur J Heart Fail*. 2008; 10(2):119-24.
- Freyman T, Polin G, Osman H, Crary J, Lu M, Cheng L, Palasis M, Wilensky RL. A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2006; 27(9):1114-22.
- Frezza WA, Bing OHL. PO<sub>2</sub>-modulated performance of cardiac muscle. *Am J Physiol*. 1976; 231(5 Pt. 1):1620-4.
- Fuchs S, Kornowski R, Weisz G, Satler LF, Smits PC, Okubagzi P, *et al*. Safety and feasibility of transendocardial autologous bone marrow cell transplantation in patients with advanced heart disease. *Am J Cardiol*. 2006; 97(6):823-29.
- Fukuda K, Fujita J. Mesenchymal, but not hematopoietic, stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction in mice. *Kidney Int*. 2005; 68(5):1940-43.
- Fukuda N, Sasaki D, Ishiwata Si, Kurihara S. Length dependence of tension generation in rat skinned cardiac muscle: Role of titin in the Frank-Starling mechanism of the heart. *Circulation*. 2001; 104(14):1639-45.

- Fukuhara S, Tomita S, Nakatani T, Yutani C, Kitamura S. Endogenous bone-marrow-derived stem cells contribute only a small proportion of regenerated myocardium in the acute infarction model. *J Heart Lung Transplant*. 2005; 24(1):67-72.
- Gerdes A, Liu Z, Zimmer H. Changes in nuclear size of cardiac myocytes during the development and progression of hypertrophy in rats. *Cardioscience*. 1994; 5(3):203-8.
- Gill R, Jones B, Corbly A, Ohad D, Smith G, Sandusky G, Christe M, Wang J, Shen W. Exhaustion of the Frank-Starling mechanism in conscious dogs with heart failure induced by chronic coronary microembolization. *Life Sci*. 2006; 79(6):536-44.
- Gnecchi M, He H, Noiseux N, Liang OD, Zhang L, Morello F, *et al*. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB J*. 2006; 20(6):661-69.
- Gomez AM, Schwaller B, Porzig H, Vassort G, Niggli E, Egger M. Increased exchange current but normal  $\text{Ca}^{2+}$  transport via  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchange during cardiac hypertrophy after myocardial infarction. *Circ Res*. 2002; 91(4):323-30.
- Gosselin H, Qi X, Rouleau J. Correlation between cardiac remodelling, function, and myocardial contractility in rat hearts 5 weeks after myocardial infarction. *Can J Physiol Pharmacol*. 1998; 76(1):53-62.
- Guo J, Lin G-s, Bao C-y, Hu Z-m, Hu M-y. Anti-inflammation role for mesenchymal stem cells transplantation in myocardial infarction. *Inflammation*. 2007; 30(3):97-104.
- Gupta S, Prahash AJC, Anand IS. Myocyte contractile function is intact in the post-infarct remodeled rat heart despite molecular alterations. *Cardiovasc Res*. 2000; 48(1):77-88.
- Hale SL, Dai W, Dow JS, Kloner RA. Mesenchymal stem cell administration at coronary artery reperfusion in the rat by two delivery routes: A quantitative assessment. *Life Sciences*. 2008; 83(13-14): 511-15.
- Hasenfuss G. Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy. *Cardiovasc Res*. 1998; 39(1):60-76.
- Hayashi M, Li T, Ito H, Mikamo A, Hamano K. Comparison of intramyocardial and intravenous routes of delivering bone marrow cells for the treatment of ischemic heart disease: An experimental study. *Cell Transplant*. 2004; 13(6):639-47.
- Heerkens Y, Woittiez R, Kiela J, Huijing P, Huson A, van Ingen Schenau G, Rozendal R. Mechanical properties of passive rat muscle during sinusoidal stretching. *Pflugers Arch, Eur J Physiol*. 1987; 409(4-5):438-47.
- Heimburger R. Injection into pericardial sac and ligation of coronary artery of the rat. *Arch Surg*. 1946; 52(677-89).
- Herreros J, Prosper F, Perez A, Gavira JJ, Garcia-Velloso MJ, Barba J, *et al*. Autologous intramyocardial injection of cultured skeletal muscle-derived stem cells in patients with non-acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2003; 24(22):2012-20.

- Hiasa K-i, Egashira K, Kitamoto S, Ishibashi M, Inoue S, Ni W, *et al.* Bone marrow mononuclear cell therapy limits myocardial infarct size through vascular endothelial growth factor. *Basic Res Cardiol.* 2004; 99(3):165-72.
- Holt E, Tønnessen T, Lunde PK, Semb SO, Wasserstrom JA, Sejersted OM, Christensen G. Mechanisms of cardiomyocyte dysfunction in heart failure following myocardial infarction in rats. *J Mol Cell Cardiol.* 1998; 30(8):1581-93.
- Hood W, McCarthy B, Lown B. Aortic pressure loading in dogs with myocardial infarction. *Am Heart J.* 1969; 77(1):55-62.
- Hou M, Yang K-m, Zhang H, Zhu W-Q, Duan F-j, Wang H, Song Y-h, Wei Y-j, Hu S-s. Transplantation of mesenchymal stem cells from human bone marrow improves damaged heart function in rats. *Int J Cardiol.* 2007; 115(2):220-28.
- Hu KMD, Gaudron PMD, Ertl GMD. Effects of high- and low-dose amiodarone on mortality, left ventricular remodeling, and hemodynamics in rats with experimental myocardial infarction. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004; 44(6):627-30.
- Hu X, Wang J, Chen J, Luo R, He A, Xie X, Li J. Optimal temporal delivery of bone marrow mesenchymal stem cells in rats with myocardial infarction. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2007; 31(3):438-43.
- Huang B, Wang S, Qin D, Boutjdir M, El-Sherif N. Diminished basal phosphorylation level of phospholamban in the postinfarction remodeled rat ventricle : Role of  $\beta$ -adrenergic pathway, Gi protein, phosphodiesterase, and phosphatases. *Circ Res.* 1999; 85(9):848-55.
- Hutchins G, Bulkley B. Infarct expansion versus extension: Two different complications of acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 1978; 41(7):1127-32.
- Imanishi Y, Saito A, Komoda H, Kitagawa-Sakakida S, Miyagawa S, Kondoh H, Ichikawa H, Sawa Y. Allogenic mesenchymal stem cell transplantation has a therapeutic effect in acute myocardial infarction in rats. *J Mol Cell Cardiol.* 2008; 44(4):662-71.
- Irving TC, Konhilas J, Perry D, Fischetti R, de Tombe PP. Myofilament lattice spacing as a function of sarcomere length in isolated rat myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000; 279(5):H2568-73.
- Iso Y, Spees JL, Serrano C, Bakondi B, Pochampally R, Song Y-H, Sobel BE, Delafontaine P, Prockop DJ. Multipotent human stromal cells improve cardiac function after myocardial infarction in mice without long-term engraftment. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 354(3):700-06.
- Jain M, DerSimonian H, Brenner DA, Ngoy S, Teller P, Edge ASB, *et al.* Cell therapy attenuates deleterious ventricular remodeling and improves cardiac performance after myocardial infarction. *Circulation.* 2001; 103(14):1920-27.
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, *et al.* Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature.* 2002; 418(6893):41-49.



- Jin H, Yang R, Lu H, Ogasawara AK, Li W, Ryan A, Peale F, Paoni NF. Effects of early treatment with growth hormone on infarct size, survival, and cardiac gene expression after acute myocardial infarction. *Growth Horm IGF Res.* 2002; 12(4):208-15.
- Johns T, Olson B. Experimental myocardial infarction I. A method of coronary occlusion in small animals. *Ann Surg.* 1954; 140(5):675-82.
- Junqueira L, Bignolas G, Brentani R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J.* 1979; 11(4):447-55.
- Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, Fujiyama S, Tsutsumi Y, Ozono R, *et al.* Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation.* 2001; 104(9):1046-52.
- Kanashiro R, Nozawa E, Murad N, Gerola L, Moisés V, Tucci P. Myocardial infarction scar plication in the rat: Cardiac mechanics in an animal model for surgical procedures. *Ann Thorac Surg.* 2002; 73(5):1507-13.
- Kanashiro RM, Saraiva RM, Alberta A, Antonio EL, Moisés VA, Tucci PJF. Immediate functional effects of left ventricular reduction: A Doppler echocardiographic study in the rat. *J Card Fail.* 2006; 12(2):163-69.
- Kannel WB. Incidence and epidemiology of heart failure. *Heart Fail Rev.* 2000; 5(2):167-73.
- Kitabatake AI, M; Asao, M; Masuyama, T; Tanouchi, J; Morita, T; Mishima, M; Uematsu, M; Shimazu, T; Hori, M; Abe, H. Noninvasive evaluation of pulmonary hypertension by a pulsed Doppler technique. *Circulation.* 1983; 68(2):302-09.
- Kitzman D, Higginbotham M, Cobb F, Sheikh K, Sullivan M. Exercise intolerance in patients with heart failure and preserved left ventricular systolic function: Failure of the Frank-Starling mechanism. *J Am Coll Cardiol.* 1991; 17(5):1065-72.
- Kolossov E, Bostani T, Roell W, Breitbach M, Pillekamp F, Nygren JM, *et al.* Engraftment of engineered ES cell-derived cardiomyocytes but not BM cells restores contractile function to the infarcted myocardium. *J Exp Med* 2006; 203(10):2315-27.
- Komamura K, Shannon R, Ihara T, Shen Y, Mirsky I, Bishop S, Vatner S. Exhaustion of Frank-Starling mechanism in conscious dogs with heart failure. *Am J Physiol.* 1993; 265(4 Pt 2):H1119-31.
- Lee WC, Chavez YE, Baker T, Luce BR. Economic burden of heart failure: A summary of recent literature. *Heart Lung.* 2004; 33(6):362-71.
- Leenen FHH, Yuan B. Mortality after coronary artery occlusion in different models of cardiac hypertrophy in rats. *Hypertension.* 2001; 37(2):209-15.
- Lehnart SE, Schillinger W, Pieske B, Prestle J, Just H, Hasenfuss G. Sarcoplasmic reticulum proteins in heart failure. *Ann N Y Acad Sci.* 1998; 853:220-30.
- Leite-Moreira AF, Correia-Pinto J, Gillebert TC. Afterload induced changes in myocardial relaxation: A mechanism for diastolic dysfunction. *Cardiovasc Res.* 1999; 43(2):344-53.

- Léobon B, Garcin I, Menasché P, Vilquin J-T, Audinat E, Charpak S. Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(13):7808-11.
- Leor J, Prentice H, Sartorelli V, Quinones MJ, Patterson M, Kedes LK, Kloner RA. Gene transfer and cell transplant: An experimental approach to repair a 'broken heart'. *Cardiovasc Res*. 1997; 35(3):431-41.
- Li L, Zhang S, Zhang Y, Yu B, Xu Y, Guan Z. Paracrine action mediates the antifibrotic effect of transplanted mesenchymal stem cells in a rat model of global heart failure. *Mol Biol Reports*. 2008; Epub.
- Li P, Hofmann PA, Li B, Malhotra A, Cheng W, Sonnenblick EH, Meggs LG, Anversa P. Myocardial infarction alters myofilament calcium sensitivity and mechanical behavior of myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1997; 272(1):H360-70.
- Li R, Mickle D, Weisel R, Rao V, Jia Z. Optimal time for cardiomyocyte transplantation to maximize myocardial function after left ventricular injury. *Ann Thorac Surg*. 2001; 72(6):1957-63.
- Li R, Yau T, Sakai T, Mickle D, Weisel R. Cell therapy to repair broken hearts. *Can J Cardiol*. 1998; 14(5):735-44.
- Lijnen PJ, Petrov VV, Fagard RH. Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor- $\beta$ 1. *Mol Genet Metab*. 2000; 71(1-2):418-35.
- Limbourg F, Ringes-Lichtenberg S, Schaefer A, Jacoby C, Mehraein Y, Jäger M, *et al*. Haematopoietic stem cells improve cardiac function after infarction without permanent cardiac engraftment. *Eur J Heart Fail*. 2005; 7(5):722-9.
- Lin GL, JJ; Jiang, XJ; Li, XY; Li, GS. Autologous transplantation of bone marrow mononuclear cells improved heart function after myocardial infarction. *Acta Pharmacol Sin*. 2004; 25(7):876-86.
- Litwin S, Raya T, Warner A, Litwin C, Goldman S. Effects of captopril on contractility after myocardial infarction: Experimental observations. *Am J Cardiol*. 1991; 68(14):26D-34D.
- Litwin SE. The rat model of postinfarction heart failure. *Heart Failure*. 1995; 11(5):182-95.
- Litwin SE, Bridge JHB. Enhanced  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchange in the infarcted heart: Implications for excitation-contraction coupling. *Circ Res*. 1997; 81(6):1083-93.
- Litwin SE, Katz SE, Litwin CM, Morgan JP, Douglas PS. Gender differences in postinfarction left ventricular remodeling. *Cardiology*. 1999; 91(3):173-83.
- Litwin SE, Katz SE, Morgan JP, Douglas PS. Serial echocardiographic assessment of left ventricular geometry and function after large myocardial infarction in the rat. *Circulation*. 1994; 89(1):345-54.
- Litwin SE, Morgan JP. Captopril enhances intracellular calcium handling and  $\beta$ -adrenergic responsiveness of myocardium from rats with postinfarction failure. *Circ Res*. 1992; 71(4):797-807.

- Liu J, Wang B, Hung H, Chang H, Shyu K. Human mesenchymal stem cells improve myocardial performance in a splenectomized rat model of chronic myocardial infarction. *J Formos Med Assoc.* 2008; 107(2):165-74.
- Liu YH, Yang XP, Nass O, Sabbah HN, Peterson E, Carretero OA. Chronic heart failure induced by coronary artery ligation in Lewis inbred rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1997; 272(2):H722-27.
- Ma J, Ge J, Zhang S, Sun A, Shen J, Chen L, Wang K, Zou Y. Time course of myocardial stromal cell-derived factor 1 expression and beneficial effects of intravenously administered bone marrow stem cells in rats with experimental myocardial infarction. *Basic Res Cardiol.* 2005; 100(3):217-23.
- MacGregor DC, Covell JW, Mahler F, Dilley RB, Ross J, Jr. Relations between afterload, stroke volume, and descending limb of Starling's curve. *Am J Physiol.* 1974; 227(4):884-90.
- Mangi AA, Noiseux N, Kong D, He H, Rezvani M, Ingwall JS, Dzau VJ. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat Med.* 2003; 9(9):1195-201.
- Marelli D, Desrosiers C, el-Alfy M, Kao R, Chiu R. Cell transplantation for myocardial repair: An experimental approach. *Cell Transplant.* 1992; 1(6):383-90.
- Mazo M, Planat-Bénard V, Abizanda G, Pelacho B, Léobon B, Gavira JJ, *et al.* Transplantation of adipose derived stromal cells is associated with functional improvement in a rat model of chronic myocardial infarction. *Eur J Heart Fail.* 2008; 10(5):454-62.
- Menasché P, Hagège AA, Vilquin J-T, Desnos M, Abergel E, Pouzet B, *et al.* Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 2003; 41(7):1078-83.
- Mill J, Novaes M, Galon M, Nogueira J, Vassallo D. Comparison of the contractile performance of the hypertrophied myocardium from spontaneous hypertensive rats and normotensive infarcted rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 1998; 78(4):387-94.
- Mill J, Stefanon I, Leite C, Vassallo D. Heterometric regulation and calcium sensitivity of the infarcted rat heart. *Braz J Med Biol Res.* 1991; 24(4):429-36.
- Mill J, Vassallo D, Leite C. Mechanisms underlying the genesis of post-rest contractions in cardiac muscle. *Braz J Med Biol Res.* 1992; 25(4):399-408.
- Mill JG, Stefanon I, Leite CM, Vassallo DV. Changes in performance of the surviving myocardium after left ventricular infarction in rats. *Cardiovasc Res.* 1990; 24(9):748-53.
- Min J-Y, Ding B, Wang J-F, Sullivan MF, Morgan JP. Metoprolol attenuates postischemic depressed myocardial function in papillary muscles isolated from normal and postinfarction rat hearts. *Eur J Pharmacol.* 2001; 422(1-3):115-25.
- Min J-Y, Yang Y, Converso KL, Liu L, Huang Q, Morgan JP, Xiao Y-F. Transplantation of embryonic stem cells improves cardiac function in postinfarcted rats. *J Appl Physiol.* 2002; 92(1):288-96.

- Min J-Y, Yang Y, Sullivan MF, Ke Q, Converso KL, Chen Y, Morgan JP, Xiao Y-F. Long-term improvement of cardiac function in rats after infarction by transplantation of embryonic stem cells. *J Thorac Cardiovasc Sur.* 2003; 125(2):361-69.
- Ministério da Saúde. [www.datasus.gov.br](http://www.datasus.gov.br). Acesso realizado em 26 de setembro de 2008.
- Miranda A, Costa-e-Sousa RH, Werneck-de-Castro JPS, Mattos EC, Olivares EL, Ribeiro VP, Silva MG, Goldenberg RCS, Campos-de-Carvalho AC. Time course of echocardiographic and electrocardiographic parameters in myocardial infarct in rats. *An Acad Bras Ciênc.* 2007; 79(639-48).
- Mittmann C, Eschenhagen T, Scholz H. Cellular and molecular aspects of contractile dysfunction in heart failure. *Cardiovasc Res.* 1998; 39(2):267-75.
- Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H, *et al.* Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med.* 2006; 12(4):459-65.
- Moisés VA, Ferreira RL, Nozawa E, Kanashiro RM, Campos F<sup>o</sup> O, Andrade Jld, Carvalho ACC, Tucci PJF. Structural and functional characteristics of rat hearts with and without myocardial infarct. Initial experience with Doppler echocardiography. *Arq Bras Cardiol.* 2000; 75:131-36.
- Müller-Ehmsen J, Krausgrill B, Burst V, Schenk K, Neisen UC, Fries JWU, Fleischmann BK, Hescheler J, Schwinger RHG. Effective engraftment but poor mid-term persistence of mononuclear and mesenchymal bone marrow cells in acute and chronic rat myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 2006; 41(5):876-84.
- Müller-Ehmsen J, Whittaker P, Kloner RA, Dow JS, Sakoda T, Long TI, Laird PW, Kedes L. Survival and development of neonatal rat cardiomyocytes transplanted into adult myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 2002; 34(2):107-16.
- Murry C, Wiseman R, Schwartz S, Hauschka S. Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis. *J Clin Invest.* 1996; 98(11):2512-23.
- Murry CE, Reinecke H, Pabon LM. Regeneration gaps: Observations on stem cells and cardiac repair. *J Am Coll Cardiol.* 2006; 47(9):1777-85.
- Nagaya N, Fujii T, Iwase T, Ohgushi H, Itoh T, Uematsu M, Yamagishi M, Mori H, Kangawa K, Kitamura S. Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004; 287(6):H2670-76.
- Nagaya N, Kangawa K, Itoh T, Iwase T, Murakami S, Miyahara Y, *et al.* Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 2005; 112(8):1128-35.
- Nahrendorf M, Hu K, Fraccarollo D, Hiller K-H, Haase A, Bauer WR, Ertl G. Time course of right ventricular remodeling in rats with experimental myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003; 284(1):H241-48.
- Novaes M, Stefanon I, Mill J, Vassallo D. Contractility changes of the right and ventricular muscle after chronic myocardial infarction. *Braz J Med Biol Res.* 1996; 29(12):1683-90.

- Novotny NM, Ray R, Markel TA, Crisostomo PR, Wang M, Wang Y, Meldrum DR. Stem cell therapy in myocardial repair and remodeling. *J Am Coll Surg*. 2008; 207(3):423-34.
- Nozawa E, Kanashiro RM, Murad N, Carvalho ACC, Cravo SLD, Campos O, Tucci PJF, Moises VA. Performance of two-dimensional Doppler echocardiography for the assessment of infarct size and left ventricular function in rats. *Braz J Med Biol Res*. 2006; 39:687-95.
- Olivares EL, Ribeiro VP, Werneck de Castro JPS, Ribeiro KC, Mattos EC, Goldenberg RCS, *et al*. Bone marrow stromal cells improve cardiac performance in healed infarcted rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004; 287(2):H464-70.
- Oliveira FAA. Evolução Doppler ecocardiográfica de ratos machos e fêmeas após infarto do miocárdio (Mestrado). Cardiologia; Universidade Federal de São Paulo. 2007.
- Olivetti G, Capasso J, Sonnenblick E, Anversa P. Side-to-side slippage of myocytes participates in ventricular wall remodeling acutely after myocardial infarction in rats. *Circ Res*. 1990; 67(1):23-34.
- Olivetti G, Ricci R, Beghi C, Guideri G, Anversa P. Response of the border zone to myocardial infarction in rats. *Am J Pathol*. 1986; 125(3):476-83.
- Opie LH, Commerford PJ, Gersh BJ, Pfeffer MA. Controversies in ventricular remodeling. *Lancet*. 2006; 367(9507):356-67.
- Opie LH, Paterson DJ. Heart failure: Neurohumoral responses. In: Opie LH. *Heart physiology: From cell to circulation*. 4 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p. 485-524.
- Opitz CF, Mitchell GF, Pfeffer MA, Pfeffer JM. Arrhythmias and death after coronary artery occlusion in the rat : Continuous telemetric ECG monitoring in conscious, untethered rats. *Circulation*. 1995; 92(2):253-61.
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, *et al*. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001a; 410(6829):701-05.
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001b; 98(18):10344-49.
- Paradise NF, Schmitter JL, Surmitis JM. Criteria for adequate oxygenation of isometric kitten papillary muscle. *Am J Physiol*. 1981; 241(3):H348-53.
- Pawlus DG, Moore RL, Musch TI, Davidson WR, Jr. Echocardiographic evaluation of size, function, and mass of normal and hypertrophied rat ventricles. *J Appl Physiol*. 1993; 74(5):2598-605.
- Payne TR, Oshima H, Okada M, Momoi N, Tobita K, Keller BB, Peng H, Huard J. A relationship between vascular endothelial growth factor, angiogenesis, and cardiac repair after muscle stem cell transplantation into ischemic hearts. *J Am Coll Cardiol*. 2007; 50(17):1677-84.

- Perin E. Transendocardial injection of autologous mononuclear bone marrow cells in end-stage ischemic heart failure patients: One-year follow-up. *Int J Cardiol.* 2004; 95(Supp 1):S45-S46.
- Peron APON, Saraiva RM, Antonio EL, Tucci PJF. A função mecânica do miocárdio remanescente a um infarto do miocárdio é normal durante o período de cicatrização, embora exista insuficiência cardíaca. *Arq Bras Cardiol.* 2006; 86:105-12.
- Pfeffer J, Pfeffer M, Braunwald E. Hemodynamic benefits and prolonged survival with long-term captopril therapy in rats with myocardial infarction and heart failure. *Circulation.* 1987; 75(1 Pt 2):1149-55.
- Pfeffer JM, Pfeffer MA, Fletcher PJ, Braunwald E. Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1991; 260(5):H1406-14.
- Pfeffer M, Pfeffer J, Fishbein M, Fletcher P, Spadaro J, Kloner R, Braunwald E. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res.* 1979; 44(4):503-12.
- Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation.* 1990; 81(4):1161-72.
- Piao H, Youn T, Kwon J, Kim Y, Bae J, Bora-Sohn, Kim D, Cho M, Lee M, Park Y. Effects of bone marrow derived mesenchymal stem cells transplantation in acutely infarcting myocardium. *Eur J Heart Fail.* 2005; 7(5):730-8.
- Pinto V, Cutini G, Sartório C, Paigel A, Vassallo DV, Stefanon I. Enhanced  $\beta$ -adrenergic response in rat papillary muscle by inhibition of inducible nitric oxide synthase after myocardial infarction. *Acta Physiol.* 2007; 190(2):111-17.
- Qi X, Rouleau J. Beta-adrenergic responsiveness of papillary muscles in the rat postinfarction model. *Can J Physiol Pharmacol.* 1996; 74(10):1166-70.
- Qian C, Tio RA, Roks AJM, Boddeus KM, Harmsen MC, van Gilst WH, Schoemaker RG. A promising technique for transplantation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells into rat heart. *Cardiovasc Pathol.* 2007; 16(3):127-35.
- Rangappa S, Fen C, Lee E, Bongso A, Sim E. Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes. *Ann Thorac Surg.* 2003; 75(3):775-9.
- Reffelmann T, Kloner RA. Cellular cardiomyoplasty--cardiomyocytes, skeletal myoblasts, or stem cells for regenerating myocardium and treatment of heart failure? *Cardiovasc Res.* 2003; 58(2):358-68.
- Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, Pell CL, Johnstone BH, Considine RV, March KL. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation.* 2004; 109(10):1292-98.
- Reinecke H, MacDonald G, Hauschka S, Murry C. Electromechanical coupling between skeletal and cardiac muscle. Implications for infarct repair. *J Cell Biol.* 2000; 149(3):731-40.
- Roell W, Lu ZJ, Bloch W, Siedner S, Tiemann K, Xia Y, et al. Cellular cardiomyoplasty improves survival after myocardial injury. *Circulation.* 2002; 105(20):2435-41.

- Rosenzweig A. Cardiac cell therapy -- mixed results from mixed cells. *N Engl J Med.* 2006; 355(12):1274-77.
- Ross J. Afterload mismatch and preload reserve: A conceptual framework for the analysis of ventricular function. *Prog Cardiovasc Dis.* 1976; 18(4):255-64.
- Saito T, Hu F, Tayara L, Fahas L, Shennib H, Giaid A. Inhibition of NOS II prevents cardiac dysfunction in myocardial infarction and congestive heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002; 283(1):H339-45.
- Sallinen P, Mänttari S, Leskinen H, Ilves M, Ruskoaho H, Saarela S. Time course of changes in the expression of DHPR, RyR2, and SERCA2 after myocardial infarction in the rat left ventricle. *Mol Cell Biochem.* 2007; 303(1):97-103.
- Sanbe A, Takeo S. Diminished responsiveness to cardiac  $\beta$ 1-adrenoceptor agonists in rats with chronic heart failure following myocardial infarction. *Biol Pharm Bull.* 1995; 18(10):1362-6.
- Sande JB, Sjaastad I, Hoen IB, Bokenes J, Tonnessen T, Holt E, Lunde PK, Christensen G. Reduced level of serine16 phosphorylated phospholamban in the failing rat myocardium: A major contributor to reduced SERCA2 activity. *Cardiovasc Res.* 2002; 53(2):382-91.
- Šaric T, Frenzel LP, Hescheler J. Immunological barriers to embryonic stem cell-derived therapies. *Cells Tissues Organs.* 2008; 188(1-2):78-90.
- Schmidt U, Hajjar RJ, Kim CS, Lebeche D, Doye AA, Gwathmey JK. Human heart failure: cAMP stimulation of SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity and phosphorylation level of phospholamban. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1999; 277(2):H474-80.
- Schwarz ER, Pollick C, Meehan WP, Kloner RA. Evaluation of cardiac structures and function in small experimental animals: Transthoracic, transesophageal, and intraventricular echocardiography to assess contractile function in rat heart. *Basic Res Cardiol.* 1998; 93(6):477-86.
- Schwinger R, Böhm M, Koch A, Schmidt U, Morano I, Eissner H, Uberfuhr P, Reichart B, Erdmann E. The failing human heart is unable to use the Frank-Starling mechanism. *Circ Res.* 1994; 74(5):959-69.
- Schwinger RHG, Münch G, Bölcck B, Karczewski P, Krause E-G, Erdmann E. Reduced  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitivity of SERCA 2a in failing human myocardium due to reduced serine-16 phospholamban phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol.* 1999; 31(3):479-91.
- Segers VFM, Lee RT. Stem-cell therapy for cardiac disease. *Nature.* 2008; 451(7181):937-42.
- Semb SO, Lunde PK, Holt E, Tønnessen T, Christensen G, Sejersted OM. Reduced myocardial  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -pump capacity in congestive heart failure following myocardial infarction in rats. *J Mol Cell Cardiol.* 1998; 30(7):1311-28.
- Sethi R, Saini H, Wang X, Elimban V, Babick A, Dhalla N. Differential changes in  $\beta$ -adrenoceptor signal transduction in left and right ventricles of infarcted rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2006; 84(7):747-54.

- Shao Q, Ren B, Saini HK, Netticadan T, Takeda N, Dhalla NS. Sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  transport and gene expression in congestive heart failure are modified by imidapril treatment. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005; 288(4):H1674-82.
- Shao Q, Ren B, Zarain-Herzberg A, Ganguly PK, Dhalla NS. Captopril treatment improves the sarcoplasmic reticular  $\text{Ca}^{2+}$  transport in heart failure due to myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 1999; 31(9):1663-72.
- Sjaastad I, Birkeland J, Ferrier G, Howlett S, Skomedal T, Bjørnerheim R, Wasserstrom J, Sejersted O. Defective excitation-contraction coupling in hearts of rats with congestive heart failure. *Acta Physiol Scand*. 2005; 184(1):45-58.
- Sjaastad I, Sejersted OM, Ilebekk A, Bjornerheim R. Echocardiographic criteria for detection of postinfarction congestive heart failure in rats. *J Appl Physiol*. 2000; 89(4):1445-54.
- Smits PC. Myocardial repair with autologous skeletal myoblasts: A review of the clinical studies and problems. *Minerva Cardioangiol*. 2004; 52(6):525-35.
- Soares MBP, Lima RS, Rocha LL, Takyia CM, Pontes-de-Carvalho L, Campos de Carvalho AC, Ribeiro-dos-Santos R. Transplanted bone marrow cells repair heart tissue and reduce myocarditis in chronic chagasic mice. *Am J Pathol*. 2004; 164(2):441-47.
- Solomon S, Greaves S, Rayan M, Finn P, Pfeffer M, Pfeffer J. Temporal dissociation of left ventricular function and remodeling following experimental myocardial infarction in rats. *J Card Fail*. 1999; 5(3):213-23.
- Spadaro J, Fishbein M, Hare C, Pfeffer M, Maroko P. Characterization of myocardial infarcts in the rat. *Arch Pathol Lab Med*. 1980; 104(4):179-83.
- Spinale FG. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: Influence on cardiac form and function. *Physiol. Rev*. 2007; 87(4):1285-342.
- Stefanon I, Martins M, Vassallo D, Mill J. Analysis of right and left ventricular performance of the rat heart with chronic myocardial infarction. *Braz J Med Biol Res*. 1994; 27(11):2667-779.
- Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G, Wernet P. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation*. 2002; 106(15):1913-18.
- Sun Y-L, Hu S-J, Wang L-H, Hu Y, Zhou J-Y. Effect of  $\beta$ -blockers on cardiac function and calcium handling protein in postinfarction heart failure rats. *Chest*. 2005; 128(3):1812-21.
- Sun Y, Zhang JQ, Zhang J, Lamparter S. Cardiac remodeling by fibrous tissue after infarction in rats. *J Lab Clin Med*. 2000; 135(4):316-23.
- Swift F, Birkeland JAK, Tovsrud N, Enger UH, Aronsen JM, Louch WE, Sjaastad I, Sejersted OM. Altered  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger activity due to downregulation of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase  $\alpha 2$ -isoform in heart failure. *Cardiovasc Res*. 2008; 78(1):71-78.
- Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol. Rev*. 1999; 79(1):215-62.



- Takahashi M, Li T-S, Suzuki R, Kobayashi T, Ito H, Ikeda Y, Matsuzaki M, Hamano K. Cytokines produced by bone marrow cells can contribute to functional improvement of the infarcted heart by protecting cardiomyocytes from ischemic injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006; 291(2):H886-93.
- Tang J, Xie Q, Pan G, Wang J, Wang M. Mesenchymal stem cells participate in angiogenesis and improve heart function in rat model of myocardial ischemia with reperfusion. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2006; 30(2):353-61.
- Tang YL, Zhao Q, Qin X, Shen L, Cheng L, Ge J, Phillips MI. Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction. *Ann Thorac Surg*. 2005; 80(1):229-37.
- Tang YL, Zhao Q, Zhang YC, Cheng L, Liu M, Shi J, Yang YZ, Pan C, Ge J, Phillips MI. Autologous mesenchymal stem cell transplantation induce VEGF and neovascularization in ischemic myocardium. *Regul Pept*. 2004; 117(1):3-10.
- Taylor D, Atkins BZ, Hungspreugs P, Jones T, Reedy M, Hutcheson K, Glower D, Kraus W. Regenerating functional myocardium: Improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med*. 1998; 4(8):929-33.
- Templin C, Kotlarz D, Marquart F, Faulhaber J, Bredecke V, Schaefer A, *et al*. Transcoronary delivery of bone marrow cells to the infarcted murine myocardium. *Basic Res Cardiol*. 2006; 101(4):301-10.
- Thai HM, Van HT, Gaballa MA, Goldman S, Raya TE. Effects of AT1 receptor blockade after myocardial infarct on myocardial fibrosis, stiffness, and contractility. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1999; 276(3):H873-80.
- Tomita S, Li R-K, Weisel RD, Mickle DAG, Kim E-J, Sakai T, Jia Z-Q. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation*. 1999; 100(19 Suppl):II-247-56.
- Uemura R, Xu M, Ahmad N, Ashraf M. Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodeling of ischemic heart through paracrine signaling. *Circ Res*. 2006; 98(11):1414-21.
- Urbanek K, Torella D, Sheikh F, De Angelis A, Nurzynska D, Silvestri F, *et al*. Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(24):8692-97.
- Van Kerckhoven R, Kalkman EAJ, Saxena PR, Schoemaker RG. Altered cardiac collagen and associated changes in diastolic function of infarcted rat hearts. *Cardiovasc Res*. 2000; 46(2):316-23.
- Vandervelde S, van Luyn MJA, Tio RA, Harmsen MC. Signaling factors in stem cell-mediated repair of infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 2005; 39(2):363-76.
- Vassallo D, Lima E, Campagnaro P, Stefanon I, Leite C, Mill J. Effects of isoproterenol on the mechanical activity of isolated papillary muscles and perfused rat hearts in various calcium concentrations. *Pharmacol Res*. 1994; 29(3):251-60.

- Vilas-Boas F, Feitosa GS, Soares MBP, Pinho-Filho JA, Mota A, Almeida AJG, Carvalho C, Carvalho HGd, Oliveira ADd, Santos RRd. Transplante de células de medula óssea para o miocárdio em paciente com insuficiência cardíaca secundária á doença de chagas. *Arq Bras Cardiol.* 2004; 82:181-84.
- Wagner KD, Theres H, Born A, Strube S, Wunderlich N, Pfitzer G, Baumann G, Günther J. Contractile function of papillary muscle from rats with different infarct size after beta-adrenergic blockade and ace-inhibition. *J Mol Cell Cardiol.* 1997; 29(11):2941-51.
- Wang J-S, Shum-Tim D, Chedrawy E, Chiu RCJ. The coronary delivery of marrow stromal cells for myocardial regeneration: Pathophysiologic and therapeutic implications. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2001; 122(4):699-705.
- Wasserstrom JA, Holt E, Sjaastad I, Lunde PK, Odegaard A, Sejersted OM. Altered E-C coupling in rat ventricular myocytes from failing hearts 6 wk after MI. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000; 279(2):H798-807.
- Weisman HF, Healy B. Myocardial infarct expansion, infarct extension, and reinfarction: Pathophysiologic concepts. *Prog Cardiovasc Dis.* 1987; 30(2):73-110.
- Widén C, Barclay CJ. Resting metabolism of mouse papillary muscle. *Pflugers Arch, Eur J Physiol.* 2005; 450(4):209-16.
- Wisløff U, Loennechen JP, Currie S, Smith GL, Ellingsen O. Aerobic exercise reduces cardiomyocyte hypertrophy and increases contractility, Ca<sup>2+</sup> sensitivity and serca-2 in rat after myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2002; 54(1):162-74.
- Wollert K, Drexler H. Cell-based therapy for heart failure. *Curr Opin Cardiol.* 2006; 21(3):234-9.
- Wollert KC. Cell therapy for acute myocardial infarction. *Curr Opin Pharmacol.* 2008; 8(2):202-10.
- Wu Y, Cazorla O, Labeit D, Labeit S, Granzier H. Changes in titin and collagen underlie diastolic stiffness diversity of cardiac muscle. *J Mol Cell Cardiol.* 2000; 32(12):2151-62.
- Xie Z, Gao M, Batra S, Koyama T. The capillarity of left ventricular tissue of rats subjected to coronary artery occlusion. *Cardiovasc Res.* 1997; 33(3):671-76.
- Xu M, Uemura R, Dai Y, Wang Y, Pasha Z, Ashraf M. In vitro and in vivo effects of bone marrow stem cells on cardiac structure and function. *J Mol Cell Cardiol.* 2007; 42(2):441-48.
- Xu X, Xu Z, Xu Y, Cui G. Selective down-regulation of extracellular matrix gene expression by bone marrow derived stem cell transplantation into infarcted myocardium. *Cir J.* 2005; 69(10):1275-83.
- Yagi N, Okuyama H, Toyota H, Araki J, Shimizu J, Iribe G, *et al.* Sarcomere-length dependence of lattice volume and radial mass transfer of myosin cross-bridges in rat papillary muscle. *Pflugers Arch, Eur J Physiol.* 2004; 448(2):153-60.
- Yamada Y, Wang X-D, Yokoyama S-i, Fukuda N, Takakura N. Cardiac progenitor cells in brown adipose tissue repaired damaged myocardium. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 342(2):662-70.

- Yamaguchi F, Sanbe A, Takeo S. Cardiac sarcoplasmic reticular function in rats with chronic heart failure following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 1997; 29(2):753-63.
- Yokokura Y, Hayashida N, Okazaki T, Nakamura E, Tayama E, Akashi H, Aoyagi S. Influence of angiogenesis by implantation of bone marrow mononuclear cells in the rat ischemic heart. *Kurume Med J.* 2008; 54(3/4):77-84.
- Yoshiyama M, Takeuchi K, Hanatani A, Kim S, Omura T, Toda I, Teragaki M, Akioka K, Iwao H, Yoshikawa J. Differences in expression of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase and  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchanger genes between adjacent and remote noninfarcted myocardium after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 1997; 29(1):255-64.
- Zeng L, Hu Q, Wang X, Mansoor A, Lee J, Feygin J, *et al.* Bioenergetic and functional consequences of bone marrow-derived multipotent progenitor cell transplantation in hearts with postinfarction left ventricular remodeling. *Circulation.* 2007; 115(14):1866-75.
- Zhang H, Song P, Tang Y, Zhang X-l, Zhao S-h, Wei Y-j, Hu S-s. Injection of bone marrow mesenchymal stem cells in the borderline area of infarcted myocardium: Heart status and cell distribution. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2007; 134(5):1234-40.
- Zhang N, Li J, Luo R, Jiang J, Wang JA. Bone marrow mesenchymal stem cells induce angiogenesis and attenuate the remodeling of diabetic cardiomyopathy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2008a; 2:104-11.
- Zhang S, Guo J, Zhang P, Liu Y, Jia Z, Ma K, Li W, Li L, Zhou C. Long-term effects of bone marrow mononuclear cell transplantation on left ventricular function and remodeling in rats. *Life Sci.* 2004a; 74(23):2853-64.
- Zhang S, Zhang P, Guo J, Jia Z, Ma K, Liu Y, Zhou C, Li L. Enhanced cytoprotection and angiogenesis by bone marrow cell transplantation may contribute to improved ischemic myocardial function. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2004b; 25(2):188-95.
- Zhang X-Q, Ng Y-C, Moore RL, Musch TI, Cheung JY. In situ SR function in postinfarction myocytes. *J Appl Physiol.* 1999; 87(6):2143-50.
- Zhang X, Wei M, Zhu W, Han B. Combined transplantation of endothelial progenitor cells and mesenchymal stem cells into a rat model of isoproterenol-induced myocardial injury. *Arch Cardiovasc Dis.* 2008b; 101(5):333-42.
- Zhang XQ, Tillotson DL, Moore RL, Zelis R, Cheung JY.  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$  exchange currents and SR  $\text{Ca}^{2+}$  contents in postinfarction myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 1996; 271(6):C1800-07.
- Zhu YZ, Chong CL, Chuah SC, Huang SH, Nai HS, Tong HT, Whiteman M, Moore PK. Cardioprotective effects of nitroparacetamol and paracetamol in acute phase of myocardial infarction in experimental rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006; 290(2):H517-24.
- Ziegelhöffner A, Kjeldsen K, Bundgaard H, Breier A, Vrbjar N, Dzurba A. Na,K-ATPase in the myocardium: Molecular principles, functional and clinical aspects. *Gen Physiol Biophys.* 2000; 19(1):9-47.

- Zimmerman SD, Thomas DP, Velleman SG, Li X, Hansen TR, McCormick RJ. Time course of collagen and decorin changes in rat cardiac and skeletal muscle post-MI. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001; 281(4):H1816-22.
- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13(12):4279-95.



## Anexo 1

### Acurácia da determinação do tamanho do IM pelo ECO

A oclusão coronariana tem sido freqüentemente usada com modelo experimental de produção de infarto do miocárdio e cursa com considerável variação na extensão da necrose miocárdica (Johns & Olson, 1954; Fishbein *et al.*, 1978; Spadaro *et al.*, 1980). Sendo o tamanho do infarto um fator determinante da intensidade do remodelamento e disfunção cardíacos (Pfeffer *et al.*, 1979; Fletcher *et al.*, 1981), sua correta quantificação é crítica nos estudos de fisiopatologia cardiovascular. Sabe-se que o exame ecocardiográfico (ECO) é um método satisfatoriamente eficaz na predição da extensão do infarto do miocárdio em ratos após a fase de cicatrização (Cury *et al.*, 2005; Nozawa *et al.*, 2006). Todavia, não existia dados na literatura a respeito da acurácia do ECO na avaliação do tamanho do infarto nas fases mais precoces, como a que precisaríamos para realização do presente estudo. Dessa forma, este experimento preliminar foi desenhado para testar a segurança nas medidas do tamanho do infarto adquiridas pelo ECO quando comparadas às medidas obtidas pela coloração histoquímica com cloreto de trifeniltetrazólio (TTC), bem estabelecida como metodologia confiável na mensuração da necrose miocárdica na fase aguda (Fishbein *et al.*, 1981).

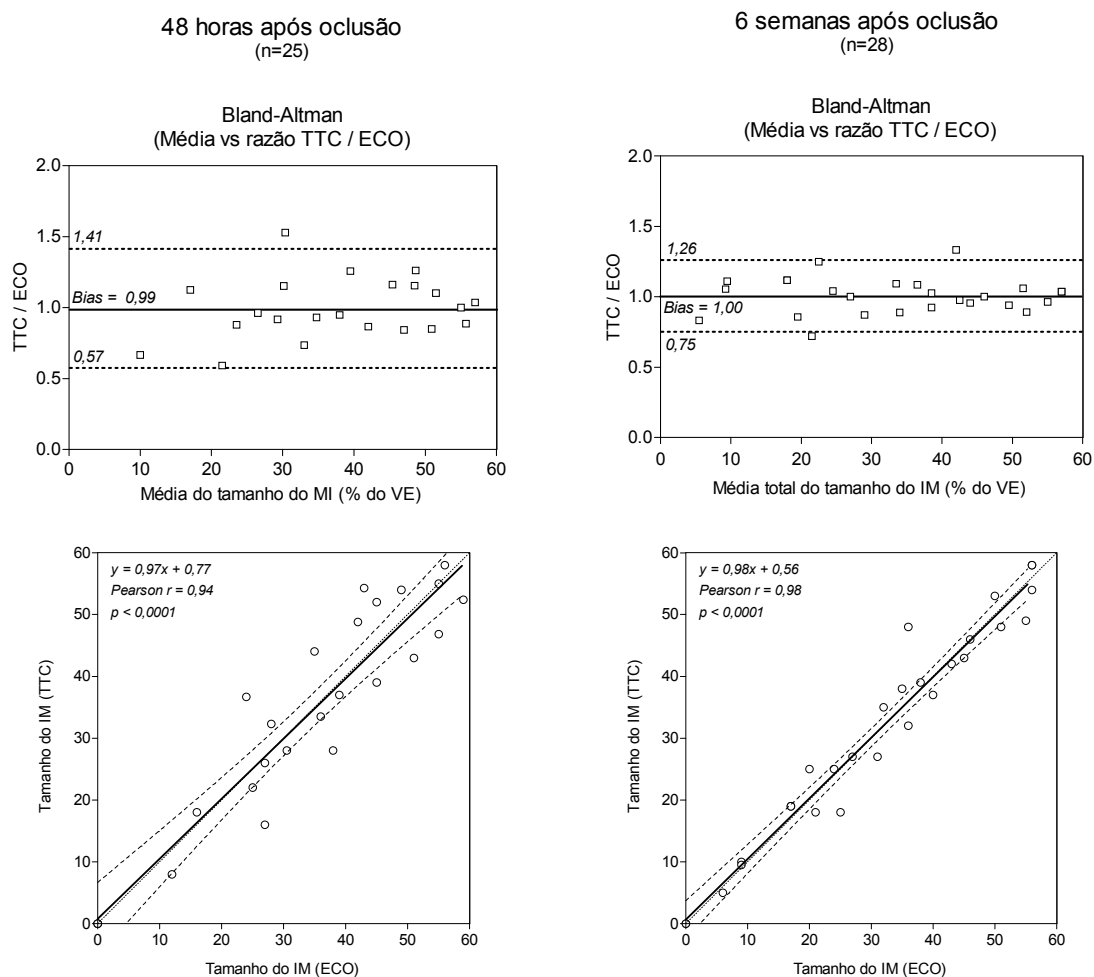
A análise do tamanho do infarto pelo ECO foi realizada de acordo com o já descrito neste manuscrito, avaliando as medidas das regiões acinética e/ou hipocinéticas da parede do VE. Pelo TTC, foi medida a porção não corada pelo composto químico, formada de tecido necrosado. Após avaliação pelo ECO, os animais foram sacrificados e os corações foram retirados, lavados em solução salina e seccionados transversalmente em três fatias de aproximadamente 3 mm de espessura, e incubados em solução de cloreto de trifeniltetrazólio (1%) tamponada ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,1 M e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1 M) em pH 7,4 e temperatura de 37° C por 20 minutos. Em seguida o tecido foi incubado em formaldeído (15%) por 20 minutos, solução de peróxido de hidrogênio (30% v/v) por 30 minutos, e novamente em formaldeído por mais 24 horas. Após esse procedimento, as fatias dos corações

foram fotografadas e digitalmente analisadas com auxílio de software (Image Tool for Windows 3.0, San Antonio, Texas, USA). Todas as medidas foram realizadas considerando a relação percentual entre o comprimento da cicatriz miocárdica (TTC) ou porção acinética (ECO) e a circunferência do ventrículo esquerdo pelo plano transversal, calculando-se a média das medidas dos três planos transversais do coração. São apresentadas neste Anexo 1, as comparações entre as metodologias realizadas em dois momentos: 48 horas após oclusão coronariana e seis semanas após oclusão coronariana.

A avaliação pelo ECO dos 25 animais sobreviventes apontou tamanhos do IM variando entre 0 e 59% do ventrículo esquerdo, com média de 32,3% do VE e desvio padrão da média em 18,3%. A avaliação pelo TTC evidenciou tamanhos de IM entre 0 e 58% do VE, com média de 32,5% do VE e desvio padrão de 18,4%. A análise estatística pelo teste de Bland-Altman (vide figura seguinte) mostrou concordância bastante satisfatória entre estes métodos avaliados após as 48 horas de oclusão coronariana. A média da razão entre as medidas do ECO/TTC foi muito próxima a unidade (0,99) com estreito desvio das medidas (95% do intervalo de confiança entre 0,57 e 1,41). A correlação estabelecida entre as medidas obtidas pelos dois métodos foi estatisticamente significativa e positiva, com expressivo coeficiente de correlação ( $r = 0,94$  pelo teste de Pearson) e de determinação ( $r^2 = 0,88$ ). Ademais, o coeficiente de inclinação da reta formada nesta correlação também foi muito próximo a unidade ( $0,97 \pm 0,07$ ) sugerindo significativa semelhança entre as medidas comparadas por esses dois métodos neste momento.

As mesmas comparações foram realizadas em outras 28 ratas depois de decorridas seis semanas da oclusão coronariana, para confirmar dados prévios de nosso laboratório a respeito da confiança nas avaliações feitas pelo ECO após o período de cicatrização do infarto do miocárdio. O tamanho do IM avaliado pelo ECO variou entre 0 e 56% do VE com média  $\pm$  desvio padrão de  $31,7 \pm 17,6\%$  do VE, semelhante ao averiguado pelo TTC que variou entre 0 e 58% do VE com média  $\pm$  desvio padrão de  $31,9 \pm 17,8\%$  do VE. Como também já esperado, a análise da concordância entre os métodos, avaliada pelo teste de Bland-Altman (vide figura seguinte) demonstrou viés médio de  $1,00 \pm 0,12$  (pela razão TTC / ECO) quase que com identidade absoluta entre os dois métodos utilizados e com mínimos desvios (95% do IC da razão TTC / ECO = 0,75 a 1,26). Da mesma maneira, a correlação estabelecida entre as medidas apontaram para uma relação linear quase

perfeita ( $r = 0,98$  pelo teste de Pearson, coeficiente de inclinação =  $0,98$ ;  $p < 0,0001$ ) quando avaliados neste momento.



Análise da concordância entre as estimativas do tamanho do infarto realizadas pelo ECO e pela coloração histoquímica com TTC na fase aguda (48 horas) e crônica (seis semanas) após oclusão coronariana. Os gráficos superiores ilustram o teste de Bland-Altman com a dispersão entre a medida dos dois métodos.

Portanto, este estudo preliminar aprovou a avaliação ecocardiográfica como preditivo do tamanho do infarto do miocárdio nos dois momentos utilizados no estudo, permitindo seguras conclusões a respeito da extensão da necrose miocárdica na vigência da terapia celular. Como já mencionado, parte dos resultados desse estudo preliminar deram origem a uma publicação em periódico internacional (dos Santos, 2008).





## Anexo 2

### Sobrecarga súbita de pressão na identificação de performance deprimida

Ao se estudar a progressão da disfunção do VE após o infarto, parece consenso que em 30 dias evidenciam-se sinais de disfunção cardíaca em ratos portadores de grandes infartos (Pfeffer *et al.*, 1979; Fletcher *et al.*, 1981; Anand *et al.*, 1997). Entretanto, mesmo no período pós-cicatrização, os parâmetros hemodinâmicos dos animais podem estar normais ou muito próximos à normalidade quando avaliados sob condições basais (Pfeffer *et al.*, 1979), dificultando a identificação ou a caracterização da disfunção contrátil ventricular.

Dessa forma, tornou-se também nosso interesse, encontrar um método capaz de evidenciar o prejuízo no desempenho ventricular nestes casos. Dito isso, objetivamos avaliar especificamente o efeito da sobrecarga pressórica súbita sobre os parâmetros hemodinâmicos de ratos com infarto do miocárdio e função sistólica basal normal.

Neste estudo, os animais foram submetidos à oclusão permanente da artéria coronária. Após 30 dias, os animais de variados tamanhos de IM foram agrupados conforme se segue: menores que 20% do VE (n = 5; tamanho do IM =  $11,2 \pm 1,7\%$  do VE), entre 20 e 29% do VE (n = 6; tamanho =  $23,7 \pm 1,4\%$  do VE), entre 30 e 39% do VE (n = 7; tamanho =  $36,3 \pm 0,9\%$  do VE) e maiores ou iguais a 40% do VE (n = 10; tamanho =  $47,9 \pm 1,7\%$  do VE). A subdivisão possibilitou estudar a função hemodinâmica sob condições basais e durante sobrecarga súbita de pressão nas diversas condições de disfunção cardíaca comparadas ao grupo sham-operados (Controle, n = 8). O aumento súbito da pós-carga foi promovido pela administração *in bolus* de fenilefrina para elevar a pressão arterial em aproximadamente 70% da condição basal.

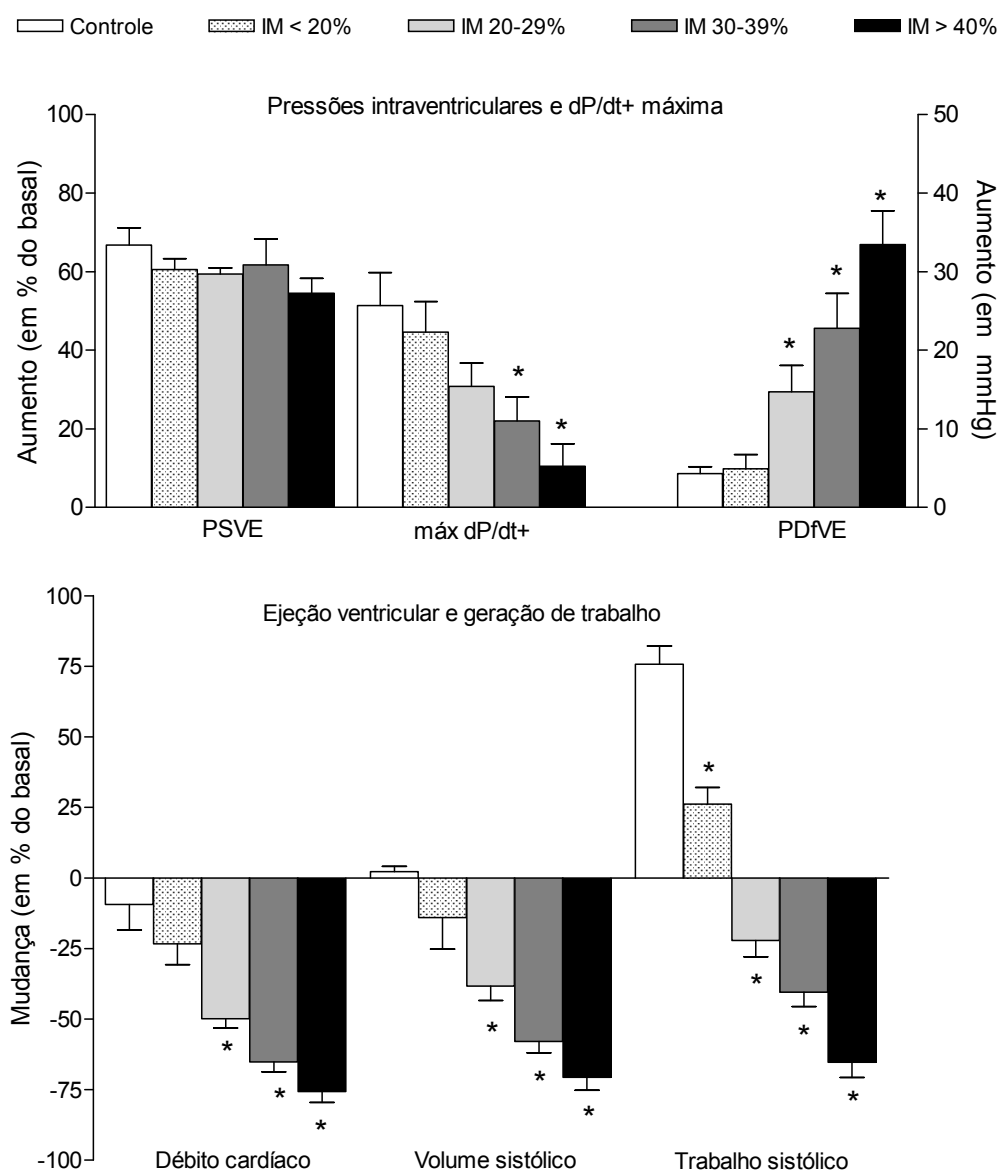
No estudo hemodinâmico sob anestesia e condições basais (vide tabela seguinte), os parâmetros avaliados não foram muito diferentes entre os grupos, exceção dada à elevada pressão diastólica final do VE e à depressão da derivada positiva máxima de pressão do VE no grupo com grandes infartos (maiores que 40% do VE) quando comparados ao controle. Ademais, nenhuma diferença estatística foi identificada nos parâmetros de ejeção ventricular e trabalho cardíaco entre os grupos.

**Tabela – Biometria e avaliação morfo-funcional pelo ECO e hemodinâmica**

	Controle	IM < 20%	IM 20-29%	IM 30-39%	IM > 40%
<b>Biometria</b>					
Massa corpórea (g)	232 ± 4	240 ± 4	234 ± 6	241 ± 8	235 ± 4
VE/corp.(mg/g)	2,29 ± 0,07	2,36 ± 0,08	2,49 ± 0,04	<b>2,67 ± 0,11*</b>	<b>2,76 ± 0,07*</b>
VD/corp.(mg/g)	0,67 ± 0,01	0,67 ± 0,01	0,75 ± 0,05	0,85 ± 0,08	<b>1,27 ± 0,10*</b>
% H <sub>2</sub> O no pulmão	79,36 ± 0,28	79,35 ± 0,39	79,68 ± 0,24	80,75 ± 0,58	<b>81,29 ± 0,52*</b>
<b>ECO Doppler</b>					
DdVE (mm)	6,52 ± 0,10	6,70 ± 0,17	7,50 ± 0,32	8,57 ± 0,40	8,85 ± 0,28*
DsVE (mm)	3,63 ± 0,18	4,06 ± 0,33	5,33 ± 0,60	7,14 ± 0,59*	7,87 ± 0,28*
FEM (%)	46,0 ± 1,5	46,7 ± 3,8	36,6 ± 4,2	18,3 ± 4,1	12,8 ± 2,1*
Incidência de HP	0/7 (0%)	0/4 (0%)	0/6 (0%)	3/7 (42%)	7/11 (63%) *
Razão E/A	1,84 ± 0,82	2,10 ± 0,39	2,89 ± 0,32	3,86 ± 0,95	5,58 ± 0,80*
<b>Hemodinâmica</b>					
PSVE (mm Hg)	127,1 ± 3,4	124,1 ± 6,8	127,8 ± 4,9	123,1 ± 3,1	113,7 ± 3,1
PDfVE (mm Hg)	3,55 ± 0,46	3,36 ± 0,90	3,19 ± 0,79	6,23 ± 0,95	<b>12,56 ± 2,29*</b>
FC (bpm)	342 ± 17	356 ± 26	334 ± 22	333 ± 10	301 ± 18
+dP/dt <sub>máx</sub> (mm Hg/s)	9854 ± 403	9396 ± 667	9090 ± 684	8405 ± 627	<b>6871 ± 420*</b>
-dP/dt <sub>máx</sub> (mm Hg/s)	-5924 ± 541	-6548 ± 255	-6485 ± 301	-6273 ± 458	-4767 ± 347
IC (ml.kg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	239 ± 18	233 ± 33	213 ± 27	217 ± 27	193 ± 20
IVSE (ml.kg <sup>-1</sup> )	0,677 ± 0,042	0,661 ± 0,053	0,703 ± 0,042	0,688 ± 0,076	0,589 ± 0,041
ITS (g.m.kg <sup>-1</sup> )	1,091 ± 0,082	1,103 ± 0,125	1,017 ± 0,094	1,074 ± 0,102	0,848 ± 0,069

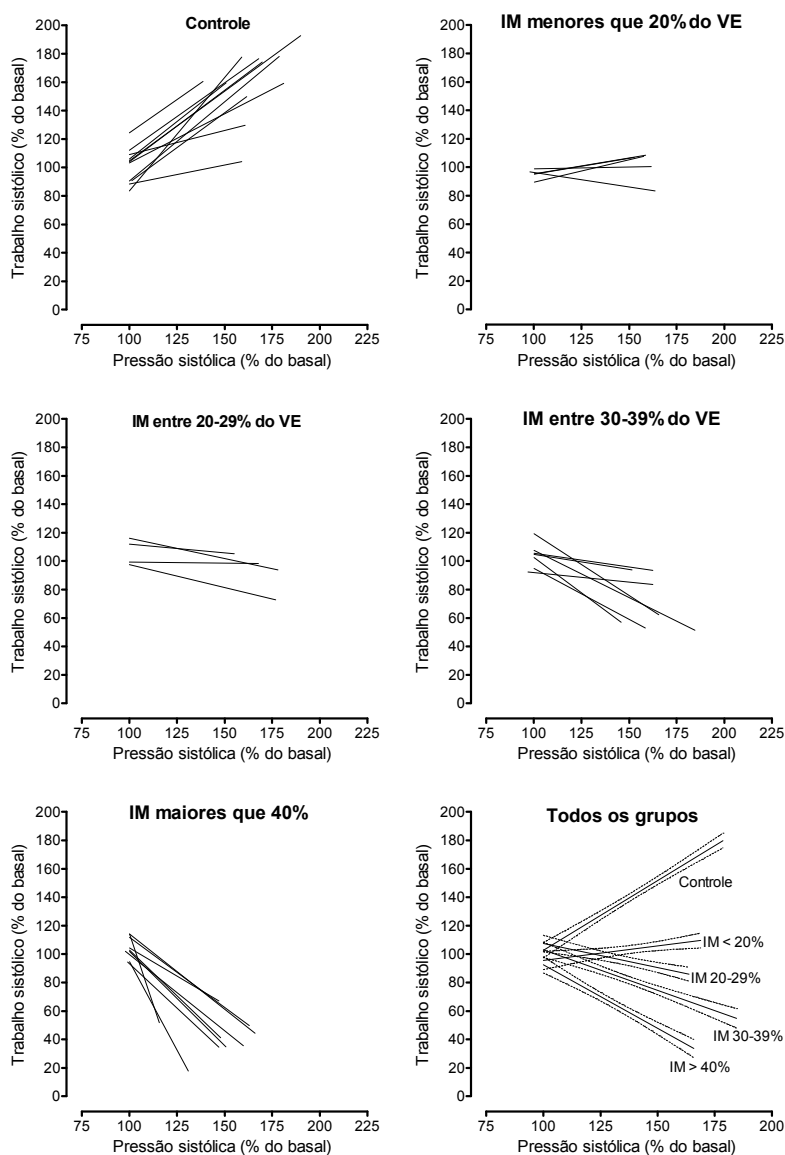
Média ± e.p.m. dos parâmetros cardiovasculares morfológicos e funcionais. \*p < 0,05 vs. SHAM. ANOVA 1-via seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni.

A administração de fenilefrina para promover o aumento da pressão arterial foi acompanhada de elevação na  $+dP/dt_{m\acute{a}x}$ , pequeno aumento na PDf, e pequena queda no DC e VSE apenas nos ratos controles e com IM menores que 20% do VE como representado na figura seguinte, com o grupo Controle cursando com considerável aumento na geração de trabalho. Todavia, todos os grupos com IM maiores que 20% do VE apresentaram menor aumento na  $+dP/dt_{m\acute{a}x}$ , grande aumento da PDf, e importante queda no DC, VSE e TS, de forma proporcional ao IM.



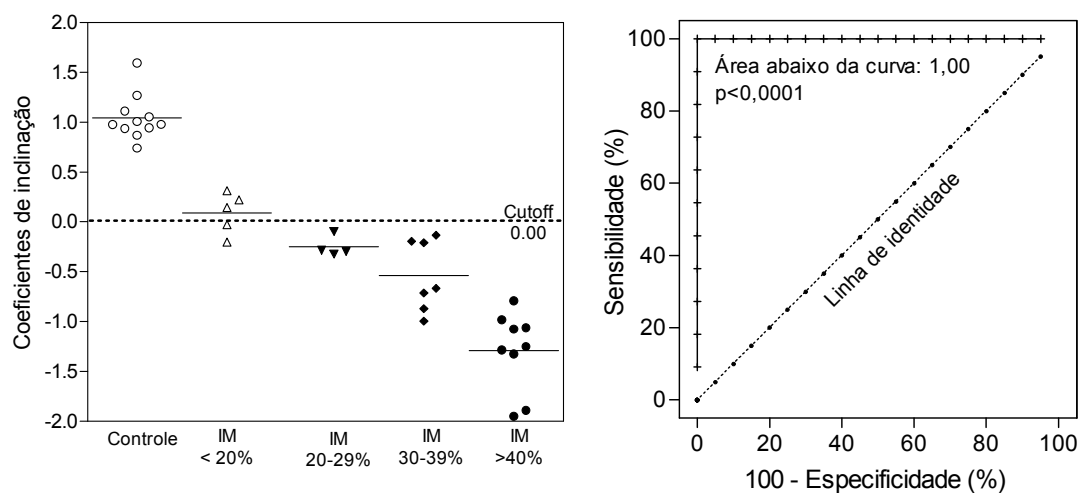
Média  $\pm$  e.p.m. das alterações (% em relação ao basal) nos parâmetros hemodinâmicos promovidas por sobrecarga pressórica. Os valores positivos e negativos resultam do aumento ou diminuição respectivamente. \* $p < 0,05$  vs. SHAM. ANOVA 1-via seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni.

Analisando mais criteriosamente este teste hemodinâmico, puderam ser estabelecidas relações entre o aumento na pós-carga e as mudanças na geração de trabalho sistólico adquirida ciclo a ciclo durante a rampa de subida da pressão (vide figura seguinte). Estas correlações foram positivas nos ratos controles ( $r = 0,90$ ; coeficiente de inclinação =  $1,01 \pm 0,04$ ) e não foram significantes no grupo com IM menores que 20% do VE ( $r = 0,30$ ; inclinação =  $0,10 \pm 0,08$ ), mas foram significativamente negativas em todos os demais animais infartados: 20-29% do VE ( $r = -0,50$ ; inclinação =  $-0,25 \pm 0,07$ ), 30-39% do VE ( $r = -0,60$ ; inclinação =  $-0,54 \pm 0,08$ ) e  $> 40\%$  do VE ( $r = -0,75$ ; inclinação =  $-0,99 \pm 0,12$ ).



Relação entre sobrecarga pressórica e variação no trabalho sistólico (% do basal).

A análise das curvas ROC (na figura abaixo) demonstrou sensibilidade e especificidade de 100% no uso da inclinação das correlações estudadas na distinção entre os animais saudáveis daqueles com disfunção ventricular. Dessa forma, este teste se mostrou prático e eficiente em identificar depressões do desempenho cardíaco, mesmo quando os parâmetros hemodinâmicos são aparentemente normais, sendo, então, protocolado no estudo da terapia celular.



Distribuição dos valores do coeficiente angular dos grupos (direita). Somente IM < 20% teve algumas retas com inclinação positiva. À esquerda, curva ROC de especificidade e sensibilidade dos coeficientes angulares na discriminação entre os SHAM e qualquer IM.

# 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](#)