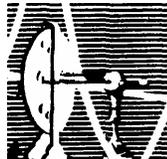


**LUIZA DE LIMA E SILVA BAGNO**

**ESTUDO DA FUNÇÃO CARDÍACA NO  
TRANSPLANTE DE CÉLULAS PROGENITORAS  
DE TECIDO ADIPOSEO EM  
RATOS COM INFARTO CICATRIZADO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO  
GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (FISIOLOGIA)



**Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências da Saúde  
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho  
2009**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

Luiza de Lima e Silva Bagno

ESTUDO DA FUNÇÃO CARDÍACA NO TRANSPLANTE DE CÉLULAS  
PROGENITORAS DE TECIDO ADIPOSEO EM  
RATOS COM INFARTO CICATRIZADO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências biológicas (Fisiologia)

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Campos de Carvalho  
2º orientador (a): Prof. Dra. Regina Coeli dos Santos Goldenberg

Rio de Janeiro  
2009

## FICHA CATALOGRÁFICA

**Bagno**, Luiza de Lima e Silva.

**Estudo da função cardíaca no transplante de células progenitoras de tecido adiposo em ratos com infarto cicatrizado. Rio de Janeiro, 2009.**

133 fls.

Dissertação (Mestrado em Fisiologia Cardíaca) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho do Centro de Ciências da Saúde, 2009.

Orientador: Antonio Carlos Campos de Carvalho

1. Infarto do miocárdio; 2. ADSC; 3. Células-tronco; 4. Função cardíaca – Teses I. Campos-de-Carvalho, Antônio Carlos (orient.) e Goldenberg, Regina Coeli dos Santos (co-orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho do Centro de Ciências da Saúde. III. Estudo da função cardíaca no transplante de células progenitoras de tecido adiposo em ratos com infarto cicatrizado.

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

Luiza de Lima e Silva Bagno

### **Estudo da função cardíaca no transplante de células progenitoras de tecido adiposo em ratos com infarto cicatrizado**

Rio de Janeiro, 18 de fevereiro de 2009

---

#### **Prof. Dr. Antônio Carlos Campos de Carvalho – Orientador**

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

---

#### **Prof. Dra. Regina Coeli dos Santos Goldenberg – 2º Orientador**

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

---

#### **Prof. Dr. Roberto Coury Pedrosa – Membro da banca examinadora**

Hospital Universitário Clementino Fraga Filho  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

#### **Prof. Dra. Denise Pires de Carvalho – Membro da banca examinadora**

Laboratório de Fisiologia Endócrina Dóris Rosenthal do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho  
Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

#### **Prof. Dra. Rosalia Mendez-Otero – Membro da banca examinadora**

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

---

#### **Prof. Dra. Vânia Maria Corrêa da Costa – Revisora / Suplente interna**

Laboratório de Fisiologia Endócrina Dóris Rosenthal do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho  
Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

#### **Prof. Dra. Nazareth de Novaes Rocha – Suplente externa**

Centro de Ciências Médicas da Universidade Federal Fluminense

## RESUMO

Bagno, LLS. **Estudo da função cardíaca no transplante de células progenitoras de tecido adiposo em ratos com infarto cicatrizado**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Fisiologia) – IBCCF-UFRJ, Rio de Janeiro, 2009.

Estudos recentes identificaram o tecido adiposo como nova fonte de células-tronco mesenquimais para a terapia celular. A proposta deste estudo foi investigar a terapia com células progenitoras derivadas de tecido adiposo do rato (ADSC) no modelo de infarto do miocárdio cicatrizado (IM). Células do tecido adiposo inguinal subcutâneo de ratos Wistar machos foram isoladas por digestão enzimática (Colagenase tipo II), filtradas em membrana de 80µm, centrifugadas e cultivadas até a 3ª passagem. Quatro semanas após a ligadura da artéria coronária esquerda de ratas fêmeas, foi injetada, ao longo da borda da cicatriz do infarto na parede do ventrículo esquerdo, 100µl de PBS + Matrigel +  $2 \times 10^6$  ADSC coradas com Hoechst (N=11) ou 100µl de PBS + Matrigel (N=10). O grupo falso operado (FO / N=5) foi submetido aos mesmos procedimentos cirúrgicos exceto pela ligadura da artéria. O desempenho cardíaco foi acessado por ecocardiografia 28 dias depois do procedimento de ligadura permanente da artéria coronária esquerda (linha de base-LB), quatro e seis semanas pós transplante (PT) e por hemodinâmica 6 semanas após a injeção. Os valores do ecocardiograma após o tratamento foram normalizados pelos valores obtidos antes do tratamento. Todos os dados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. Para comparações entre dois grupos ou entre o mesmo grupo em dois tempos diferentes, foi utilizado o *test t*, enquanto que para comparações entre mais de dois grupos ao longo do tempo foi empregado análise de variância bivariada (ANOVA). O nível de significância considerado foi menor do que 5% ( $p < 0,05$ ). Todos os animais submetidos ao infarto apresentaram comprometimento da função cardíaca, i.e. fração de encurtamento de área (FEA) abaixo de 40%, e percentual de acinesia do ventrículo esquerdo (%IM) acima de 40%. Antes do

tratamento, não houve diferença entre os grupos infartados na fração de ejeção (FE%: grupo ADSC =  $47,1 \pm 3,23$ ; grupo CONTROLE =  $42,8 \pm 2,45$ ; SEM). O grupo ADSC apresentou valores de FE normalizados maiores em relação ao CONTROLE ( $1,064 \pm 0,05$  vs  $0,8507 \pm 0,12$ ;  $p=0,0499$ ; SEM), respectivamente, 6 semanas após a terapia. Em relação aos parâmetros hemodinâmicos, a  $dP/dT^+$  do grupo ADSC foi maior comparada com o grupo CONTROLE ( $p < 0,05$ ) 6 semanas após a terapia, indicando um maior índice de contratilidade cardíaca. Com estes dados, foi possível concluir que as células progenitoras de tecido adiposo (ADSC), administradas por via intramiocárdica, promoveram melhora na função cardíaca e preveniram o remodelamento cardíaco.

## ABSTRACT

Bagno, LLS. **Study of cardiac function in transplantation of adipose derived stromal cells in a rat healed myocardial infarction.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Fisiologia) – IBCCF-UFRJ, Rio de Janeiro, 2009.

Recent studies have identified adipose tissue as a new source of mesenchymal stem cells for cell-therapy. The purpose of this study was to investigate the therapy with rat adipose derived stromal cells (ADSC) in a rat model of healed myocardial infarction (MI). Inguinal subcutaneous adipose tissue of male inbred Wistar rats was isolated by enzymatic digestion (type II Collagenase), filtration through 80 $\mu$ m filters, centrifugation and culture until passage 3. Four weeks after ligation of left coronary artery of female rats, a suspension of either 100 $\mu$ l with PBS + Matrigel + 2 x 10<sup>6</sup> ADSC labeled with Hoechst (N=11) or 100 $\mu$ l of PBS + Matrigel (N=10) was injected along the borders of the ventricular wall scar tissue. Sham operated group (Sham/N=5) was submitted to the same surgical procedures excepted permanent ligation of left coronary artery. Cardiac performance was assessed by echocardiogram recordings prior to injections (baseline-BL), and four and six weeks after injections (follow-up - FU). Hemodynamic measurements were performed 6 weeks after injections. The echocardiogram values after treatment were normalized by values obtained before treatment. All data are expressed as mean values  $\pm$  SEM. Student's paired or unpaired T test was used to compare the same group in two different times or two distinct groups, while ANOVA two way was used to compare more than two groups along different times. Significance was considered lesser than 5% and was set at  $p < 0,05$ . All infarcted animals exhibited cardiac function impairment, i.e. shortening fraction area (SFA) below 40% and had over 40% of left ventricle akinesis (MI%). No difference was demonstrated in ejection fraction (EF%) between infarcted groups before treatment (EF%: ADSC group = 47,1 $\pm$ 3,23; CONTROL group = 42,8 $\pm$ 2,45; SEM). Six weeks after therapy, ADSC group

showed higher EF normalized values when compared with CONTROL group ( $1,064 \pm 0,05$  vs  $0,8507 \pm 0,12$ ;  $p=0,0499$ ; SEM), respectively. With regard to hemodynamic parameters, six weeks after injection, the measurement  $dP/dT+$  was higher in ADSC group when compared with CONTROL group ( $p<0,05$ ), indicating a higher cardiac contractility index. With those finds it was possible to conclude that adipose derived stromal cells (ADSC) promotes improvement in cardiac function and prevents remodeling cardiac, when administered in intra-myocardial way.

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>20</b>
1.1 - INCIDÊNCIAS DO INFARTO DO MIOCÁRDIO	20
1.2 - FISIOPATOLOGIA DO INFARTO DO MIOCÁRDIO E REMODELAMENTO CARDÍACO	26
1.2 - MODELOS EXPERIMENTAIS DE INFARTO DO MIOCÁRDIO EM RATOS	28
1.3 - CÉLULAS-TRONCO	30
1.4.1 - APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMIAS	32
1.4.2 - CARDIOMIOPLASTIA CELULAR	33
1.4 - TECIDO ADIPOSEO	34
1.5.1 - PROPRIEDADES DO TECIDO ADIPOSEO	40
1.5.2 - CÉLULAS-TRONCO OBTIDAS DO TECIDO ADIPOSEO	43
1.5.3 - ESTUDOS <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> DAS ADSC	44
<b>2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</b>	<b>50</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>52</b>
3.1 - ANIMAIS EXPERIMENTAIS	52
3.2 - ESTUDOS <i>IN VITRO</i>	53
3.2.1 - ISOLAMENTO DE CÉLULAS PROGENITORAS OBTIDAS DE TECIDO ADIPOSEO BRANCO	53
3.2.2 - EXPANSÃO DAS CÉLULAS	55
3.2.3 - MARCAÇÃO CELULAR COM OIL RED O	56
3.2.4 - CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA POR CITOMETRIA DE FLUXO	59
3.2.5 - IMUNOCITOQUÍMICA	61
3.2.6 - MARCAÇÃO CELULAR COM HOESCHT	62

3.3 – ESTUDOS <i>In Vivo</i>	64
3.3.1 - DESENHO DO ESTUDO	64
3.3.2 - INFARTO CRÔNICO DO MIOCÁRDIO EM RATOS	66
3.3.3- TRANSPLANTE CELULAR POR VIA INTRAMIOCÁRDICA	68
3.3.4 - AVALIAÇÕES FUNCIONAIS	70
i - REGISTRO ELETROCARDIOGRÁFICO	70
ii - ESTUDO ECOCARDIOGRÁFICO	71
iii - AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA	73
3.4 - <i>POST MORTEM</i>	76
3.4.1 - AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E OBTENÇÃO DO TAMANHO DO INFARTO	76
3.5 - ESTUDO ESTATÍSTICO	80
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>81</b>
4.1 – CULTURA DE ADSC E MARCAÇÃO COM OIL RED O	81
4.2 – IMUNOFENOTIPAGEM DAS ADSC POR CITOMETRIA DE FLUXO	84
4.3 - IMUNOCITOQUÍMICA DAS ADSC	89
4.4 - AVALIAÇÃO ELETROCARDIOGRÁFICA	91
4.5 - AVALIAÇÃO ECOCARDIOGRÁFICA	95
4.6 - AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA	102
4.7 - PESQUISA DAS CÉLULAS MARCADAS COM HOESCHT APÓS ADMINISTRAÇÃO INTRAMIOCÁRDICA DE ADSC	105
4.8 - ESTUDO ANÁTOMO-HISTOPATOLÓGICO	107
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>109</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>118</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b>	<b>120</b>
<b>8. ANEXO</b>	

Dedico este trabalho:

A todos aqueles que acreditam que a ousadia e o erro são caminhos para as grandes realizações;

E a todos os animais que pagaram com a vida, o preço da minha ignorância e covardia durante a experimentação animal para a realização deste trabalho. A eles eu não devolverei a vida, mas me dedicarei em prol à causa destes animais e em prol a saúde da humanidade.

## AGRADECIMENTO

Aos meus pais, Marco Aurélio Bagno & Alda Cristina de Lima e Silva Bagno, que pelo amor incondicional me fazem criar forças para encarar qualquer obstáculo em minha vida;

Ao meu orientador, Antonio Carlos Campos de Carvalho, pela extrema competência no campo de pesquisa em Terapia Celular e por acreditar no meu potencial tornando possível a realização deste trabalho;

A minha orientadora Regina Coeli dos Santos Goldenberg, pela paciência, apoio e dedicação na execução do trabalho;

Ao meu querido amigo e “co-co-orientador”, João Pedro Saar Werneck-de-Castro, que além de colaborar diretamente neste trabalho, me fez aprender “na marra” que não basta saber, tem que acreditar e correr muito atrás para dar certo e fazer acontecer;

As minhas queridas amigas, Márcia Souza Cunha Abreu & Fernanda Cristina Paccola Mesquita, pelo carinho e companheirismo em todos os momentos e me mostraram que a melhor forma de se realizar um trabalho é em grupo. “A união faz a força”!

Aos colegas de laboratório, que me deram muita alegria e tornaram possíveis momentos agradáveis de convívio;

As agências fomentadoras CAPES, CNPq e FAPERJ por terem contribuído diretamente financiando este projeto;

E finalmente, a todos àqueles, que de alguma forma, direta e indiretamente, contribuíram para esta construção tão importante na minha vida profissional.

## **EPIGRAFE**

- A teoria sempre acaba, mais cedo ou mais tarde, assassinada pela experiência. (Albert Einstein)

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> – Cenário brasileiro de mortalidade	22
<b>FIGURA 2</b> – Morfologia do adipócito branco e marrom	38
<b>FIGURA 3</b> – Estágios da diferenciação em adipócitos	41
<b>FIGURA 4</b> – Imagens ilustrativas de ADSC em #3 cultura pré-diferenciadas em linhagem adipogênica (pré-adipóctos)	58
<b>FIGURA 5</b> – Imagens ilustrativas de ADSC em suspensão coradas com HOESCHT antes de serem injetadas	63
<b>FIGURA 6</b> – Ilustração da cronologia experimental, <i>in vivo</i> , do presente trabalho	65
<b>FIGURA 7</b> – Figura representativa do procedimento para obtenção do infarto experimental	67
<b>FIGURA 8</b> – Figura representativa do local da injeção intramiocárdica na borda do infarto cicatrizado	69
<b>FIGURA 9</b> – Imagem ilustrativa onde demonstra o corte transversal captado pelo transdutor do aparelho ecocardiográfico em um coração avaliado através do modo bidimensional pelo aparelho MEGAS ESAOTE.	71
<b>FIGURA 10</b> – Cálculo da fração de encurtamento de área (FEA).	72
<b>FIGURA 11</b> – Cálculo do percentual de acinesia do VE.	72
<b>FIGURA 12</b> – Processo cirúrgico de canulação da artéria carótida direita.	75
<b>FIGURA 13</b> – Sistema de registro das pressões intraventriculares registro das pressões ventriculares e derivada da curva de pressão sobre o tempo.	76
<b>FIGURA 14</b> – Imagens das fatias dos corações para histopatologia	77
<b>FIGURA 15</b> – Ilustração da morfometria cardíaca para avaliação da extensão da área de infarto	79
<b>FIGURA 16</b> – Imagens de ADSC em cultura (1 <sup>a</sup> , 2 <sup>a</sup> e 3 <sup>a</sup> passagens) – aumento de 40x da objetiva	82

<b>FIGURA 17</b> – Imagens de ADSC em cultura (3ª passagem) – OIL RED O, Aumento de 40x da objetiva	83
<b>FIGURA 18</b> – Histograma da citometria de fluxo das ADSC em 3ª passagem. Observação das populações P1 e P2.	86
<b>FIGURA 19</b> – Histogramas da citometria de fluxo das ADSC em 3ª passagem. CD11b-; CD29++; CD90++.	87
<b>FIGURA 20</b> – Histograma da citometria de fluxo das ADSC em 3ª passagem. CD 34-; CD45+ <sup>low</sup> .	88
<b>FIGURA 21</b> – Imagens de imunocitoquímica das ADSC em 3ª passagem (marcação para desmina e vimentina)	90
<b>FIGURA 22</b> – Registros eletrocardiográficos em DI, 48 horas após a ligadura permanente da artéria coronária esquerda dos animais falso-operados (FO) e infartados (CONTROLE e ADSC)	91
<b>FIGURA 23</b> – Parâmetros eletrocardiográficos, média das análises: âQRS e iQRS dos grupos FO, CONTROLE e ADSC	93
<b>FIGURA 24</b> – Parâmetros ecocardiográficos: fração de ejeção dos grupos: FO, CONTROLE e ADSC, 28 dias após ligadura permanente da artéria coronária esquerda (linha de base) e 6 semanas após a terapia	97
<b>FIGURA 25</b> – Gráfico de FE% normalizado pelos valores da linha de base; relação tratamento vs tempo, dos grupos: CONTROLE e ADSC; linha de base, 4 semanas e 6 semanas após terapia	98
<b>FIGURA 26</b> – Parâmetros ecocardiográficos: área de acinesia do ventrículo esquerdo (IM%) dos grupos: CONTROLE e ADSC, 28 dias após ligadura permanente da artéria coronária esquerda (linha de base) e 6 semanas após a terapia	100
<b>FIGURA 27</b> – Gráfico de IM% normalizado pelos valores da linha de base; relação tratamento vs tempo, dos grupos: CONTROLE e ADSC; linha de base, 4 semanas e 6 semanas após terapia	101
<b>FIGURA 28</b> – Perfil hemodinâmico dos grupos CONTROLE e ADSC, 6 semanas após a terapia	104
<b>FIGURA 29</b> – Imagem de fluorescência do tecido cardíaco de um animal infartado e transplantado com células (ADSC)	106
<b>FIGURA 30</b> – Análise morfométrica do infarto do miocárdio ( <i>post mortem</i> )	108

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> – Distribuição das principais causas de morte no Brasil	23
<b>TABELA 2</b> – Frequência de óbitos por doenças do aparelho circulatório no Brasil	24
<b>TABELA 3</b> – Taxa de mortalidade específica por doenças do aparelho circulatório no Brasil	25
<b>TABELA 4</b> – Funções de proteínas e fatores não protéicos produzidos e secretados pelo tecido adiposo branco	36
<b>TABELA 5</b> – Tabela com a relação e resumos de estudos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> com ADSC	48-49
<b>TABELA 6</b> – Lista dos anticorpos conjugados com fluorocromo utilizados na marcação celular	60
<b>TABELA 7</b> – Imunofenotipagem das ADSC em 3ª passagem por citometria de fluxo	85
<b>TABELA 8</b> – Parâmetros eletrocardiográficos (presença de onda Q e âQRS) de animais dos grupos CONTROLE, ADSC e FO, 6 semanas após a terapia	94
<b>TABELA 9</b> – Parâmetros ecocardiográficos obtidos dos grupos: ADSC, CONTROLE e FO, 28 dias após a ligadura permanente da artéria coronária esquerda	96
<b>TABELA 10</b> – Perfil hemodinâmico dos grupos: ADSC e CONTROLE (anestesiados), 6 semanas após a terapia	102

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**âQRS** - Angulo do vetor de despolarização do VE

**ADVE** - Área do VE em diástole

**ADSC** – Células progenitoras derivadas do tecido adiposo

**Apo-E** – Apolipoproteína E

**ASVE** - Área do VE em sístole

**ATP** – Adenosina trifosfato

**aVF** – derivação com eletrodo do ECG explorador no pé

**aVL** – derivação com eletrodo do ECG explorador no braço esquerdo

**aVR** – derivação com eletrodo do ECG explorador no braço direito

**bFGF** – Fator de crescimento básico de fibroblasto

**BMSC** – Células-tronco derivadas de medula óssea

**BSA** – Albumina de soro bovino

**BSF** – Soro fetal bovino

**CETP** - Proteína de transferência de ésteres de colesterol

**CFU** – Unidade formadora de colônia

**CTM** – Células-tronco mesenquimais

**D1** – Derivação 1 do ECG

**D2** – Derivação 2 do ECG

**D3** – Derivação 3 do ECG

**DDVE** - Diâmetro do VE em diástole

**DNA** - Ácido desoxiribonucleico

**(dP/dT+)** - Índice de contratilidade cardíaca

**(dP/dT-)** - Índice de relaxamento cardíaco

**DSVE** - Diâmetro do VE em sístole

**ECG** – Registro eletrocardiográfico

**ECO** – Estudo ecocardiográfico

**eGFP** – Proteínas verdes fluorescentes

**FC** – Frequência cardíaca

**FEA** – Fração de encurtamento de área

**FITC** – Fluorocromo isotiocianato de fluoresceína

**FO** – Falso-operado

**GM-CSF** - Fator de estimulação de colônia de granulócitos-macrófagos

**HGF** - Fator de Crescimento de hepatócito

**IAM** – Infarto agudo do miocárdio

**ICC** - Insuficiência cardíaca congestiva

**IgG** – Imunoglobulina G

**IGF-1** - Fator do crescimento semelhante à insulina 1

**IL-6** - Interleucina-6

**IM** - Infarto do miocárdio

**IM%** - Percentual de acinesia do VE

**iQRS** - Índice QRS

**LLP** - Lipase Lipoproteica

**MIF** - Fator Inibidor da Migração de Macrófagos

**MSC** – Monocamada de células-tronco

**NIH** – Instituto nacional de saúde

**PAI-1** - Inibidor da Ativação de Plasminogênio-1

**PBS** – Solução salina tamponada com fosfato

**PDF** - Pressão diastólica final

**PDGF** – Fator de crescimento derivado de plaquetas

**PDinf** - Perímetro da área infartada em diástole

**PDTVE** - Perímetro total do ventrículo esquerdo em diástole

**PDVE** - Pressão desenvolvida pelo VE

**PE** – Polietileno

**PE-A** – Fluorocromo ficoeritrina R

**PerCP** – Proteína da clorofila de peridina

**PPAR- $\gamma$**  - Proliferador de peroxisoma ativado pelo receptor-  $\gamma$

**pref-1** - Fator-1 pré-adipócito

**PS** - Pressão sistólica

**SEM** – Média erro padrão

**TAG** - Triacilglicerol

**TGF- $\beta$**  – Fator de crescimento transformador- $\beta$

**TNF- $\alpha$**  – Fator de necrose tumoral- $\alpha$

**UCP-1** - Proteína desacopladora -1

**VE** - Ventrículo esquerdo

**VEGF** - Fator de crescimento de endotélio vascular

**VLDL** - Lipoproteína de muito baixa densidade

**SVF** – Fração estroma-vascular

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 – INCIDÊNCIA DO INFARTO DO MIOCÁRDIO

As medidas do estado de saúde da população são uma atividade central em saúde pública, e os registros sistemáticos de dados de mortalidade e sobrevivência são fundamentais para a programação de ações de saúde para uma determinada população. Os indicadores de saúde são medidas-síntese que contêm informações relevantes sobre o estado e desempenho do sistema de saúde que refletem a situação sanitária de uma população [MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008].

O Ministério da Saúde assim como os censos e pesquisas de base populacional do IBGE são fontes relevantes para a avaliação da saúde da população brasileira, por promoverem informações sobre nascimentos, óbitos, doenças de notificação, atenção hospitalar, ambulatorial e básica, orçamento público em saúde além de informarem aspectos demográficos e sócio-econômicos [MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008; IBGE, 2005 <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/ams/2005/default.shtm>].

As causas de mortalidade no Brasil têm passado por importantes mudanças ao longo dos anos com queda das doenças infecciosas e aumento das doenças não infecciosas, como a doença cardíaca, as neoplasias e a morte violenta (FIGURA 1 e TABELA 1) [SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE – MS, 2004 [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=25341](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=25341)].

Segundo estes dados, a frequência de óbitos no Brasil em 2004, causados pela doença isquêmica do coração representa 30,4% de todos os óbitos (Infarto do miocárdio 22,9%) ficando atrás apenas das doenças cerebrovasculares que representam 31, 8% (TABELA 2)

[SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE – MS, 2004  
[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=25341](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=25341) ].

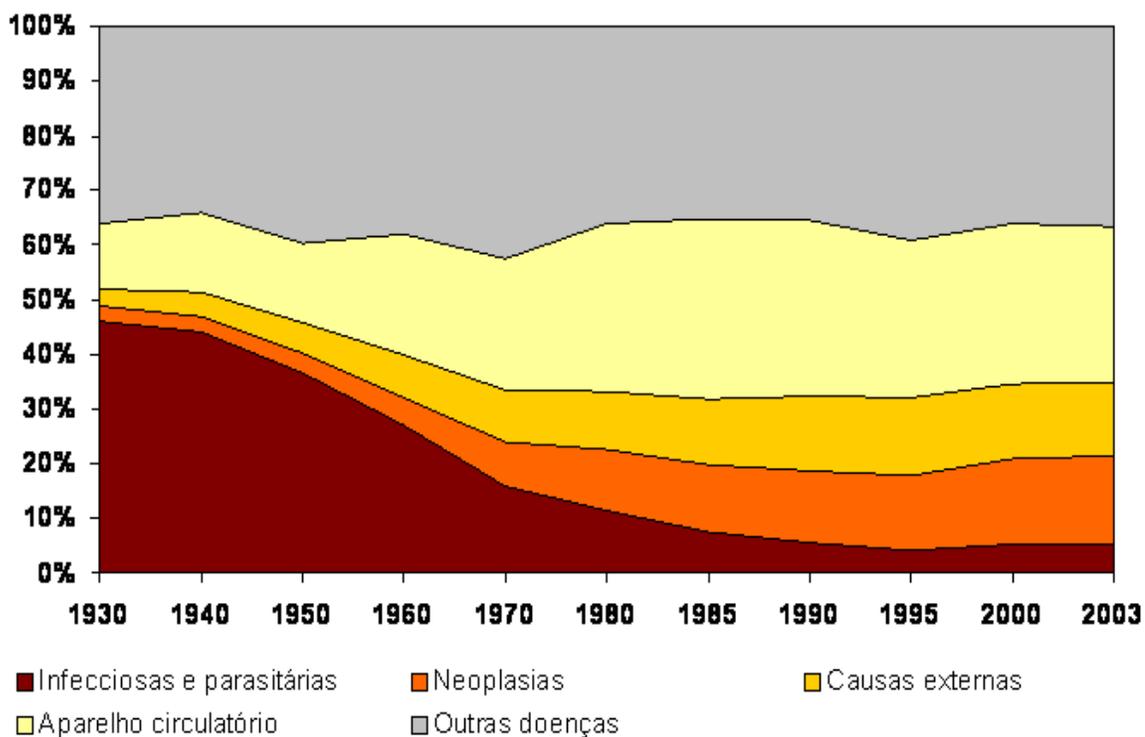
A taxa de mortalidade específica por doenças do aparelho circulatório é conceituada através do número de óbitos por doença do aparelho circulatório, por 100 mil habitantes, na população residente em determinado espaço geográfico, no ano considerado. A taxa de mortalidade específica estima o risco de morte por doenças do aparelho circulatório e dimensiona sua magnitude como problema de saúde pública (TABELA 3) [REDE INTERAGENCIAL DE INFORMAÇÃO PARA A SAÚDE, 2008].

Entre 1990 e 2004, no Brasil, houve aumento nas taxas de mortalidade por doenças isquêmicas do coração em ambos os sexos na região Norte, Nordeste e Centro-oeste e estabilidade na região Sul, com exceção da região Sudeste que mostrou decréscimo. Para as doenças cerebrovasculares e para as doenças do aparelho circulatório em geral, houve crescimento nas taxas para as regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste, para ambos os sexos, enquanto nas demais regiões houve decréscimo. A sobremortalidade masculina é constante para as causas de doenças cerebrovasculares e do aparelho circulatório em todas as regiões. Provavelmente o crescimento das taxas de mortalidade por doenças isquêmicas cardíacas e doenças cerebrovasculares nas regiões Norte e Nordeste para ambos os sexos, pode ser, em parte, atribuído à melhoria da qualidade da informação sobre a causa de morte com conseqüente redução da proporção de óbitos por causas mal definidas [SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE – MS, 2004  
[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=25341](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=25341) ].

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998, 1999, 2000 e 2001), as enfermidades cardiovasculares atingiram elevados índices de morte

no mundo (30,9% em 1998 e 30% em 2000; 16.690.000 e 16.701.000 mortes, respectivamente), sendo a doença isquêmica do coração a de maior incidência (13,7% em 1998 e 12,4% em 2000; 7.375.000 e 6.894.000 mortes, respectivamente). Dentre as doenças cardiovasculares, o infarto do miocárdio tem apresentado prevalência crescente na população.

Diante deste cenário, destaca-se a grande importância no investimento de novas pesquisas no Brasil e no mundo com objetivo de criar alternativas terapêuticas para doenças de alto impacto no índice de mortalidade mundial como a doença isquêmica do coração.



**FIGURA 1 – Cenário brasileiro - mortalidade proporcional (%) nas capitais: em 1930, 46% das causas de morte eram por doenças infecciosas e parasitárias havendo uma queda para 5% em 2003.** Ao contrário, as doenças cardiovasculares representavam 12% das causas de morte em 1930 e aumentou consideravelmente este índice em 2003, para 31%. \* até 1970, os dados referem-se apenas às capitais. Fonte: BARBOSA DA SILVA e cols., 2003.

Causa	2004	1996	1980
1. Doenças do aparelho circulatório	285.543	249.613	189.215
2. Neoplasias (tumores)	140.801	103.408	61.253
3. Causas externas de morb. e mortalidade	127.470	119.156	70.212
4. Doenças do aparelho respiratório	102.168	88.436	59.621
5. Doenças endóc. nutricionais e metab.	53.134	36.590	25.638
6. Doenças do aparelho digestivo	48.661	39.035	25.401
7. Algumas doenças infec. e parasitárias	46.067	52.511	69.553
8. Algumas afec. orig. no período perinatal	31.011	37.299	51.747
9. Doenças do aparelho geniturinário	17.094	12.792	9.468
10. Doenças do sistema nervoso	15.156	10.337	9.466
11. Malf cong deformd e anomalias cromos	10.210	9.127	8.570
12. Outras (Transtornos mentais e comportamentais; Doen. sangue órgãos hemat e transt imunitário; Doenças sist. osteomuscular e tec conj; Doenças da pele e do tecido subcut; Gravidez parto e puerpério	19.696	13.406	7.055
Sint sinais e achad anorm ex clín e lab	126.922	137.039	161.246
Total	1.024.073	908.883	750.727

**TABELA 1 – Distribuição das principais causas de morte, Brasil - 1980, 1996 e 2004.** Fonte: Secretaria de vigilância em saúde - MS

	2004		1996		1980	
	n°	%	n°	%	n°	%
Doenças cerebrovasculares	90.930	31,8	81.056	32,5	55.214	29,2
Doenças isquêmicas do coração	86.791	30,4	73.692	29,5	52.823	27,9
Infarto agudo do miocárdio	65.482	22,9	55.900	22,4	37.209	19,7
Outras doenças cardíacas	61.540	21,6	62.213	24,9	49.008	25,9
Febre reumática aguda e doen reum crôn coração	2.049	0,7	1.793	0,7	1.818	1,0
Doenças hipertensivas	30.850	10,8	19.550	7,8	12.712	6,7
Arteriosclerose	1.987	0,7	3.652	1,5	7.157	3,8
Rest doenças do aparelho circulatório	11.396	4,0	7.657	3,1	10.483	5,5
<b>Total</b>	<b>285.543</b>	<b>100,0</b>	<b>249.613</b>	<b>100,0</b>	<b>189.215</b>	<b>100</b>

**TABELA 2 - Frequência de óbitos por doenças do aparelho circulatório, Brasil - 1980, 1996 e 2004.** Fonte: Secretaria de vigilância em saúde - MS

Regiões	Sexo	Doenças isquêmicas do coração			Doenças cerebrovasculares			Doenças do aparelho circulatório		
		1990	2000	2004	1990	2000	2004	1990	2000	2004
Brasil	Masc.	55,0	54,4	56,1	57,4	51,7	51,8	172,6	164,3	168,5
	Fem.	37,5	38,2	39,7	51,2	48,1	48,4	146,5	142,9	146,3
	Total	46,2	46,2	47,8	54,3	49,9	50,1	159,4	153,5	157,3
Norte	Masc.	19,4	19,2	23,2	24,1	27,1	29,4	69,6	74,1	82,6
	Fem.	11,7	12,2	13,3	23,9	25,6	25,2	60,3	59,7	62,7
	Total	15,6	15,8	18,3	24,0	26,3	27,3	65,1	67,0	72,8
Nordeste	Masc.	21,5	29,5	35,8	32,0	37,7	42,7	87,2	108,5	126,1
	Fem.	14,3	21,6	27,5	29,9	35,7	41,9	74,9	95,6	113,8
	Total	17,8	25,5	31,6	30,9	36,7	42,3	80,9	102,0	119,8
Sudeste	Masc.	80,7	71,1	71,0	75,9	61,5	58,8	239,8	204,9	203,1
	Fem.	55,7	49,2	49,2	66,2	56,9	53,9	203,0	177,7	174,5
	Total	68,0	60,0	59,8	71,0	59,2	56,3	221,2	191,1	188,5
Sul	Masc.	73,1	78,4	73,0	76,1	66,1	63,7	213,7	210,1	199,5
	Fem.	50,2	57,2	54,0	69,3	62,5	61,8	183,1	187,8	180,8
	Total	61,6	67,7	63,4	72,7	64,3	62,7	198,3	198,8	190,0
Centro-Oeste	Masc.	30,0	41,9	49,7	39,9	45,6	46,3	121,3	145,4	162,2
	Fem.	16,9	24,8	29,7	33,2	37,4	38,2	95,5	112,6	122,8
	Total	23,5	33,3	39,6	36,6	41,5	42,2	108,6	128,9	142,4

Fonte: Ministério da Saúde/SVS – Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM). e base demográfica do IBGE.

**TABELA 3 - Taxa de mortalidade específica por doenças por aparelho circulatório, segundo sexo.** Brasil e grandes regiões, 1990, 2000 e 2004. Fonte: REDE interagencial de informação para a saúde, 2008.

## **1.2 – FISIOPATOLOGIA DO INFARTO DO MIOCÁRDIO E REMODELAMENTO CARDÍACO**

O infarto do miocárdio (IM) é uma doença que resulta de uma redução da perfusão local ocasionada por uma obstrução ao fluxo sanguíneo na circulação coronariana. A partir desta obstrução, diversas modificações agudas e crônicas ocorrem tanto na região infartada quanto na área não infartada. Estas modificações são, em geral, referidas como sendo o remodelamento cardíaco [LITWIN e cols., 1994; JAIN e cols., 2001].

Durante as primeiras horas após a interrupção do fluxo sanguíneo e conseqüente morte dos miócitos, ocorrem edema e inflamação caracterizada por infiltração de neutrófilos na região infartada. Após esta reação, segue-se uma longa fase de proliferação de fibroblastos, deposição de colágeno e neoangiogênese que irão constituir a cicatriz [WEISMAN e cols., 1988; PFEFFER & BRAUNWALD, 1990]. Dependendo da espécie, o processo finaliza dentro de semanas ou meses.

Então, o processo de remodelamento cardíaco se caracteriza não só pela remoção dos cardiomiócitos necróticos, mas também, pela formação do tecido de granulação e a indução da neovascularização da região peri-infarto. Além destas alterações, o miocárdio remanescente é submetido a modificações geradas por fatores estruturais (extensão da lesão) e hemodinâmicos (sobrecarga de volume) [ELLIS e cols., 1962; FACTOR e cols., 1990; PFEFFER & BRAUNWALD, 1990].

Assim, após o infarto, a função de bomba desempenhada pelo coração é ainda mantida devido a mecanismos compensatórios capazes de manter o débito sistólico. Logo após a interrupção do fluxo, ocorre um aumento na modulação adrenérgica, promovendo aumento na

frequência cardíaca e força de contração na tentativa de manter o débito sistólico. O estiramento agudo do tecido viável, devido ao menor esvaziamento ventricular ocasionado pela perda de miócitos, desencadeia o mecanismo de Frank-Starling que também auxilia na manutenção do débito sistólico. Entretanto, esses mecanismos compensatórios agudos são insuficientes quando a região acometida pelo processo isquêmico representa mais de 20% do ventrículo esquerdo [PFEFFER & BRAUNWALD, 1990]. O aumento da cavidade ventricular e hipertrofia cardíaca são mecanismos compensatórios que se tornam importantes na tentativa de se manter o débito sistólico [WEISMAN e cols., 1988].

Na população humana, indivíduos coronariopatas crônicos são caracterizados clinicamente pela presença de arritmias ventriculares, angina pectoris e insuficiência cardíaca congestiva (ICC) [JULIAN, 1989; MORRIS e cols., 1990]. Esses pacientes são muito suscetíveis à morte súbita [HAGSTROM e cols., 1964; PANIDIS & MORGANROTH, 1983; KEMPF & JOSEPHSON, 1984].

A capacidade de bombeamento do coração fica reduzida após o infarto, impedindo o paciente de exercer atividades que requerem maior esforço. Quanto maior a área de músculo cardíaco lesada durante o infarto, maior o grau de insuficiência. Infelizmente, a insuficiência cardíaca é progressiva, de modo que o quadro clínico dos pacientes só piora: 22% dos homens e 46% das mulheres que sofrem infartos evoluem para insuficiência cardíaca congestiva em um prazo de seis anos. É óbvia, portanto, a necessidade de uma terapia que possa dar aos pacientes uma maior expectativa de vida após o infarto [CARVALHO & SANTOS, 2004].

Devido a todas essas características, um grande desafio médico-científico é tentar impedir ou pelo menos atenuar a progressão do infarto na fase crônica. Assim, a falência cardíaca congestiva poderia ser minimizada.

### 1.3 - MODELOS EXPERIMENTAIS DE INFARTO DO MIOCÁRDIO EM RATOS

O modelo experimental de oclusão permanente da artéria coronariana foi desenvolvido para reproduzir os sinais e sintomas que ocorrem no infarto do miocárdio em humanos, com a finalidade de facilitar o desenvolvimento de novas terapias para a doença isquêmica do coração.

O primeiro modelo foi descrito por HEIMBURG, em 1946, que estudou a revascularização do miocárdio através da aplicação de substâncias no saco pericárdio. Já a oclusão completa da artéria coronária descendente anterior esquerda promove uma isquemia transmural em ratos e, conseqüentemente, o infarto da parede livre do ventrículo esquerdo [JONHS & OLSON, 1954]. É importante ressaltar que a extensão do infarto varia de acordo com a altura em que é realizada a ligadura da artéria coronária durante o procedimento cirúrgico.

Em 1976, MACLEAN e cols. apresentaram uma técnica cirúrgica diferente da de JONHS & OLSON que consistia em uma toracotomia lateral e exteriorização do coração através de uma leve compressão sobre o lado direito do tórax. A mortalidade quando este método cirúrgico foi utilizado foi de 21%. Esta técnica ganhou grande popularidade e muitos estudos experimentais em infarto do miocárdio e isquemia-reperfusão têm sido realizados utilizando este modelo.

Foi em 1978, com FISHBEIN e colaboradores, que este modelo experimental ganhou grande popularidade, sendo este, até hoje, um dos trabalhos mais citados como referência para detalhamento da técnica. Este trabalho relata, de forma detalhada, todas as etapas do processo fisiopatológico gerado pela obstrução do fluxo coronariano em ratos. As características da evolução histopatológica do modelo experimental de IM em ratos são similares as do infarto humano. Contudo, nos ratos essa evolução é mais rápida e, apresenta uma resposta polimorfonuclear menos intensa [SELYE e cols., 1978]. Estudos sugerem que essa rápida

progressão do infarto seja devido à presença de uma pobre circulação colateral nos ratos [SCHAPER, 1984; HEARSE e cols., 1988].

A fase aguda do IM é caracterizada por um quadro isquêmico com lesão tecidual que evolui para uma acentuada morte celular. Essas mudanças histopatológicas resultam em alterações significativas na função e na geometria cardíaca. Logo após a perda do miocárdio viável, ainda na fase aguda da injúria, é iniciado o processo de remodelamento cardíaco. Neste momento, a função ventricular já diminui e o miocárdio sobrevivente, muitas vezes, não é capaz de compensar a perda tecidual nos aspectos funcional e metabólico. Esta impossibilidade do miocárdio não isquêmico compensar a perda tecidual promove o aumento da pressão diastólica e a queda da pressão sistólica no ventrículo esquerdo o que leva a uma diminuição do débito cardíaco, essas alterações ocorrem mais ou menos em 3 semanas [ZIMMER e cols., 1989].

O infarto do miocárdio cicatrizado (crônico), por sua vez, se caracteriza, estruturalmente, pelo término da fase de cicatrização, por volta do 21º dia após a cirurgia. A análise histológica revela ausência quase total de necrose, sinais discretos de edema, hemorragia e congestão, poucos linfócitos, presença moderada de fibroblastos, células pigmentadas (hemossiderina), proliferação vascular e altos níveis de colágeno intersticial [MALLORY e cols., 1939; FISHBEIN e cols., 1978; FACTOR e cols., 1990; NOVAES, 1992]. Nesta fase, destacam-se a hipertrofia e o aumento da cavidade ventricular resultantes das alterações anatomo-patológicas iniciadas na fase aguda da injúria [ELLIS e cols., 1962; FACTOR e cols., 1990; PFEFFER & BRAUNWALD, 1990].

Nos ratos, a fase crônica de grandes infartos é caracterizada por uma modificação macroscópica da geometria cardíaca [OLIVETTI e cols., 1991]. Tanto o diâmetro transversal quanto o longitudinal encontram-se aumentados. Além disso, há um aumento do volume da

câmara esquerda, similar ao que ocorre em humanos com infarto do miocárdio cicatrizado [TUREK e cols., 1978; ANVERSA e cols., 1984; SPADARO e cols., 1989; OLIVETTI e cols., 1991].

#### 1.4 – CÉLULAS-TRONCO

As células-tronco podem ser classificadas baseadas nas espécies de origem (camundongo, rato, humano), estágio do desenvolvimento das espécies (embrionário, fetal ou adulto), tecido de origem (hematopoiético, mesenquimal, esquelético, neural) e pelo potencial de se diferenciar em um ou mais tipos de células maduras (totipotentes, pluripotentes, multipotentes) [NIH, 2001; NIH, 2006; PENN & MAL, 2006].

Por definição, a célula-tronco é caracterizada por sua capacidade de se auto-renovar e de se diferenciar em múltiplas linhagens. [GIMBLE e cols., 2007; N.I.H., 2001]. São tipos de células indiferenciadas capazes de multiplicar-se se mantendo indiferenciadas por longos períodos tanto *in vitro* como *in vivo*, mas que diante de estímulos específicos podem diferenciar-se em células maduras e funcionais dos tecidos através de uma grande variedade de células de diferentes tecidos [CARVALHO & SANTOS, 2004; ZAGO & COVAS, 2006].

Em termos ideais atualmente postula-se que, para aplicações na medicina regenerativa, as células-tronco devem seguir os seguintes critérios [GIMBLE e cols., 2007]:

- Presença em quantidade abundantes (milhões a bilhões de células)
- Obtenção por procedimento invasivo mínimo
- Diferenciação em diversas linhagens celulares de maneira reprodutível e regulável.

- Segurança e eficiência no transplante tanto para um hospedeiro autólogo como alogênico.
- Manipulação de acordo com critérios de Boas Práticas de Fabricação.

Dentre os vários tipos de células-tronco, cabe destacar as células-tronco mesenquimais (CTM) que são multipotentes e têm a capacidade de se diferenciar em tecidos oriundos do mesoderma, tais como músculo esquelético, osso, tendões, cartilagens e gordura sob condições de cultura apropriada usando hormônios específicos e fatores de crescimento [MEYERROSE e cols., 2007; SCHÄFFLER e cols., 2007; STREM e cols., 2005; ZAGO & COVAS, 2006; ZUK e cols., 2001; ZUK e cols., 2002]. É por isso que as células-tronco mesenquimais atraem tanto a atenção como boas candidatas a terapia regenerativa em doenças, engenharia celular ou genética [ROMANOV e cols., 2005]. As células-tronco mesenquimais (CTM) podem ser rotineiramente isoladas de diversos compartimentos teciduais tais como tecidos fetais, sangue do cordão umbilical [MAIA, 2006; YAMADA e cols., 2007], veia umbilical, parede das artérias, veia safena, polpa dentária, medula óssea [RUAN e cols., 2005; XU e cols., 2007], músculo esquelético, tecido adiposo [BJORNTORP e cols., 1978; MEYERROSE e cols., 2007; SCHÄFFLER e cols., 2007] e outros tecidos [WICKHAM e cols., 2003; ZAGO & COVAS, 2006]. A propriedade básica que permite o isolamento e a cultura de CTM é a facilidade de aderir a superfícies de vidro e plástico [MEYERROSE e cols., 2007; SCHÄFFLER e cols., 2007; ZAGO & COVAS, 2006].

#### 1.4.1 - APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

A terapia com células-tronco mesenquimais é um procedimento promissor para o tratamento de vários tipos de doenças degenerativas. A principal razão, para essa afirmação, decorre do fato de que as células-tronco mesenquimais possuem relevante capacidade plástica, sendo capazes de originar diversos tipos celulares *in vitro* e *in vivo* [ZAGO & COVAS, 2006].

Neste contexto, as ctm têm aplicações e vêm sendo testadas para o tratamento de um número crescente de doenças tais como: doenças cardíacas isquêmicas e degenerativas [CARVALHO & SANTOS, 2004; DAÍ e cols., 2005, MARTINO e cols., 2006; OLIVARES e cols., 2004; OLIVARES e cols., 2007; PENN & MAL, 2006; PERIN e cols., 2003; PERIN e cols., 2004; PITTENGER & MARTIN, 2004; SANTOS e cols., 2004; SILVA e cols., 2004; SOARES e cols., 2004; SOARES e cols., 2007; YAMADA e cols., 2007; ZHANG e cols., 2007], lesões ósteo-condrais [ERICKSON, 2002; LE e cols., 2005; QUARTO e cols., 2001; SOLCHAGA e cols., 2002], tendinosas [AWAD e cols., 2003], pulmonares [ORTIZ e cols., 2003], da medula espinhal [HANABUSA E COLS., 2005], do sistema nervoso central [HOFSTETTER e cols., 2002], do fígado [ORTIZ e cols., 2003; SEO e cols., 2005], em doenças genéticas [BAKSH e cols., 2004] como a osteogênese imperfeita [LE e cols., 2005] e a síndrome de Hurler [KOC e cols., 2002] e outras [JING e cols., 2007; KOC e cols., 2002; YAÑEZ e cols., 2006; ZUK e cols., 2001].

## 1.4.2 - CARDIOMIOPLASTIA CELULAR

Pesquisas *in vitro*, em animais experimentais [DAÍ e cols., 2005; OLIVARES e cols., 2004; OLIVARES e cols., 2007; SOARES e cols., 2004; YAMADA e cols., 2007; ZHANG e cols., 2007] e também pesquisas clínicas na espécie humana [DOHMANN e cols., 2005; KOCHER e cols., 2001; PERIN e cols., 2003; PERIN e cols., 2004; SILVA e cols., 2004; SOARES e cols., 2007; TURA e cols., 2007] em números cada vez mais crescentes têm sido relatadas com resultados encorajadores relacionados ao potencial das células-tronco no tratamento de doenças do coração [CARVALHO & SANTOS, 2004;; MARTINO e cols., 2006; PENN & MAL, 2006; PITTENGER & MARTIN, 2004; SANTOS e cols., 2004].

O uso de células-tronco derivadas da medula óssea (BMSC) do adulto para o tratamento de doença isquêmica grave do coração associada à insuficiência cardíaca foi proposto por PERIN e cols. (2003) em trabalho conduzido em 14 pacientes. Os pacientes foram submetidos à injeção transendocárdica guiada por mapeamento eletromecânico em áreas viáveis, porém isquêmicas, do miocárdio. Os autores mostraram que, em seguimento de 4 meses, houve melhora da classe funcional, redução significativa nos defeitos perfusionais avaliados por medicina nuclear e aumento da fração de ejeção de 20% para 29%. Ainda também, os estudos clínicos realizados por RUAN e cols. (2005) demonstraram que pacientes com infarto agudo do miocárdio (IAM) injetados com células-tronco autólogas de medula óssea por via intracoronária apresentaram melhora na contratilidade miocárdica regional e global atenuando assim o remodelamento ventricular esquerdo pós-infarto agudo.

No Brasil, subvencionada pelo Ministério da Saúde, através do Estudo Multicêntrico Randomizado de Terapias Celulares em Cardiopatias (Multicenter Randomized Trial of Cell

Therapy in Cardiopathies – MiHeart Study) vem sendo testada a eficácia de terapia com células derivadas da medula óssea em quatro diferentes cardiopatias: doença isquêmica do coração aguda e crônica, cardiomiopatia chagásica e dilatada. Vários estudos clínicos usando a terapia celular para doenças cardíacas já foram realizados, incluindo a cardiomiopatia chagásica. Na doença isquêmica crônica do coração, através das pesquisas clínicas iniciais descritas em literatura, esta terapia foi demonstrada como segura e potencialmente eficaz. Porém, num contexto geral, ainda são necessários mais e maiores estudos clínicos bem controlados para testar a eficácia das terapias celulares em cardiopatias [TURA e cols., 2007].

## **1.5 - TECIDO ADIPOSEO**

O tecido adiposo sempre foi considerado uma massa inerte com algumas propriedades vantajosas, como apoio mecânico para as mais importantes estruturas, reserva energética e isolante térmico corpóreo. Por um longo tempo, estas duas últimas propriedades foram aplicadas nos estudos da regulação do metabolismo energético e pouca atenção foi dada para analisar outras propriedades desse tipo celular [AHIMA e cols., 2000; LAU e cols., 2005].

A onda mundial de obesidade com o conseqüente aumento da morbidade e mortalidade associadas alavancou o interesse da comunidade científica nos estudos que envolvem o tecido adiposo [OGDEN e cols., 2006].

Além disso, a descoberta, nos últimos 15 anos, da capacidade do tecido adiposo em secretar hormônios, como a leptina em 1994, levou a uma mudança na abordagem das investigações deste tipo celular. Os hormônios secretados pelo tecido adiposo são conhecidos como adipocinas. Esses hormônios possuem uma diversidade estrutural e de funções e envolvem

proteínas relacionadas ao sistema imune – fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-6 (IL-6); fatores de crescimento – fator de crescimento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ); e proteínas complementares da via alternativa (adipsina). As adipocinas regulam diversos processos como a pressão arterial, a coagulação sanguínea, homeostase glicêmica, angiogênese, dentre outros [FONSECA-ALANIZ e cols., 2007; FRUHBECK e cols., 2001; LAU e cols., 2005]. A função de cada proteína e fatores não protéicos produzidos e secretados pelo tecido adiposo branco está relacionada na TABELA 4.

Substância	Efeitos Biológicos Descritos
LEPTINA	Sinaliza ao Sistema Nervoso Central sobre o estoque de energia corporal
ADIPONECTINA	Aumenta a sensibilidade à insulina, é antiinflamatório e atenua a progressão da aterosclerose
RESISTINA	Aumenta a resistência à insulina
TNF- $\alpha$ (Fator de Necrose Tumoral – $\alpha$ )	Lipolítico, aumenta o consumo energético e reduz a sensibilidade à insulina
INTERLEUCINA-6	Proinflamatório, lipolítico, reduz a sensibilidade à insulina
ADIPSINA	Ativa a via do complemento alternativa
ASP (Proteína Estimulante de Acilação)	Estimula a síntese de triacilglicerol no tecido adiposo branco
ANGIOTENSINOGENO	Precursor da angiotensina II, envolvido na regulação da pressão sanguínea arterial
PAI-1 (Inibidor da Ativação de Plasminogênio-1)	Inibe a ativação do plasminogênio, bloqueando a fibrinólise
FATOR TISSULAR	Inicia a cascata de coagulação
VEGF (Fator de Crescimento Endotelial Vascular)	Estimula a proliferação vascular (angiogênese) no tecido adiposo branco.
VISFATINA	Insulinomimético predominante produzido pela gordura visceral
MONOBUTIRINA *	Vasodilatador e indutor da neoformação vascular
TGF- $\beta$ (Fator de Crescimento Transformante- $\beta$ )	Regula uma série de processos no tecido adiposo branco, incluindo a proliferação de pré-adipócitos e a diferenciação, desenvolvimento e apoptose dos adipócitos
IGF-1 (Fator do Crescimento do Tipo Insulina 1)	Estimula a proliferação e diferenciação dos adipócitos
HGF (Fator de Crescimento de Hepatócito)	Estimula a diferenciação e o desenvolvimento dos adipócitos
MIF (Fator Inibidor da Migração de Macrófagos)	Imunoregulador com ação parácrina no tecido adiposo branco
LLP # (Lipase Lipoproteica)	Enzima estimuladora da hidrólise nos vacúolos das lipoproteínas (chylomicron e VLDL – lipoproteína de muito baixa densidade)
CETP # (Proteína de Transferência de Ésteres de Colesterol)	Transfere os ésteres do colesterol entre as lipoproteínas
Apo-E #	Componente protéico das lipoproteínas, especialmente VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade)
PROSTAGLANDINAS *	Reguladoras de muitos processos celulares, ativas durante a inflamação, coagulação sanguínea, ovulação e secreção do ácido gástrico
ESTROGÊNIO *	Produzido pela ação da aromatase, é o principal tipo de estrogênio no homem e na pós-menopausa da mulher
GLICOCORTICÓIDE *	Gerado pela ação do 11-hidroxisteróide desidrogenase, tipo II, no qual transforma cortisona em cortisol no tecido adiposo branco
APELINA	Tem uma ação biológica que ainda não está muito clara, mas está relacionada no controle do armazenamento energético corpóreo

\* Substâncias não-protéicas.

# Proteínas sem ação hormonal.

**TABELA 4. Proteínas e fatores não protéicos produzidos e secretados pelo tecido adiposo branco** [Fonseca-Alaniz e cols., 2007]

Atualmente os adipócitos são descritos como reguladores essenciais da homeostase energética de todo o organismo, responsáveis pelo fornecimento e depósito de energia, e constituem um órgão dinâmico e central para a regulação metabólica.

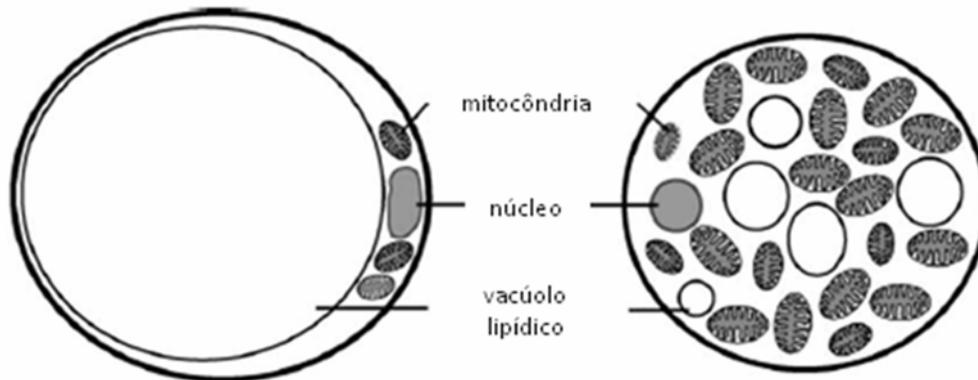
É importante ressaltar que desde 2001 o tecido adiposo vem se destacando no cenário científico como uma fonte alternativa de células-tronco. Não somente o tecido adiposo de origem animal pode ser amplamente estudado quanto o de origem humano, já que é um material de fácil acesso e descartado em lipoaspirações e outras cirurgias plásticas.

Em 2001, o trabalho de caracterização de células do tecido adiposo de humanos realizado pelo grupo de ZUK, demonstrou *in vitro* a presença de células progenitoras (células-tronco adultas multipotentes). Este fato despertou o interesse de outros pesquisadores, por esta atrativa fonte para o tratamento de doenças crônico-degenerativas, pois são células-tronco adultas e não implicam diretamente nas questões éticas e religiosas como os estudos com células-tronco embrionárias [ZUK e cols., 2001].

Além dos adipócitos, o tecido adiposo também é constituído por matriz e tecido conjuntivo (colágeno e fibras reticulares), fibras nervosas, estroma vascular incluindo células de músculo liso, células endoteliais, nodos linfóides, células imunológicas (leucócitos e macrófagos), células progenitoras (células-tronco), fibroblastos e pré-adipócitos (células adiposas indiferenciadas, mas já comprometidas com a linhagem adipogênica) [AHIMA e cols., 2000; ALBRIGHT & STERN, 2000].

Apesar da maioria das células do tecido adiposo formar grandes aglomerados sustentados por fibras de colágeno, algumas células também podem ser encontradas isoladas ou em pequenos grupos no tecido conjuntivo intersticial [ALBRIGHT & STERN, 2000].

Existem pelo menos dois tipos de adipócitos nos mamíferos, marrom e branco, que diferem entre si em várias propriedades importantes, ambos derivam de células-tronco mesenquimais multipotentes (FIGURA 2).



**FIGURA 2 – Figura representativa de adipócitos maduros (tecido adiposo branco e tecido adiposo marrom).** Adipócito branco apresenta um único vacúolo lipídico grande e poucas mitocôndrias no citoplasma, seu núcleo é deslocado para a periferia pelo tamanho do vacúolo lipídico. Adipócito marrom apresenta vários vacúolos lipídicos pequenos no citoplasma e possui o núcleo centralizado com um número muito grande de mitocôndrias no seu citoplasma. [Fonte: SELL e cols., 2004].

Tecido adiposo marrom (ou pardo ou multilocular):

O tecido adiposo marrom é especializado na produção de calor (termogênese) e é encontrado em feto e crianças neonatas, porém, é eventualmente presente em humanos adultos. A maioria do tecido adiposo marrom em roedores adultos está localizada na região interescapular. Esses adipócitos têm entre 30-40  $\mu\text{m}$  de diâmetro, menores que os de tecido branco (entre 60-100  $\mu\text{m}$ ). Eles possuem várias gotículas lipídicas no citoplasma de tamanhos variados, são esféricos com núcleo centralizado e possuem várias mitocôndrias que liberam calor via oxidação de ácidos graxos. A calorigênese é garantida pela proteína desacopladora -1 (UCP-1 ou termogenina) que está localizada na membrana interna da mitocôndria e age como um canal de próton, descarregando o potencial gerado pelo acúmulo de prótons no espaço transmembrana durante a

respiração celular (ciclo de Krebs), deslocando-os para os componentes de F1F0 (ATP sintase), prevenindo a síntese de ATP e permitindo que a energia acumulada seja dissipada em calor [CANNON & NEDERGAARD, 2004]. As altas concentrações de citocromo-oxidase nestas mitocôndrias contribuem para sua coloração escurecida, amarronzada [CURI e cols., 2002].

Os animais hibernantes têm bastante desse tipo de tecido, pois o calor produzido irá manter a temperatura do corpo em períodos longos de frio.

Tecido adiposo branco (ou unilocular):

Enquanto a participação, do tecido adiposo branco, na termogênese é desprezível, sua capacidade funcional é muito grande. Este tipo de tecido adiposo possui uma distribuição generalizada em todo o corpo, ao redor, ou eventualmente infiltrado, por toda a região subcutânea, órgãos viscerais da cavidade abdominal ou mediastino e na extensão de grupos musculares oferecendo proteção mecânica, amortecendo impacto e permitindo um deslizamento suficiente ao longo das fibras musculares, sem comprometer sua integridade funcional. Além de ser um excelente isolante térmico e ter uma larga distribuição pelo corpo, incluindo a derme e tecidos subcutâneos, têm um importante papel na conservação da temperatura corporal. Assim é capaz de armazenar energia (por volta de 200.000-300.000 kCal em adultos não obesos) estabelecendo o mais importante sistema tampão para o balanço energético [AHIMA e cols., 2000; LINDSAY, 2006].

Adipócitos brancos maduros armazenam triacilglicerol (TAG) em uma única grande gota de lipídio que ocupa o centro da célula, aproximadamente 90% da massa celular e desloca o citoplasma, núcleo e outras organelas para a periferia, onde se mantém com uma fina camada de citosol. Curiosamente, durante seu desenvolvimento, os adipócitos jovens contêm múltiplas gotículas de lipídios, que coalescem para formar uma única inclusão de lipídio como em uma

célula madura. Apesar de terem um volume variável, os adipócitos brancos maduros são células grandes, 100 a 1000 vezes maiores que uma hemácia, fibroblastos e células do sistema imune e seu tamanho pode variar dependendo da quantidade de triacilglicerol (TAG) acumulado [POND, 2001].

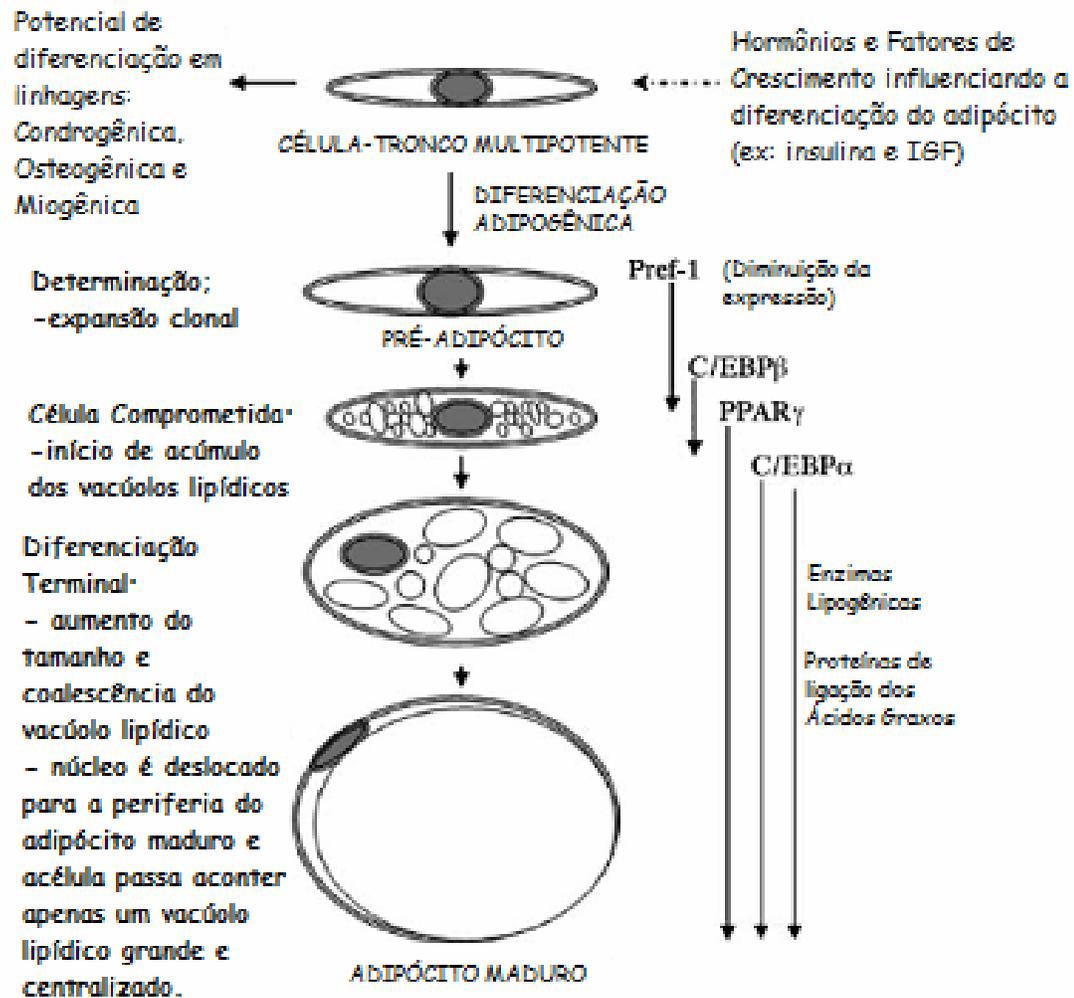
Como adipócitos maduros, os pré-adipócitos aumentam de tamanho, devido ao aumento no número de células e ao aumento no volume associado à formação lipídica [BUTTERWITH, 1994; HAUSMAN e cols., 2001; MACDOUGALD & MANDRUP, 2002; PATRICK, 2004; VON HEIMBURG, 2003a; VON HEIMBURG, 2003b].

### **1.5.1 – PROPRIEDADES DO TECIDO ADIPOSEO**

Entre todos os componentes e tipos celulares encontrados no tecido adiposo aprofundar-nos-emos nas células progenitoras (ADSC) obtidas do tecido adiposo branco, por ser o tipo mais abundante encontrado em murinos e humanos adultos, de fácil extração e por demonstrarem “*in vitro*” a capacidade de diferenciação em outros tipos celulares.

Embora tenha havido tentativas para descrever diferentes estágios celulares entre estas células progenitoras (células-tronco) e adipócitos maduros, tais estágios foram difíceis de caracterizar a nível molecular, e para efeitos práticos a maioria dos pesquisadores descrevem duas fases da adipogênese. A primeira fase, conhecida como determinação, envolve o comprometimento de uma célula-tronco multipotente na linhagem de adipócito. A fase de determinação resulta na conversão das células-tronco em pré-adipócitos, onde não podem ser morfológicamente distinguidas das células precursoras, porém perdem o potencial para se diferenciarem em outros tipos celulares. Na segunda fase, que é conhecida como diferenciação

terminal, o pré-adipócito assume as características da maturidade do adipócito - ele adquire o maquinário necessário para a síntese e o transporte lipídico, sensibilidade insulínica e secreção de proteínas específicas dos adipócitos (FIGURA 3) [ROSEN & MACDOUGALD, 2006].



**FIGURA 3 – Figura ilustrativa que representa os estágios da diferenciação em adipócitos.** Célula-tronco multipotente, com capacidade em se diferenciar em linhagens mesenquimais como mioblasto, condroblasto, osteoblasto e adipócito, origina pré-adipócito. Estas células passam por uma expansão clonal e subsequente diferenciação terminal; as células aumentam de tamanho enquanto acumulam mais vacúolos lipídicos. A exemplificação das mudanças da expressão gênica que acompanham este processo está indicada a direita, com suas durações aproximadas refletidas pelas setas. IGF = fator de crescimento tipo insulina; Pref-1 = fator-1 pré-adipócito; C/EBP = CCAAT / que aumentam proteínas de ligação; PPAR-  $\gamma$  = proliferador de peroxisoma ativado pelo receptor-  $\gamma$ . [Traduzido para português, adaptado de GREGOIRE, 1998].

Os pré-adipócitos, células precursoras comprometidas com a linhagem adipogênica, estão contidas dentro da fração estroma-vascular (SVF) de tecidos digeridos enzimaticamente. Essas células antes de diferenciadas têm aparência fusiforme semelhante ao fibroblasto (aspecto de fibroblasto indefinido) [PATRICK e cols., 1998; PATRICK, 2004]. A diferenciação dessas células resulta em mudanças morfológicas e bioquímicas onde as células tornam-se arredondadas e começam a acumular triacilglicerol e vacúolos de lipídeos [BEAHM e cols., 2003; PATRICK, 2004].

Assim como em outros campos de pesquisa com um rápido crescimento, várias nomenclaturas têm sido usadas para descrever a população de células progenitoras derivadas de tecido adiposo que são isoladas através de digestão com colagenase e apresentam características de aderência ao plástico. Exemplos destes termos que já foram citados em alguns trabalhos, são: células estromais derivadas do tecido adiposo (ASCs), células-tronco adultas derivadas de tecido adiposo (ADAS), células estromais adiposas (ASCs), células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (AdMSCs), lipoblastos, pré-adipócitos e células processadas do lipoaspirado (PLA). Para padronizar as pesquisas desta área, a Sociedade Internacional de Tecnologia Aplicada em Tecido Adiposo, chegou a um consenso e, adotou o termo células progenitoras ou células-tronco derivadas de tecido adiposo (ADSC), para identificar esta população isolada, de células multipotentes aderentes a plásticos [GIMBLE e cols., 2007].

As células progenitoras derivadas de tecido adiposo (ADSC) são consideradas mais vantajosas como uma célula fonte para diferenciar em outros tipos celulares de origem mesenquimal porque elas são facilmente isoladas, cultivadas e expandidas. Além disso, são capazes tanto de proliferar para obtenção de grandes números de células quanto de diferenciar

para a obtenção das células do tecido de interesse [AILHAUD e cols., 1992; ATALA &LANZA, 2002; DE UGARTE e cols., 2003; HEMMRICH e cols., 2005].

### **1.5.2 – CÉLULAS-TRONCO OBTIDAS DO TECIDO ADIPOSEO**

O tecido adiposo é derivado do mesênquima e contém um estroma capaz de ser isolado facilmente. A população da fração estroma-vascular (SVF) pode atingir um número significativamente elevado em comparação com outras fontes de células-tronco, além de exibir uma característica aderente em placa de cultura, estabilidade no crescimento e rápida proliferação (expansão) quando cultivada [ZUK e cols., 2001].

ZUK e colaboradores puderam verificar a capacidade de proliferação nas multilinhagens das células progenitoras de tecido adiposo (ADSC) que os levaram a especular que o tecido adiposo seria uma nova fonte de células-tronco mesodérmicas [ZUK e cols., 2001].

Conforme referido anteriormente, nos anos seguintes (2002–2006), outros estudos, *in vitro* e *in vivo*, sugeriram também um potencial para diferenciação das células progenitoras do tecido adiposo (ADSC) em linhagens ligamentares, neurogênica, endotelial, hematopoética e cardiomiogênica [HELDER e cols., 2007].

Em 2002, comprovou-se a hipótese do tecido adiposo ser uma nova fonte de células-tronco mesenquimais, caracterizando a atividade metabólica das diversas linhagens mesodérmicas, confirmando também a expressão dos múltiplos genes e proteínas específicos de cada linhagem. Além disso, as ADSC também puderam ser induzidas a expressar marcadores consistentes com o fenótipo neurogênico, sugerindo um potencial ectodérmico. A capacidade mesodérmica e

ectodérmica foi finalmente detectada em clones isolados das células encontradas no SVF [ZUK e cols., 2002].

Esta população é rica em células progenitoras e células-tronco que também são capazes de se diferenciar fenotipicamente, *in vitro*, em linhagens de células osteogênicas, condrogênicas, adipogênicas, miogênicas [ZUK e cols., 2001; ZUK e cols., 2002], e provavelmente, ligamentar, neurogênica, endotelial, hematopoética e cardiomiogênica quando tratadas com fatores específicos para cada linhagem [HELDER e cols., 2007; NAKAGAMI e cols., 2006; ROMANOV e cols., 2005].

Também está descrito que fatores de crescimento como VEGF, PDGF e TGF-  $\beta$  quando adicionados ao meio de cultura aumentam a capacidade de proliferação e diferenciação das células *in vitro* [CROISSANDEAU e cols., 2002; YUKSEL e cols., 2000].

Outra vantagem importante é que as células progenitoras derivadas do tecido adiposo (ADSC) são capazes de resistir ao processo de congelamento e degelo sem perder suas propriedades multipotenciais [RODRIGUEZ e cols., 2005]. Essa característica permite o armazenamento dessas células para utilização futura.

### **1.5.3 – ESTUDOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DAS ADSC**

Após 2 anos, outro grupo de pesquisadores concluiu que as células progenitoras derivadas de tecido adiposo (ADSC) humano secretam altos níveis de fatores angiogênicos como: fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento transformante  $\beta$  (TGF-  $\beta$ ) e fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF). Fatores estes importantes uma vez que induzem o

crescimento e/ou a diferenciação de células endoteliais e células de músculo liso [REHMAN e cols., 2004].

Devido às alterações que as células podem apresentar durante cultivo vários grupos de pesquisadores independentes têm examinado a superfície imunofenotípica das ADSC isoladas tanto da espécie humana quanto de outras espécies. Esses estudos demonstraram que o perfil destas células progenitoras de tecido adiposo varia em função do tempo em cultivo e aderência plástica. Após duas ou mais passagens em cultura as ADSC expressam adesão característica e moléculas receptoras, enzimas de superfície, matriz extracelular e proteínas do citoesqueleto assim como proteínas associadas ao fenótipo celular de células mesenquimais [MCINTOSH e cols., 2006].

Em geral, é consensual que o isolado fresco de células progenitoras de tecido adiposo humano, caracterizado por citometria de fluxo, é positivo para CD10, CD13, CD29, CD 34, CD44, CD49e, CD90, CD105, CD166 e antígeno de leucócito humano (HLA) –ABC. Existe controvérsia para algumas proteínas como CD34 e Stro-1, que provavelmente pode ser atribuída à diferença de passagens das células-tronco, afetando a expressão da proteína no momento da análise. Por exemplo, a expressão da proteína de superfície CD34 em células cultivadas e submetidas a algumas passagens é negativa, enquanto que o isolado fresco de ADSC mostrou inicialmente uma expressão alta para CD34, que progressivamente declinou [HELDER e cols., 2007; MCINTOSH e cols., 2006; MITCHELL e cols., 2005].

Contudo, foi demonstrado que as células progenitoras de tecido adiposo isoladas por digestão por meio de colagenase e centrifugação diferencial são heterogêneas. A expressão de marcadores hematopoéticos clássicos varia nas diferentes passagens. As células nas passagens iniciais expressavam entre 8,1% e 17,6% de antígenos monócito/macrofágicos e

panhematopoéticos: CD11a, CD14, CD45, CD86, e HLA-DR. Após 4 passagens sucessivas, menos que 1% das células aderentes expressaram CD14, CD45, ou CD86, enquanto apenas 3% destas células expressaram ou CD11a ou HLA-DR. Essas mudanças na imunofenotipagem parecem estar relacionadas com a diminuição na imunogenicidade das células derivadas de tecido adiposo humano. Embora a ADSC em passagens precoces (#0/#1) terem induzido uma resposta proliferativa de células T alogênicas, as células quando cultivadas até segunda e terceira passagens não induziram a proliferação de células T, indicando que as células progenitoras de tecido adiposo quando cultivadas em passagens tardias provavelmente não são capazes de promover *in vivo* uma resposta imunológica quando enxertadas em pacientes, reduzindo as chances de causar a doença enxerto-hospedeiro [MCINTOSH e cols., 2006].

YAMAMOTO e colaboradores realizaram experimentos *in vitro* com as células progenitoras de tecido adiposo de camundongos, as quais demonstraram ter várias características fenotípicas semelhantes aos estudos anteriores realizados com as ADSC de humanos. Os marcadores CD29, CD90, CD105 e Sca-1 foram expressos em muitas células do estroma, e a porcentagem de células positivas para CD34 foi baixa e negativa para CD45 [YAMAMOTO e cols., 2007].

Em 2007, foi publicado o primeiro estudo *in vivo* com transplante autólogo de ADSC em coelhos infartados, onde foram obtidos resultados funcionais, histológicos e imunohistoquímicos positivos, demonstrando a indução da angiogênese no local comprometido pela isquemia e melhora na função cardíaca nos seguintes parâmetros avaliados: fração de ejeção, índice do desempenho miocárdico, pressão diastólica final e pico da  $dP/dT+$  [ZHANG e cols., 2007].

Um estudo mais recente *in vivo*, publicado por MAZO e cols., em 2008, comparou o efeito das células mesenquimais derivadas de medula óssea de camundongo com duas populações

de células progenitoras derivadas de tecido adiposo (ADSC) de camundongo, uma com potencial angiogênico (células progenitoras de tecido adiposo) e a outra com potencial cardiogênico (células progenitoras derivadas do tecido adiposo diferenciadas em cardiomiócitos) em um modelo crônico de infarto do miocárdio em ratos através de injeção intramiocárdica. Diante de uma situação fisiopatológica desvantajosa caracterizada pela presença de tecido fibroso, eles demonstraram que células progenitoras derivadas de tecido adiposo com potencial angiogênico provocaram uma melhora na função cardíaca pela diminuição do grau de fibrose no tecido infartado quando comparadas com as células progenitoras derivadas de tecido adiposo diferenciadas em cardiomiócitos (cardiomiogênicas) e as células mesenquimais derivadas de medula óssea [MAZO e cols., 2008].

A seguir, na TABELA 5, encontram-se, resumidamente, os principais grupos e seus respectivos trabalhos envolvendo células-tronco de tecido adiposo.

ANO	GRUPO	OBJETIVO	CONCLUSÃO
2001	ZUK e cols.	Examinaram os tipos celulares constituintes e o potencial de multilinhagem da população de células-tronco mesodérmicas obtidas do tecido adiposo humano.	As células obtidas do lipoaspirado (SVF) expandem facilmente <i>in vitro</i> e exibem a morfologia de um fibroblasto. Esta População encontrada é heterogênea contendo pericitos, Células de músculo liso e células endoteliais. Têm o Potencial de se diferenciarem em multilinhagens <i>in vitro</i> : Adipogênica, osteogênica, condrogênica e miogênica quando cultivadas na presença de fatores de diferenciação estabelecidos para linhagens-específicas (células progenitoras – ADSC).
2002	ZUK e cols.	As propostas deste estudo foram confirmar se existem células-tronco no tecido adiposo e comparar o potencial de diferenciação destas células com as células mesenquimais (a população de células mais caracterizadas <i>in vitro</i> , isoladas da medula óssea).	Confirmaram a capacidade de diferenciação em multilinhagens da população de células progenitoras isolada do lipoaspirado humano (ADSC). Estas células são capazes de se diferenciarem em linhagens mesodérmicas (células-tronco) comprovado pela expressão de vários genes e proteínas linhagens-específicas, além de expressarem proteínas de superfície de células neurogênicas que levanta uma hipótese de diferenciação em linhagem ectodérmica.
2004	REHMAN e cols.	Examinaram o potencial angiogênico das células estromais do tecido adiposo investigando suas capacidades em secretar níveis bioativos de fatores de crescimento angiogênicos e antiapoptóticos, fator estimulante de colônia granulócito-macrófago (GM-CSF), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), fator de crescimento hepatócito (HGF), fator de crescimento fibroblástico (bFGF) e fator de crescimento transformante $\beta$ (TGF- $\beta$ ) e suas capacidades para servirem como vetores de células autólogas para terapia cardiovascular gênica e celular através de transplante de células estromais adiposas no músculo tibial anterior em um modelo experimental de isquemia da pata traseira de camundongo.	Seus experimentos delinearão o potencial angiogênico e antiapoptótico por um acesso fácil subcutâneo das células progenitoras de tecido adiposo que demonstraram secretar fatores de crescimento proangiogênicos com múltiplos potenciais sinérgicos. Estes achados sugerem que as células autólogas nativas ou inoculadas do tecido subcutâneo que foram reguladas por hipóxia podem ser uma nova opção terapêutica por promoverem angiogênese <i>in vivo</i> ou proteção cardiovascular.
2006	MCINTOSH e cols.	Compararam as características de aderência e o imunofenótipo da fração vascular estromal derivada do tecido adiposo humano isolado (a fresco) com várias passagens de células-tronco derivadas do tecido adiposo.	Inicialmente a fração do estroma vascular demonstrou conter uma população heterogênea, onde uma de 30 células tem característica de aderência ao plástico e de fácil expansão que são denominadas células-tronco derivadas do tecido adiposo (ou progenitoras / ADSC). Proteínas de superfície de células estromais clássicas (CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166) estão presentes em apenas 0,8 a 54% nas populações de células da fração vascular estromal. Em passagens tardias estes marcadores estão presentes em 98% na população de células-tronco derivadas do tecido adiposo.

ANO	GRUPO	OBJETIVO	CONCLUSÃO
2005	MITCHEL e cols.	Investigou e determinou a frequência da aderência e da linhagem de células progenitoras na população de células da fração vascular estromal pelo ensaio de unidade formadora de colônia (CFU) e para definir o imunofenótipo das células derivadas do tecido adiposo humano em vários estágios de isolamento, purificação e expansão analisaram através da citometria de fluxo usando marcadores associados às células endoteliais, células-tronco e células mesenquimais.	Passagens progressivas aumentam a frequência de unidades formadoras de colônias para todas as linhagens examinadas. A população de células da fração vascular estromal inclui células da linhagem hematopoiética, porém suas expressões se perdem com passagens progressivas, sugerindo que estas não pertencem à população de células aderentes. Em passagens tardias os marcadores estromais são expressos em 98% da população de células-tronco derivadas de tecido adiposo (ou progenitoras / ADSC). Os achados indicam que o processo de adesão e expansão enriquece para a seleção funcional do fenótipo celular e que o tecido adiposo possui um potencial como fontes de células-tronco adultas para terapias regenerativas.
2007	YAMAMOTO e cols.	Isolaram e coletaram supostas células-tronco multipotentes de tecido adiposo subcutâneo de camundongos usando receptor neurotrofina p75 (p75NTR) como marcador para células-tronco epiteliais. Através de citometria de fluxo, separaram as células positivas para o marcador p75NTR, cultivaram estas células e induziram a diferenciação em adipócitos, osteoblastos, condrócitos, células do músculo liso e células neuronais.	Células positivas para p75NTR e CD90, CD105 e Sca-1 foram detectadas por marcação no tecido adiposo subcutâneo de camundongo através da imunohistoquímica. As células positivas para a proteína de superfície p75NTR se diferenciaram em adipócitos, condrócitos, osteoblastos, células do músculo liso e células neuronais. A taxa de diferenciação em adipócitos, osteoblastos e células neuronais foi alta nas células positivas para p75NTR ao contrário das células negativas para p75NTR, que demonstrou ter uma taxa de diferenciação baixa. Desta maneira, provaram que o marcador p75NTR é apto para isolar células progenitoras derivadas de tecido adiposo.
2007	ZHANG e cols.	Este estudo foi designado para verificar a eficiência do transplante autólogo de células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADSC) em coelhos com infarto do miocárdio. Investigaram se um pré-tratamento "in vitro" com 5-azacytidine poderia facilitar a diferenciação celular em cardiomiócitos no tecido cicatricial, avaliaram e compararam 3 grupos com injeções intramiocárdicas: um grupo com ADSC pré-tratadas com 5-azacitidina, um grupo apenas com ADSC e outro apenas injetando veículo para controle.	Obtiveram resultados funcionais, histológicos e imunohistoquímicos positivos, demonstraram a indução da angiogênese no local comprometido pela isquemia e melhora na função cardíaca nos seguintes parâmetros avaliados: fração de ejeção, índice do desempenho miocárdico, pressão diastólica final e pico da dp/dt+ em ambos os grupos tratados com ADSC (com e sem pré-tratamento de 5-azacitidina) em relação ao grupo controle.
2008	MAZO e cols.	Compararam o potencial de células de camundongos (ADSC, AD-CMG - células-tronco derivadas de tecido adiposo pré-diferenciadas em cardiomiócitos "in vitro" e BM-MNC - células mononucleares obtidas da medula óssea) na melhora da função cardíaca após infarto crônico do miocárdio em ratos.	Demonstraram que células derivadas do tecido adiposo provocaram uma melhora na função cardíaca pelo aumento da angiogênese e diminuição do grau de fibrose no tecido infartado comparado com os grupos controle, AD-CMG e BM-MNC.

**TABELA 5 - Tabela com a relação e resumos de estudos *in vitro* e *in vivo* com ADSC.**

## 2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS:

Face à importância da doença cardiovascular para a saúde pública mundial e os resultados preliminares de ensaios clínicos com células derivadas de medula demonstrando que a terapia celular pode ser uma alternativa terapêutica, a procura por fontes de células-tronco que possam servir para a cardiomioplastia se tornou intensa.

Baseado nos fatos de que o tecido adiposo:

- É uma fonte de células-tronco mesenquimais (CTM) especialmente atrativa por ter um potencial clonogênico e, comparado com outros tecidos, conter grande número de células-tronco mesenquimais, que são facilmente cultivadas e possuem alta capacidade de rápida expansão *in vitro* [BJORNTORP e cols., 1978; COUSIN e cols., 2003; GIMBLE e cols., 2007; MEYERROSE e cols., 2007; NAKAGAMI e cols., 2006; ROMANOV e cols., 2006; SCHÄFFLER & BÜCHLER, 2007; YAÑEZ e cols., 2006];
- Apresenta uma vantagem clínica por permitir que uma grande retirada de células seja possível, sem comprometer em demasia o estado clínico do paciente, quando comparada com as metodologias empregadas na retirada de células multipotenciais em outros tecidos [COUSIN e cols., 2003].

O presente trabalho teve como objetivo geral investigar se as células progenitoras, obtidas do tecido adiposo de ratos singenéticos, poderiam ser capazes de promover melhora funcional através da terapia celular em ratos com infartos cicatrizados.

Como objetivos específicos, este estudo propôs analisar:

- A diferenciação espontânea em linhagem adipogênica da cultura de ADSC em 3ª passagem (#3) antes do preparo da mesma para a terapia intramiocárdica em ratos com infarto cicatrizado;
- A expressão ou ausência de expressão de determinadas proteínas de superfície. Informações que nos permitem estabelecer a expressão fenotípica desta fração celular através de marcação usando anticorpos CD11b, CD29, CD34, CD45 e CD90 por citometria de fluxo;
- A marcação para desmina e vimentina, proteínas presentes em células de origem mesenquimal através de ensaios de imunocitoquímica;
- A função cardíaca dos grupos infartados (tratados com ADSC e que receberam veículo) através de dados obtidos por parâmetros eletrocardiográficos, ecocardiográficos e hemodinâmicos;
- A marcação das células com HOECHST por meio da excitação direta da luz UV, seis semanas após a terapia no grupo dos animais infartados e tratados com ADSC.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS:**

#### **3.1 - ANIMAIS EXPERIMENTAIS**

Ratos de ambos os sexos, Wistar, singenéticos, pesando entre 200 e 450 g, foram obtidos do biotério do Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF) da UFRJ – Rio de Janeiro/RJ.

Os animais isogênicos foram utilizados como doadores e receptores de células com o objetivo principal de simular clinicamente a implantação autóloga de células derivadas do tecido adiposo.

Células de ratos machos (utilizados como doadores) foram processadas, cultivadas e aplicadas por via intramiocárdica em ratos fêmeas (utilizados como receptores) a fim de podermos analisar, no final do estudo, sua localização no sítio de aplicação.

Este estudo respeitou as normas do uso e cuidado com os animais de laboratório, publicado pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (NIH Publication, 1996) e aprovado pela Comissão de Ética com Animais em Experimentação Científica (Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro) – IBCCF; protocolo n.º: 026 (ANEXO A).

## **3.2 - ESTUDOS *IN VITRO***

### **3.2.1 – ISOLAMENTO DE CÉLULAS PROGENITORAS OBTIDAS DE TECIDO ADIPOSEO BRANCO**

Ratos Wistar singenéticos machos adultos jovens (~5 meses de idade), pesando entre 400 e 450 g foram utilizados para extração das células do tecido adiposo. Os animais foram anestesiados com Isoflurano (ISOFORINE – CRISTÁLIA – LOTE: 07075139) e sacrificados por deslocamento cervical. Em seguida, foi realizada a assepsia local na região abdominal e inguinal com Iodopovidona e álcool etílico 70% e uma amostra do tecido adiposo subcutâneo foi extraída, através de uma incisão cutânea na região inguinal com auxílio de um bisturi, em uma quantidade média de aproximadamente 2,0 g. A amostra coletada do tecido adiposo foi retirada com auxílio de uma pinça e tesoura, sob condições estéreis, colocada em uma Placa de Petri de vidro estéril e cortada em pequenos pedaços, com auxílio de uma tesoura curva estéril, para facilitar a futura digestão. O material foi passado para um tubo Falcon 50 ml e preenchido na proporção (1:1), com uma solução contendo 0,1% de Collagenase tipo II (WORTHINGTON® - COLLAGENASE TYPE, lote: X3M6745) diluído em PBS (10 mM, pH 7,4) para ser homogeneizado e digerido no shaker (ENVIRON SHAKER – LAB-LINE) por 45 minutos em uma temperatura à 37°C sob agitação gentil. Após o tempo de digestão acrescentou-se volume igual de meio DMEM suplementado com 20% de soro fetal bovino (BSF) (CUTILAB), este material foi centrifugado a 200xg / 10 minutos à temperatura ambiente. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento de células foi filtrado em uma rede de nylon de 80µm

para a retirada da camada de gordura (adipócitos maduros) e debris do tecido não digeridos. Após a filtragem o material foi diluído novamente em volume igual de meio DMEM e centrifugado a 200xg por 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado formado (sedimento de células) foi ressuspensão em meio DMEM suplementado com 20% de soro fetal bovino (BSF) (CUTILAB), 2mM de L-glutamina (SIGMA), 1% de penicilina streptomina (GIBCO). A partir de uma alíquota, foi feita a contagem em hematocítômetro e avaliação da viabilidade celular através da exclusão do corante Azul de Trypan.

Uma alíquota de 10 µL de suspensão de células foi retirada, incubada com 10 µL de solução de Azul de Trypan (SIGMA, EUA) a 0,4% diluído em tampão fosfato e colocada na câmara de Neubauer (HAUSSER SCIENTIFIC – HORSHAM - EUA). O número de células redondas, brilhantes e que não incorporaram o Azul de Trypan foi contado nos quatro quadrantes da câmara. O número total de células por mL foi calculado através da multiplicação da média dos quatro quadrantes pelo fator de diluição (fator de diluição = 2) e pelo volume total de meio utilizado para ressuspender o “pellet”. As células que incorporaram o Azul de Trypan foram consideradas mortas e contadas também. Observamos que mais de 95% das células estavam viáveis.

As células então foram plaqueadas na densidade de  $2,0 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> em garrafa de poliestireno de 25 cm<sup>2</sup> (FALCON O 3847, BECTON DICKSON AND COMPANY, LINCOLN PARK, NJ, EUA) pré-gelatinizadas e mantidas em DMEM suplementado com 20% de soro fetal bovino. A cultura permaneceu em condições constantes em estufa a 37°C com atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3.2.2 – EXPANSÃO DAS CÉLULAS

Após o plaqueamento, aguardamos um período de 2 dias (48 h) para obtenção da população aderente ao frasco de cultura e depois de 48 horas foi feita uma troca de meio e a população não aderente foi descartada. As células aderentes ao frasco de cultura foram mantidas em cultura com trocas regulares do meio (de 48 a 72 horas) para reposição de nutrientes e retirada de resquícios de células não aderentes. Entre o 7-10º dia após o plaqueamento, as células apresentaram 80 a 90% de confluência. Uma vez visualizado o estado de confluência, as células foram removidas dos frascos através da adição de 2 mL de tripsina-EDTA 0,25% (SIGMA) por garrafa. As células foram mantidas com a tripsina por 3-4 minutos. Durante este intervalo de tempo foi realizada agitação mecânica manual monitorada por microscópio óptico para visualização da perda de adesão das células do frasco de cultura. Em seguida, a tripsina foi inativada pela adição, em cada garrafa, de 6 mL de DMEM gelado com soro. As células retiradas dos frascos de cultura foram coletadas, centrifugadas a 250xg por 10 minutos, ressuspensas em volume conhecido de DMEM com soro e contadas em hematocitômetro.

A viabilidade celular após este procedimento foi avaliada por exclusão do corante Azul de Trypan. As células foram replaqueadas em novos frascos de cultura com superfície tratada com gelatina na densidade de  $2,0 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> em garrafa de 25 cm<sup>2</sup> contendo DMEM com 20% de BSF. Cada procedimento realizado com o uso de tripsina foi considerado como uma passagem. Normalmente, plaqueando-se essa densidade celular foi possível estabelecer um prazo de aproximadamente 5-6 dias entre cada passagem. Uma vez atingido novamente o estado de

confluência, o procedimento de tripsinização e plaqueamento foi repetido conforme descrito anteriormente. Foram realizadas três passagens com tripsina.

Foram feitas lamínulas com células após isolamento e cultivo in vitro em 3ª passagem (#3) de ADSC para análise de pré-diferenciação em adipócitos e imunofenotipagem por imunocitoquímica.

As lamínulas foram previamente gelatinizadas. Após este tratamento receberam as células plaqueadas na densidade de  $5,7 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> em #3.

As células aderidas as lamínulas foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera úmida em presença de 5% de CO<sub>2</sub> e cultivadas em meio de cultura DMEM suplementado com 20% de soro fetal bovino (BSF) (CUTILAB), 2mM de L-glutamina (SIGMA), 1% de penicilina streptomomicina (GIBCO). Quando as células atingiram um grau de semi-confluência (~80% do campo) foram fixadas em paraformaldeído 4% em temperatura ambiente e levadas para estufa a 37 °C permanecendo por 20 minutos. As lamínulas então foram lavadas 3 vezes com PBS (10 MM, PH 7,4) a 37 °C e a placa foi devidamente acondicionada refrigerada com 1mL em cada poço para que fossem coradas com OIL RED O ou marcadas com anticorpos específicos para imunocitoquímica.

### **3.2.3 – MARCAÇÃO CELULAR COM OIL RED O**

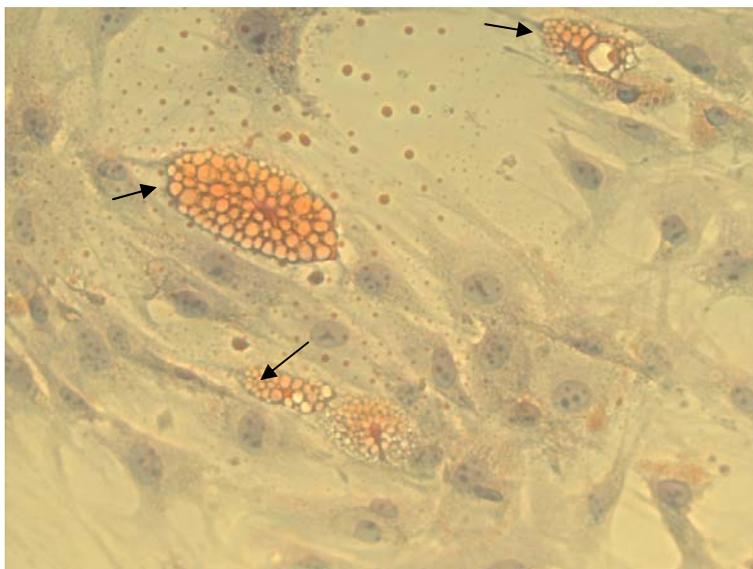
Para avaliação das culturas de ADSC foi utilizado o corante Oil Red O (Sigma), marcador de células adiposas por corar lipídeos em vermelho. Esta marcação permite analisar se a cultura em 3ª passagem (#3) está indiferenciada ou se há diferenciação espontânea antes do preparo da mesma para a terapia intramiocárdica em ratos com infarto cicatrizado.

As lamínulas, depois de fixadas, foram banhadas com solução Propilenoglicol absoluto por 5 minutos. Em seguida foram coradas com solução fresca de Oilred-O (solução estoque 0,5% em isopropanol) durante 8 minutos em estufa a temperatura de 60°C.

Posteriormente as lamínulas foram banhadas em solução de propilenoglicol 85% por 5 minutos e banhadas em água destilada. Após a marcação dos lipídeos com OIL RED O, as células foram coradas com hematoxilina de Mayer por 30 segundos, para marcação nuclear, lavadas em água corrente por 3 minutos e finalmente banhadas 2 vezes em água destilada para a montagem das lamínulas em lâminas com glicerol e visualização em microscópio óptico.

A FIGURA 4 mostra como é uma célula pré-diferenciada em adipócito (pré-adipócito), note a existência de vacúolos lipídicos corados em vermelho no citoplasma da célula.

(A)



(B)



**FIGURA 4 – Imagens ilustrativas de cultura de ADSC EM #3 pré-diferenciadas em linhagem adipogênica (pré-adipócitos).** Podemos visualizar na imagem (A) e na imagem (B) vacúolos lipídicos corados em vermelho pelo corante OIL RED O, no citoplasma das células pré-diferenciadas, apontados pelas setas. Aumento da objetiva: 40x.

### 3.2.4 - CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA POR CITOMETRIA DE FLUXO

A imunofenotipagem celular foi realizada somente nas células estromais derivadas do tecido adiposo na #3. A marcação das células foi feita através da utilização dos anticorpos relacionados na TABELA 6. Antes de iniciar a marcação, o número de células da amostra foi determinado em um contador hematológico e volume específico do material celular foi colocado em cada tubo de forma que todos tivessem o mesmo número de células. Então, 3µl de cada anticorpo foram acrescentados em diferentes tubos de ensaio de plástico identificados de acordo com os anticorpos/fluorocromo. Todos os tubos foram privados de luz e incubados em temperatura ambiente por 20 minutos. A seguir, 2ml de PBS (10 mM, PH 7,4) (LIFE TECHNOLOGIES) foram adicionados à cada tubo e o excesso de marcação foi retirado através de duas lavagens com centrifugações de 400xg por 3 minutos. Por último, as células foram ressuspendidas em 500µl PBS (10 mM, PH 7,4) (LIFE TECHNOLOGIES) e a detecção dos antígenos de marcação foi realizada utilizando um citometro de fluxo (BD FACSCANTO).

Células que não sofreram nenhuma marcação (tubo branco) foram analisadas no citômetro de fluxo a fim de ajustarmos as voltagens do equipamento bem como a sensibilidade dos fotomultiplicadores antes de procedermos a análise das células marcadas com anticorpos. Este procedimento nos permite anular a auto-fluorescência das células devido ao tempo de cultura e nos assegura que células não marcadas estarão negativas para todos os canais de fluorescência. Feito isto, a análise das células marcadas foi realizada nas mesmas voltagens setadas anteriormente com a análise do tubo branco.

Foi realizada também a marcação das células com o isotipo FITC. Esta marcação nos permite eliminar qualquer ligação inespecífica da célula com o monoclonal.

PROTEÍNAS ESTUDADAS
CD11b-FITC (CALTAG LABORATPRIES- LOT: 0104/0206)
CD29-FITC (BD PHARMINGEN™ - LOT:57378)
CD34-PE (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY – LOT: AO203)
CD45-PercP-CY5-5 (BD PHARMINGEN™ - LOT:51817)
CD90-FITC (CALTAG LABORATPRIES- LOT: 0105/0406)

**TABELA 6 - Lista dos anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromo utilizados para a marcação celular.**

### 3.2.5 – IMUNOCITOQUÍMICA

A imunocitoquímica foi realizada para marcação dos filamentos intermediários desmina e vimentina. Sendo utilizado o anticorpo primário anti-desmina (SIGMA D-1033 MONOCLONAL/ ANTI-MOUSE) e o anticorpo secundário Alexa Flúor 488 anti-mouse IgG ( MOLECULAR PROBES A1101/ POLICLONAL GOAT ). O mesmo foi feito utilizando o anticorpo anti-vimentina (SIGMA D-1033 MONOCLONAL/ ANTI-MOUSE) e o anticorpo secundário ALEXA FLÚOR 488 anti-mouse IgG ( MOLECULAR PROBES A1101/ POLICLONAL GOAT ).

As ADSC foram cultivadas sobre lamínulas em placas de 24 poços devidamente pré-gelatinizadas e fixadas em #3 com paraformaldeído 4% conforme descrito anteriormente no item 3.2.2 expansão de células. Após a fixação as lamínulas foram bloqueadas com solução de PBS (10 mM, PH 7,4) em 2% albumina por 30 minutos em temperatura ambiente. O anticorpo primário anti-desmina foi diluído em PBS (10 mM, PH 7,4) BSA 0,1% (1:200), colocado sobre as lamínulas que foram mantidas por 60 minutos a 37°C. Em seguida foram realizadas três lavagens de 10 minutos cada uma com PBS (10 MM, PH 7,4). Após as lavagens as lamínulas foram incubadas com anticorpo secundário também diluído em PBS (10 mM, PH 7,4) BSA 0,1% (1:400), por 60 minutos ao abrigo de luz a 37°C. Foram realizadas novamente três lavagens de 10 minutos cada uma com PBS (10 mM, PH 7,4).

O mesmo protocolo foi feito para a marcação com o anticorpo primário anti-vimentina, sua diluição em PBS (10 mM, PH 7,4) BSA 0,1% foi na proporção 1:300 e as lamínulas foram incubadas com anticorpo secundário também diluído em PBS (10 mM, PH 7,4) BSA 0,1% (1:400).

Em seguida todas as lamínulas foram marcadas com DAPI durante 5 minutos a temperatura ambiente. Mais três lavagens com PBS (10 mM, PH 7,4) foram realizadas. Antes de colar as lamínulas nas lâminas, foi colocado VECTASHIELD, para reduzir o decaimento da fluorescência.

As lâminas prontas foram levadas ao microscópio de fluorescência invertido AXIOVERT 130 que está acoplado a um sistema de captura de fotomicrografia digital. Este sistema dispõe de um software que processa as imagens obtidas.

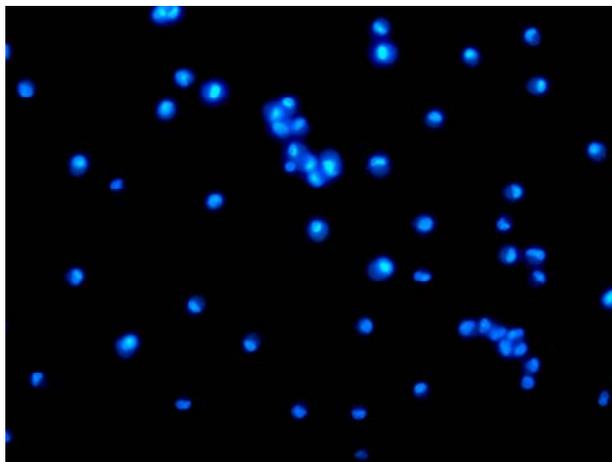
### **3.2.6 - MARCAÇÃO CELULAR COM HOECHST**

As células, injetadas nos animais, foram marcadas com um traçador nuclear (HOECHST 33342, SIGMA CHEMICAL, USA) para posterior identificação por meio da excitação direta da luz UV.

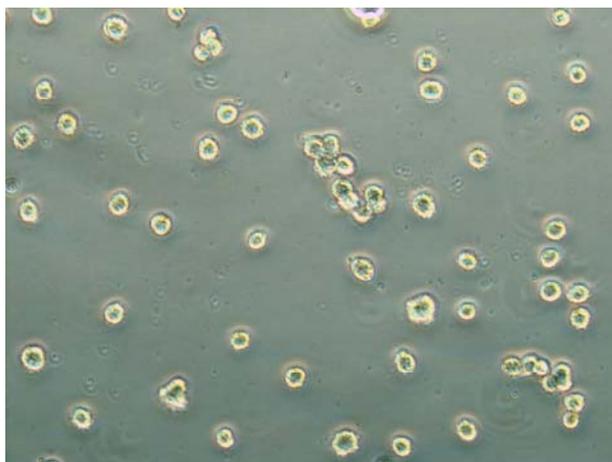
Uma alíquota de 1 $\mu$ l da solução estoque deste marcador nuclear foi diluída em 5ml de DMEM (LIFE TECHNOLOGIES) sem soro. O Hoechst diluído foi adicionado ao sedimento de células e homogeneizado. As células, privadas de luz, foram incubadas numa estufa com atmosfera úmida em presença de 5% de CO<sub>2</sub> (THERMO FORMA) durante 30 minutos. Uma alíquota das células foi examinada num microscópio de epifluorescência (AXIOVERT 100, CARL ZEISS), com excitação  $\lambda=490\text{nm}$  e emissão de 350 $\eta\text{m}$  a fim de verificar a marcação das células com o corante Hoechst 33342(FIGURA 5). Certificada a marcação, o excesso do marcador foi retirado através de três repetidas centrifugações a 480xg por 7 minutos (FIGURA 5). Então, uma nova determinação da viabilidade celular foi realizada (da forma descrita no item

3.2.1). Por último, o volume de solução foi ajustado de acordo com o número de células necessárias para o transplante.

(A)



(B)



**FIGURA 5 - Imagens ilustrativas de ADSC, coradas com HOECHST, em suspensão, visualizadas por de fluorescência.** (A) Imagem em campo escuro das ADSC marcadas com o corante nuclear hoechst antes de serem injetadas no miocárdio dos animais com infarto cicatrizado. (B) Imagem em campo claro. Imagens originais com aumento de 20x da objetiva.

### 3.3 – ESTUDOS *IN VIVO*

#### 3.3.1 - DESENHO DO ESTUDO

Os grupos experimentais foram montados de acordo com os diferentes objetivos a serem atingidos (descritos anteriormente no tópico 3.1) e são definidos abaixo:

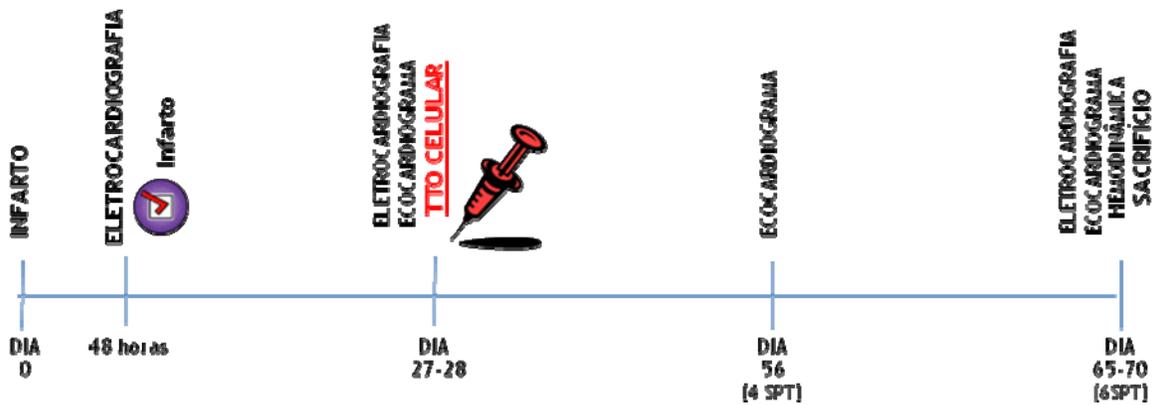
Grupos:

- Grupo infartado ADSC – Tratado com células (100µl → PBS (10 mM, PH 7,4) + Matrigel +  $2 \times 10^6$  ADSC)
- Grupo infartado CONTROLE – Tratado com veículo (100µl → PBS (10 mM, PH 7,4) + Matrigel)
- Grupo FO - Falso-operado (submetidos ao estresse do processo cirúrgico sem a ligadura permanente da artéria coronária esquerda e não receberam tratamento com células ou veículo)

Os animais foram submetidos ao infarto do miocárdio pela ligadura permanente da artéria coronária esquerda. Os animais falso-operados (FO) foram submetidos ao mesmo estresse do procedimento cirúrgico, porém sem a ligadura permanente da artéria coronária esquerda. Estes animais não apresentaram os critérios eletrocardiográficos (onda Q patológica) de lesão isquêmica.

A FIGURA 6 esquematiza a cronologia experimental. Os animais classificados como infartados, por análise eletrocardiográfica (onda Q patológica) foram divididos em dois grupos aleatoriamente. Após o 28º dia do procedimento de infarto do miocárdio (IM), os dois grupos que

receberam a ligadura permanente foram submetidos a um novo procedimento cirúrgico – injeção de células progenitoras obtidas do tecido adiposo (ADSC) ou veículo, por via intramiocárdica, dependendo do grupo selecionado. O desempenho cardíaco dos 3 grupos foi monitorado por eletrocardiografia, ecocardiografia e avaliação hemodinâmica como descrito a seguir. O número de animais em cada grupo está apresentado nos resultados.

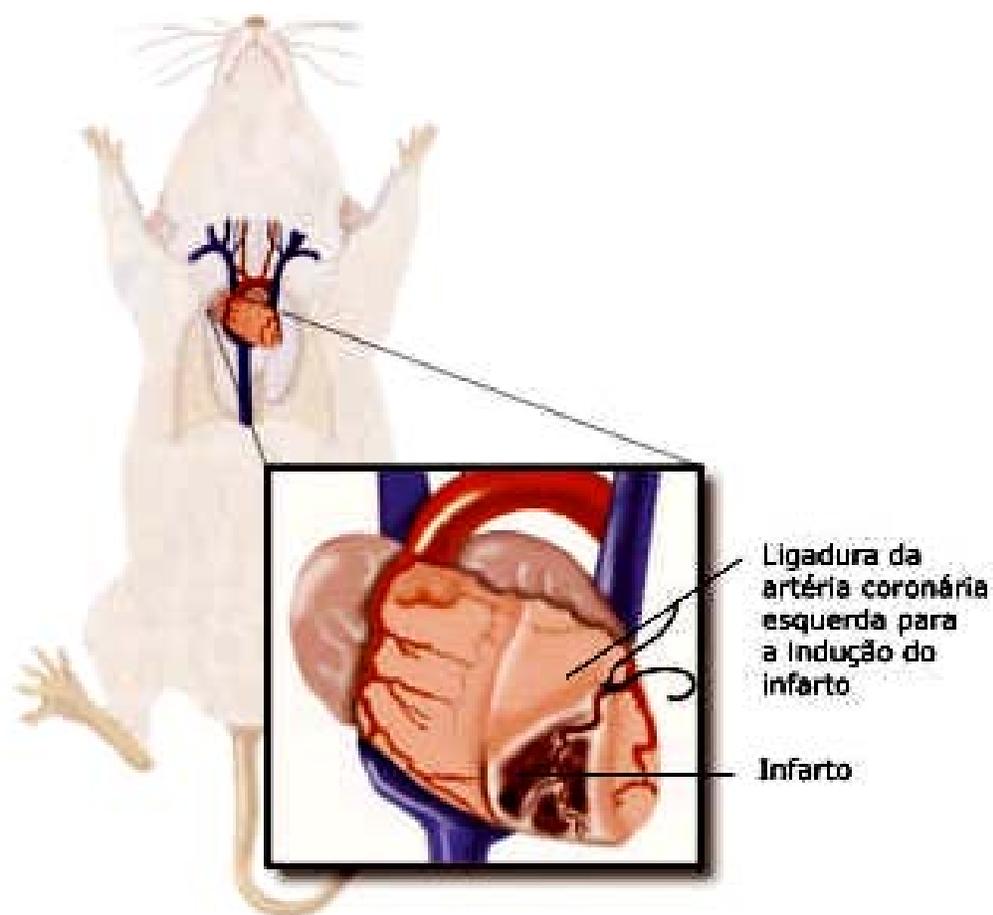


**FIGURA 6 – Ilustração da cronologia experimental. Todos os grupos foram padronizados, compostos apenas por animais do sexo feminino.**

### 3.3.2 - INFARTO CRÔNICO DO MIOCÁRDIO EM RATOS

O infarto experimental em ratos foi obtido como descrito por JOHNS & OLSON (1954) e SELYE e cols. (1978), modificado e padronizado em nosso laboratório [OLIVARES e cols., 2004]. Após a anestesia com Isoflurano (ISOFORINE – CRISTÁLIA – LOTE: 07075139), os animais foram fixados em decúbito dorsal em uma pequena mesa cirúrgica de madeira revestida por fórmica, tricotomizados em nível torácico e em seguida, submetidos ao procedimento cirúrgico que se segue: incisão da pele em nível para-esternal esquerdo, de aproximadamente 1 cm de comprimento, localizada a 1 cm da linha esternal média, na junção dos terços inferior e médio da distância entre a clavícula e o rebordo costal. Em seguida, os músculos peitorais, maior e menor, foram dissecados objetivando a visualização do gradil costal esquerdo. Neste momento, foi feita uma sutura em bolsa da pele e dos músculos da região, deixando o nó aberto até o término da cirurgia. Com o auxílio de uma pinça hemostática (Kelly reta) foi feita a incisão entre o 4.<sup>o</sup> ou 5.<sup>o</sup> espaço intercostal esquerdo, através do qual o coração foi exteriorizado por meio de uma suave compressão manual torácica direita. Após a localização da artéria coronária esquerda (geralmente sob a aurícula esquerda), a mesma foi ligada com fio de seda 6.0 através de um nó duplo, o mais próximo possível de sua origem na aorta. Em seguida, o coração foi recolocado rapidamente em sua posição anatômica original e o nó da sutura em bolsa foi finalmente apertado. Caso fosse necessário, os animais eram submetidos à ventilação mecânica através de um pequeno ambú de fabricação doméstica com o intuito de estimular os movimentos respiratórios espontâneos. O infarto crônico do miocárdio se estabelece, neste modelo animal, 28 dias após a indução do infarto, quando já há remodelamento cardíaco e tecido fibroso

reconstituindo o local que sofreu a isquemia. A FIGURA 7 mostra uma ilustração do procedimento empregado para a realização da cirurgia de infarto.

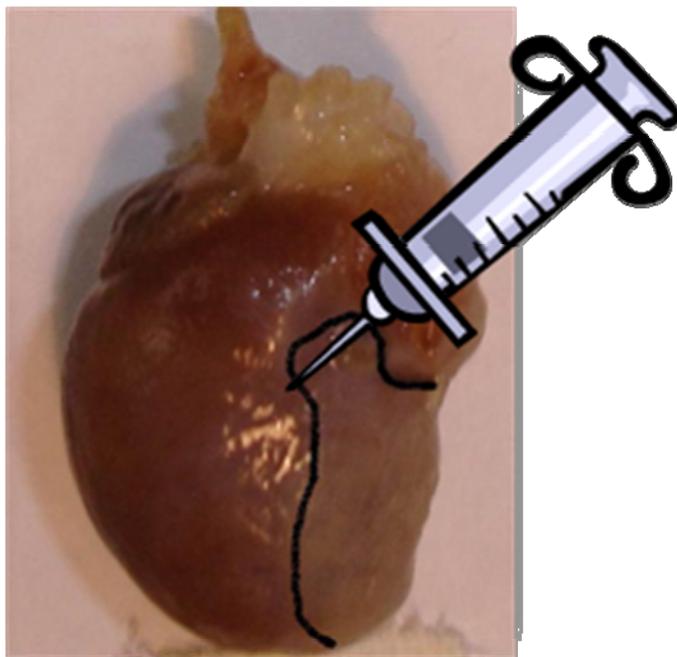


**FIGURA 7 - Figura representativa do procedimento para a obtenção do infarto experimental.** Note que a ligadura da artéria coronária esquerda é feita somente no ramo descendente anterior, deixando livre o ramo circunflexo. (Modificado de TERESE WINSIOW & LYDIA KIBIUK, stem cells: scientific progress and future research directions, national institutes of health - june 2001)

No caso do grupo falso-operado (FO), o procedimento foi semelhante, excetuando a etapa de ligadura da artéria coronária esquerda. Neste caso, o fio de sutura era passado pelo músculo cardíaco sem o aperto do nó cirúrgico. Após a recuperação da anestesia, isto é, animais exibindo atividade motora espontânea e deambulação, os mesmos eram reconduzidos ao biotério e mantidos com água filtrada e ração *ad libitum*.

### **3.3.3 - TRANSPLANTE CELULAR POR VIA INTRAMIOCÁRDICA**

Após o isolamento, marcação com Hoechst 33342, análise da viabilidade e contagem, alíquotas de 100µl de solução contendo  $2 \times 10^6$  ADSC, matrigel (BD MATRIGEL MATRIX – BD BIOSCIENCES - LOTE: 006424) e PBS (10 MM, PH 7,4) ou apenas o veículo que consistiu em uma solução contendo matrigel (BD MATRIGEL MATRIX – BD BIOSCIENCES - LOTE: 006424) e PBS (10 MM, PH 7,4) foram preparadas para injeção. Em seguida, o transplante celular intramiocárdico foi realizado 28 dias após a indução do infarto do miocárdio. Para tanto, os animais foram novamente anestesiados com Isoflurano (ISOFORINE – CRISTÁLIA® – LOTE: 07075139). Após a exteriorização do coração e a identificação da área infartada, as células ADSC ( $2 \times 10^6$  células) ou apenas o veículo foram imediatamente injetados com auxílio de uma seringa de insulina com agulha 30G, através de uma única injeção, no miocárdio viável adjacente a cicatriz (FIGURA 8). Uma vez terminado tal processo, o coração foi colocado novamente em sua posição anatômica original e o tórax suturado.



**$2 \times 10^6$  / animal**

FIGURA 8 – Figura representativa da injeção intramiocárdica com uma fração de  $2 \times 10^6$  de células na borda do infarto de cada coração dos animais do grupo ADSC (seringa de insulina com agulha 30G).

### 3.3.4 – AVALIAÇÕES FUNCIONAIS

#### i - REGISTRO ELETROCARDIOGRÁFICO (ECG)

O ECG foi realizado sob efeito dos anestésicos Ketamina (DOPALEN - VETBRANDS®, LOTE: 717/08) - (50mg/mL/Kg de peso corporal) e Xilazina (ANASEDAN - VETBRANDS®, LOTE: 464/08 ) - (5mg/mL/Kg de peso corporal). Após anestesia, os animais foram colocados em posição supina com as patas dianteiras fixadas mantendo ângulo de 90° com o tórax. O posicionamento dos animais foi rigorosamente padronizado para reduzir a variabilidade entre os registros e as interferências sobre o cálculo do ângulo do vetor médio de despolarização ventricular. Os eletrodos foram posicionados nas patas dianteiras e na coxa esquerda e o fio terra foi conectado à coxa direita. As derivações foram obtidas no plano frontal (bipolares: D1, D2, D3 e aumentadas: aVR, aVL e aVF ) e os parâmetros avaliados no ECG foram:

- a) Presença de onda Q em D1: os dados foram apresentados como frequência de ocorrência;
- b) Ângulo do vetor médio de despolarização (âQRS): o vetor médio de despolarização é o vetor resultante da soma dos vetores em D1 e aVF, ou D2 e D1. O ângulo do vetor médio de despolarização com o eixo x foi calculado utilizando a relação trigonométrica de tangente do ângulo;
- c) Índice da amplitude do complexo QRS (iQRS): soma do complexo QRS, em valores absolutos de voltagem, nas derivações DI, DII e DIII.

Para os cálculos de âQRS e iQRS foi utilizada a média de três batimentos cardíacos.

## ii – ESTUDO ECOCARDIOGRÁFICO (ECO)

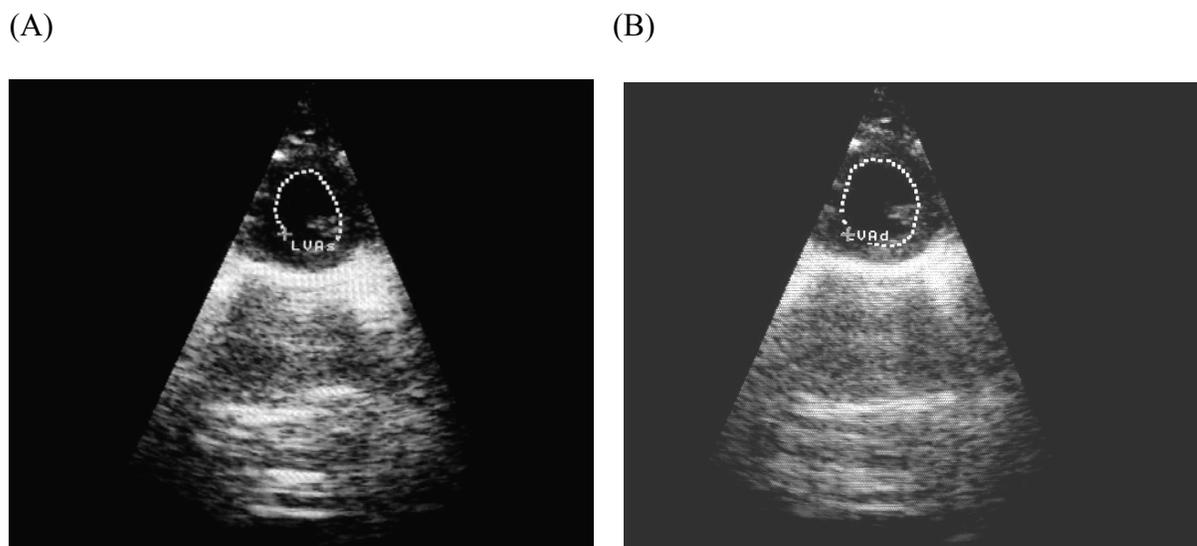
Sob efeito de anestesia, os animais foram submetidos à tricotomia na região do tórax e as imagens ecocardiográficas foram obtidas em decúbito dorsal e lateral esquerdo. Os exames foram realizados em ecocardiógrafo (MEGAS – ESAOTE) que permite a obtenção de imagens nos modos unidimensional e bidimensional. O transdutor utilizado foi do tipo eletromecânico com frequência de 10MHz. Os parâmetros analisados referentes à função cardíaca foram:

- a) Fração de encurtamento de área (FEA, %) obtida no modo bidimensional (FIGURA 9) utilizando os valores de área em diástole do ventrículo esquerdo (ADVE) e área em sístole do ventrículo esquerdo (ASVE) obedecendo à seguinte relação (FIGURA 10):

$$\text{FEA \%} = (\text{ADVE} - \text{ASVE} / \text{ADVE}) \times 100$$



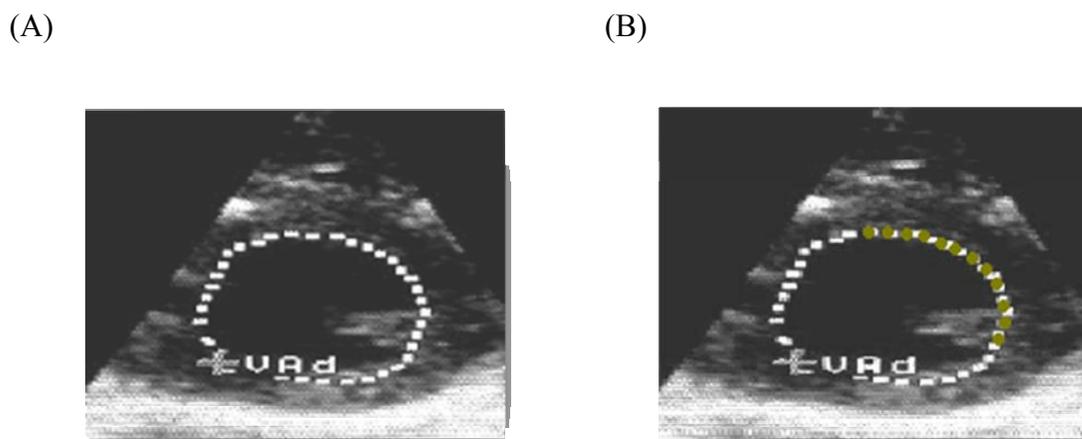
**FIGURA 9 – Imagem ilustrativa onde demonstra o corte transversal captado pelo transdutor do aparelho ecocardiográfico em um coração avaliado através do modo bidimensional pelo aparelho MEGAS ESAOTE. Imagem ecocardiográfica de um corte transversal do coração, presença do Ventrículo Direito(VD) e do Ventrículo Esquerdo(VE) na imagem captada no modo bidimensional.**



**FIGURA 10 – Cálculo da fração de encurtamento de área (FEA).** (A) Tracejado da área de um animal infartado em diástole (ADVE). (B) Tracejado da área do mesmo animal em sístole (ASVE).

- b) Percentual de acinesia do ventrículo esquerdo (IM,%) obtida no modo bidimensional utilizando os valores do perímetro em diástole da área infartada (PDInf) e o perímetro em diástole total do ventrículo esquerdo (PDTVE) obedecendo à seguinte relação (FIGURA 11):

$$\text{IM \%} = (\text{PD Inf} / \text{PDTVE}) \times 100$$



**FIGURA 11 – Cálculo do percentual de acinesia do VE.** Obtido através da mensuração do PDTVE (A) e do PDInf (B) ao final da diástole.

- c) Fração de ejeção (FE%) obtida no modo unidimensional (MODO-M) utilizando os valores calculados do diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE) e diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo (DSVE), diretamente pelo aparelho (MEGAS – ESAOTE).

A análise ecocardiográfica foi realizada por um único observador que desconhecia a procedência dos animais e os grupos experimentais aos quais eles pertenciam. Imagens do eixo transversal do ventrículo esquerdo foram realizadas ao nível dos músculos papilares para a obtenção das medidas Bidimensionais e no Modo-M.

### **iii - AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA**

Os animais foram anestesiados com ketamina e xilasina e uma cânula de polietileno foi inserida no ventrículo esquerdo através da artéria carótida comum direita para medida da pressão ventricular (FIGURA 12). A cânula foi confeccionada com polietileno PE-50 (diâmetro interno 0,58mm e externo 0,965mm, comprimento de 4 cm) soldado a uma extremidade PE-10 (diâmetro interno 0,28 mm e externo 0,61 mm, comprimento de 5 cm). A extremidade PE-10 foi introduzida na carótida e a chegada da cânula no ventrículo esquerdo foi confirmada através do perfil de pulso de pressão visualizado na tela do computador. Uma vez obtido o registro estável e típico de pressão ventricular esquerda, a cânula foi fixada ao vaso com linha de costura e a extremidade PE-50, passando pelo tecido subcutâneo, foi exteriorizada entre as escápulas para posterior registro do animal acordado. As cânulas foram mantidas com heparina (500 UI/mL) para evitar a formação de coágulos e permitir o registro da pressão ventricular esquerda. Após a

cirurgia de cateterização, foi feito o registro da pressão ventricular nos animais anestesiados (FIGURA 13). A cânula dos animais foi previamente lavada com aproximadamente 200  $\mu$ L de solução de NaCl 0,9% contendo 500 UI/mL de heparina para dissolução de coágulos e em seguida a extremidade PE-50 foi conectada a um transdutor de pressão mecanoelétrico (MLT0380/D, AD INSTRUMENTS) cujo sinal foi amplificado, convertido de analógico para digital (POWER- LAB400) e visualizado em um monitor de computador através do programa CHART 4.0. Os dados foram adquiridos com a frequência de amostragem de 1000 Hz e armazenados para posterior análise.

Os parâmetros obtidos a partir do registro de pressão ventricular esquerda foram:

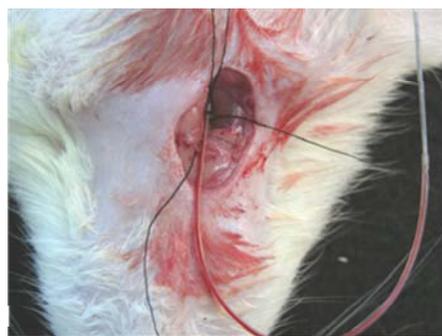
- a) Frequência cardíaca (FC, bpm): obtida pelo intervalo de pulso da pressão ventricular;
- b) Pressão diastólica final (PDF, mmHg): valor medido imediatamente antes da contração isovolumétrica;
- c) Pressão sistólica (PS, mmHg): pressão de pico do pulso de pressão ventricular;
- d) Pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE, mmHg): diferença entre a PS e PDF;
- e) Índice de contratilidade cardíaca ( $dp/dT+$ , mmHg/s): valor máximo de aumento de pressão por segundo obtido pelo valor de pico da primeira derivada do sinal de pressão ventricular;
- f) Índice de relaxamento cardíaco ( $dp/dT-$ , mmHg/s): valor máximo de redução de pressão por segundo obtido pelo valor mínimo da primeira derivada do sinal de pressão ventricular;

Os parâmetros foram obtidos do trecho estável do registro e foram utilizados 10 batimentos consecutivos para obtenção da média representativa.

(A)



(B)



(C)



**FIGURA 12 – Processo cirúrgico de canulação da artéria carótida direita.** (A) Visualização da artéria carótida direita do rato. (B) Introdução de uma cânula (P10), através da artéria carótida direita, até a cavidade ventricular esquerda. (C) Exteriorização da cânula na região dorsal superior do animal.

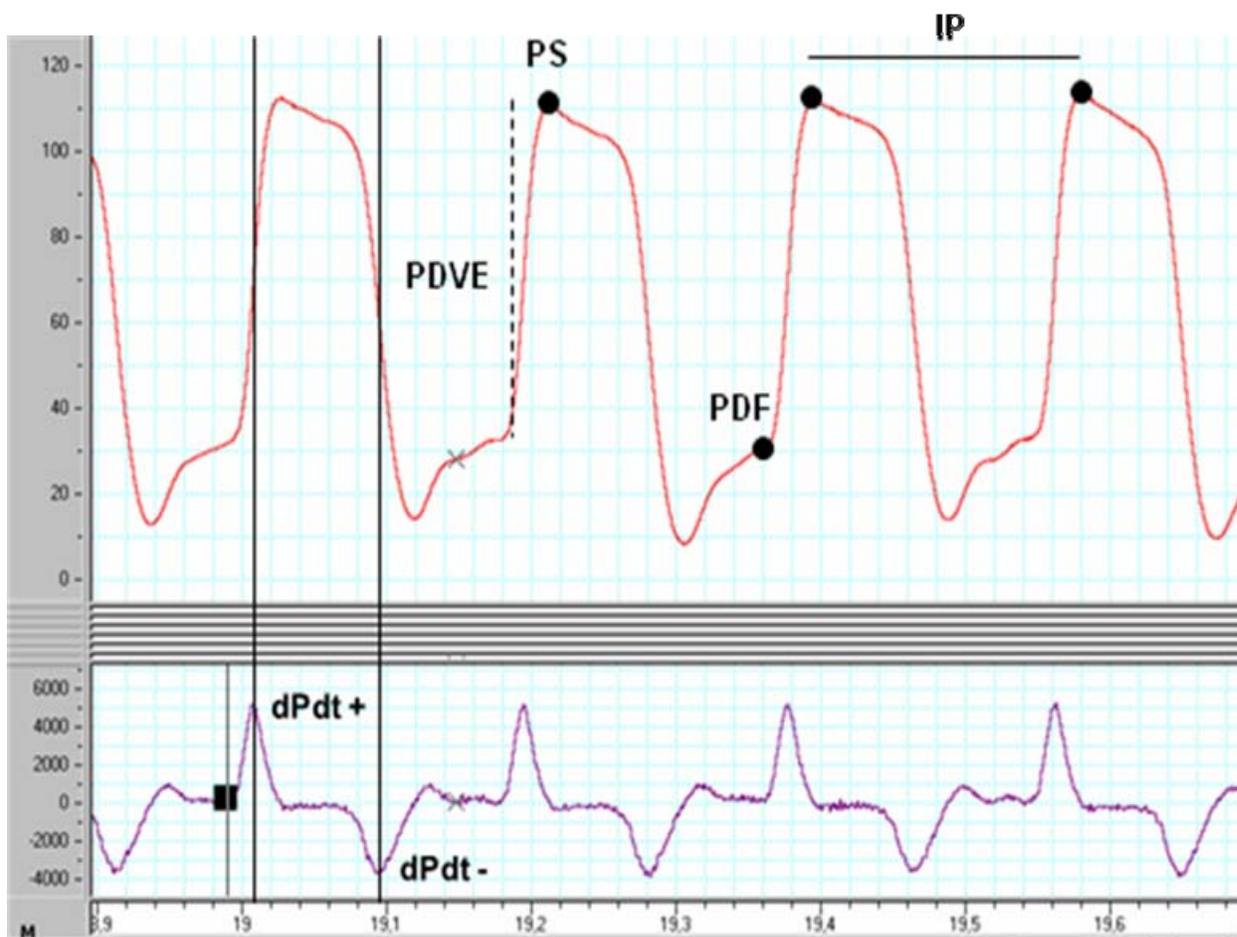


FIGURA 13 – Sistema de registro das pressões intraventriculares, registro das pressões ventriculares e derivada da curva de pressão sobre o tempo.

### 3.4 – *POST MORTEM*

#### 3.4.1 - AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E OBTENÇÃO DO TAMANHO DO INFARTO

Ao final do protocolo experimental, os animais foram anestesiados com éter e sacrificados por deslocamento cervical. Os corações foram removidos rapidamente através de toracotomia e lavados com solução PBS (10 mM, PH 7,4) enriquecida em KCl (30mM) por 3 a 5 minutos. O coração então foi parado em diástole. Após completa parada em diástole, o coração foi transferido para recipiente contendo aproximadamente 40 mL de solução de paraformaldeído 4% em PBS (10 mM, PH 7,4). A fixação do tecido foi feita por imersão durante um período médio de 24 a 96 horas. Após este tempo, os corações foram cortados em 4 fatias denominadas A, B, C e D do ápice para a base, respectivamente (FIGURA 14). Em seguida, as fatias foram lavadas em água destilada para retirada do excesso de fixador e então foram submetidas à desidratação por gradiente crescente de etanol (70, 80, 90 e 100% com 60 minutos de permanência em cada concentração).

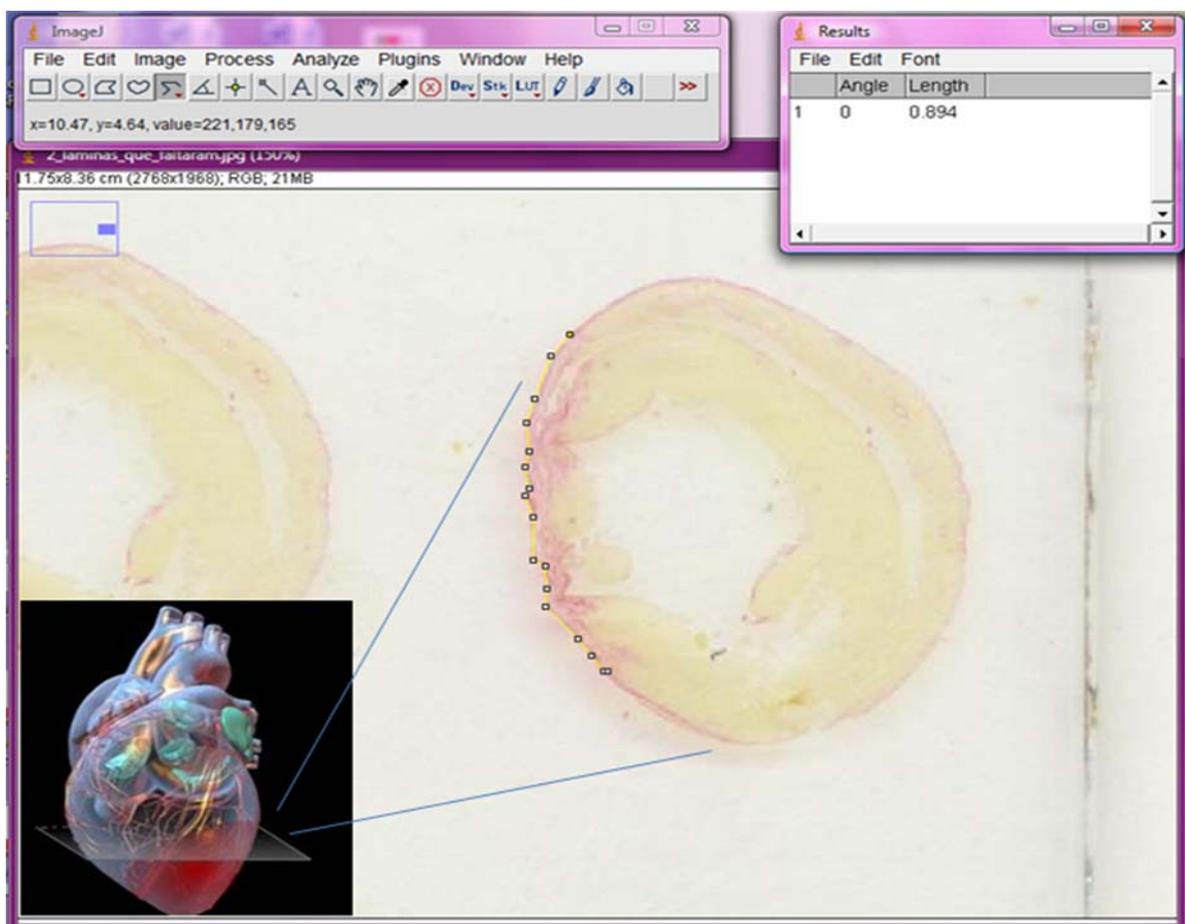


**FIGURA 14 – Fotos das fatias dos corações para processamento histopatológico.**

Após desidratação as fatias foram clarificadas em 3 banhos de 40 minutos cada de xilol e depois impregnadas em 3 banhos de 60 minutos cada de parafina a 60°C. Após impregnação, as fatias foram incluídas em parafina para corte em micrótomo a 5 mm.

Os procedimentos de coloração foram realizados após re-hidratação das lâminas histológicas através da bateria inversa de xilol e gradiente decrescente de etanol (100, 90, 80 e 70%). A coloração de Picosirius teve por objetivo permitir o cálculo do tamanho do infarto visto que esta coloração diferencia o tecido infartado (marcação em vermelho do tecido rico em colágeno) do tecido viável (marcação em amarelo).

As lâminas com coloração de Picosirius foram digitalizadas e analisadas pelo programa Image J (FIGURA 15). O tamanho do infarto foi calculado separadamente em cada fatia (A, B, C e D). Para este cálculo, foi medido o perímetro total do epicárdio do ventrículo esquerdo e o perímetro correspondente à área infartada marcada em vermelho. Em seguida, foi então obtido um valor percentual de infarto para o epicárdio e o mesmo foi feito para o endocárdio, em cada fatia. Logo, o percentual de infarto de cada fatia foi definido como a média entre o percentual infartado do epicárdio e o percentual infartado do endocárdio. O tamanho do infarto em cada coração foi calculado pela média das fatias A, B, C e D.



**FIGURA 15** – Ilustração da morfometria cardíaca para mensuração da área de infarto do miocárdio (endocárdio e epicárdio), realizada pelo programa **IMAGE J**. A mensuração foi feita na área corada em vermelho (fibrose – tecido rico em colágeno) com corante sírius red.

### 3.5 - ESTUDO ESTATÍSTICO

Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão (SEM). Para análise entre dois grupos foi utilizado teste t de Student não pareado ou pareado, dependendo da situação experimental. Análise entre 2 ou mais grupos onde dois fatores foram estudados (tempo e injeção intramiocárdica) como fonte de variação entre os grupos foi feita utilizando-se análise de variância de duas vias (ANOVA TWO-WAY) complementada com o pós-teste de Bonferroni. A diferença entre os grupos (grupo e tempo) foi testada por ANOVA utilizando-se análise de variância uni variada (ANOVA ONE-WAY). O grau mínimo de significância foi 5% ( $p < 0,05$ ) e os cálculos foram realizados, utilizando o programa GRAPHPAD PRISM (New York, EUA).

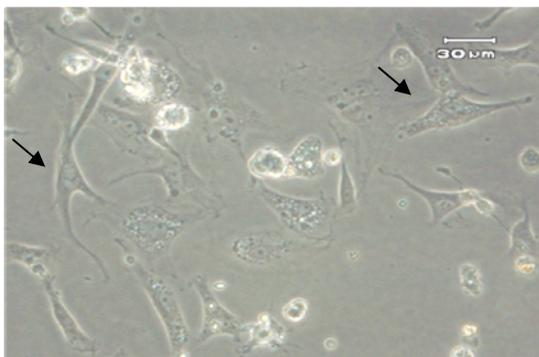
## 4. RESULTADOS

### 4.1 - CULTURA DE ADSC E MARCAÇÃO COM OIL RED O

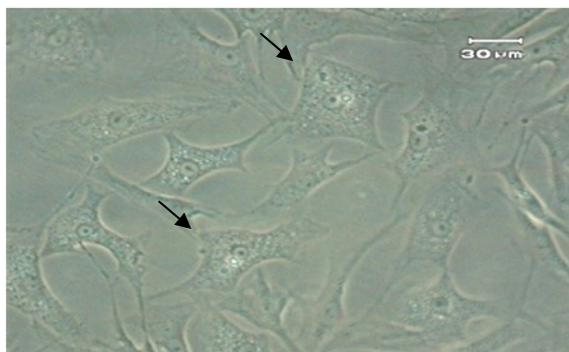
As culturas atingem 85% a 90% da confluência dentro de 5-6 dias após o plaqueamento das células nas passagens #1, #2 e #3. A FIGURA 16 mostra foto de campo claro representativo da cultura de ADSC na 3.<sup>a</sup> passagem. Nota-se que neste estágio a cultura apresenta uma população de células aderentes ao frasco de cultura, morfologicamente semelhantes a fibroblastos, com o tamanho mínimo de 30  $\mu$ m.

As fotos (A; B) da FIGURA 17 ilustram as culturas de ADSC em #3 antes e depois de serem coradas com OIL RED O, note que não há presença de células com gotículas de lipídeos coradas em vermelho, demonstrando que as células em #3 se encontravam indiferenciadas no momento do processamento para serem injetadas nos corações dos ratos com infarto cicatrizado.

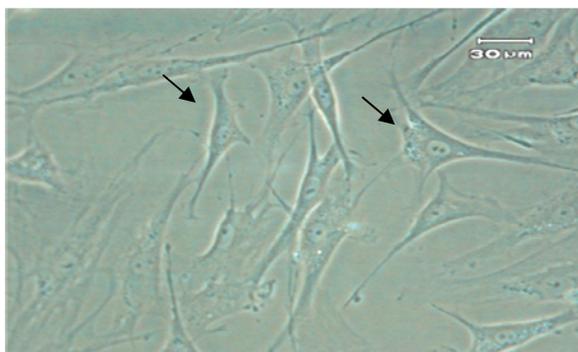
(A)



(B)

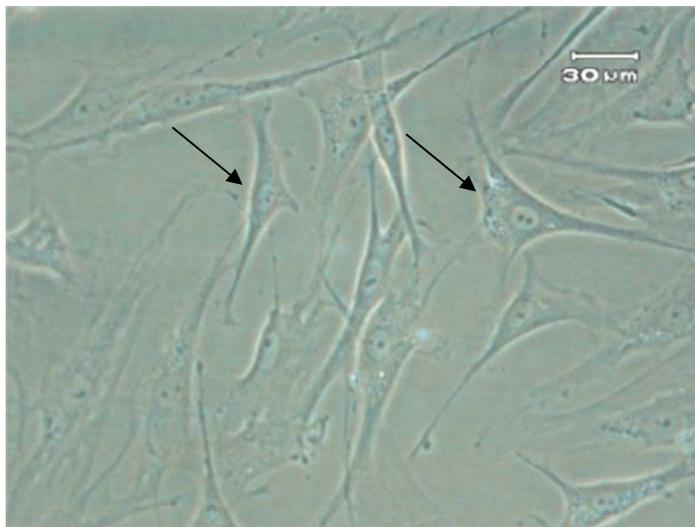


(C)

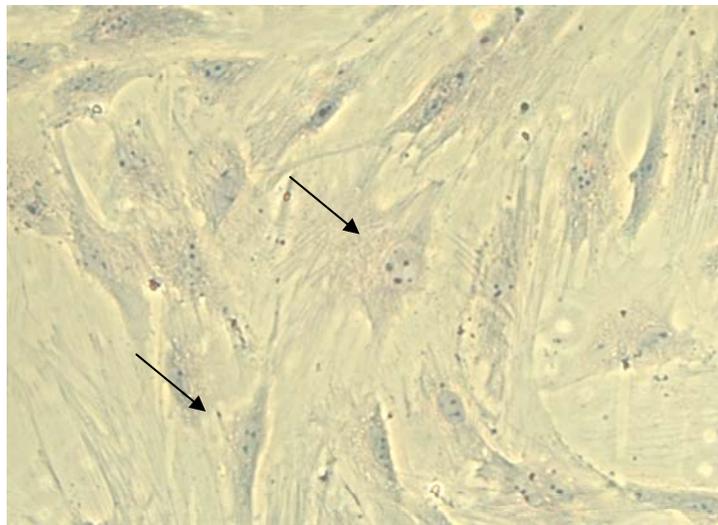


**FIGURA 16 -** Imagens de ADSC em cultura, células indicadas pelas setas (1ª, 2ª e 3ª passagens) – aumento de 40x da objetiva. (A) #1; (B) #2; (C) #3.

(A)



(B)



**FIGURA 17 – Imagens de ADSC em cultura (3ª passagem) – aumento de 40x da objetiva – OIL RED.** (A) Foto das ADSC em cultura; (B) foto das ADSC fixadas em lamínula e coradas com OIL RED O, observe a ausência de vacúolos lipídicos nas células indicadas pelas setas, demonstrando não haver células pré-diferenciadas em linhagem adipogênica.

## 4.2 – IMUNOFENOTIPAGEM DAS ADSC POR CITOMETRIA DE FLUXO

As células injetadas foram caracterizadas por citometria de fluxo com o objetivo de conhecermos a expressão ou ausência de expressão de determinadas proteínas. Este conjunto de informações nos permitiu estabelecer a expressão fenotípica desta fração celular.

A imunofenotipagem foi realizada com células ADSC em 3ª passagem (#3/N=2). Os dados encontrados na análise estão ilustrados na TABELA 7. Na análise das ADSC em #3 observamos a existência de duas populações distintas: a primeira (P1), majoritária, representando 99,0% do total de células analisadas e a segunda (P2) representando 1% do total de células (FIGURA 18). Desta fração celular encontramos características fenotípicas de células-tronco mesenquimais e hematopoéticas:

- A primeira população (P1), representada por 99% das células analisadas, é CD11b –; CD29++; CD34-; CD45+low; CD 90++
- Já a segunda população (P2), apresenta uma expressão das proteínas estudadas bem homogênea que representa 1% das células analisadas, é CD11b +; CD29+; CD34+ ; CD45++ ; CD 90+.

Podemos observar nos Histogramas (FIGURA 19 e FIGURA 20) o tamanho da população P1 e suas respectivas marcações. Como MCINTOSH e colaboradores já haviam relatado em 2006, as ADSC apresentam características heterogêneas de células mesenquimais, endoteliais como também características pan-hematopoéticas. Segundo MITCHEL e cols. [2005], ao longo das passagens estas características são perdidas, prevalecendo as das células mesenquimais.

PROTEÍNAS ESTUDADAS	Porcentagem
CD11b -	100%
CD34 -	100%
CD45 + low	100%
CD29 ++	100%
CD90 ++	89,9%

**TABELA 7 – Imunofenotipagem das ADSC em 3# por citometria de fluxo.** Esta tabela demonstra a porcentagem encontrada dos marcadores na população P1, analisada no citômetro (BD FACSCANTO) (N=2).

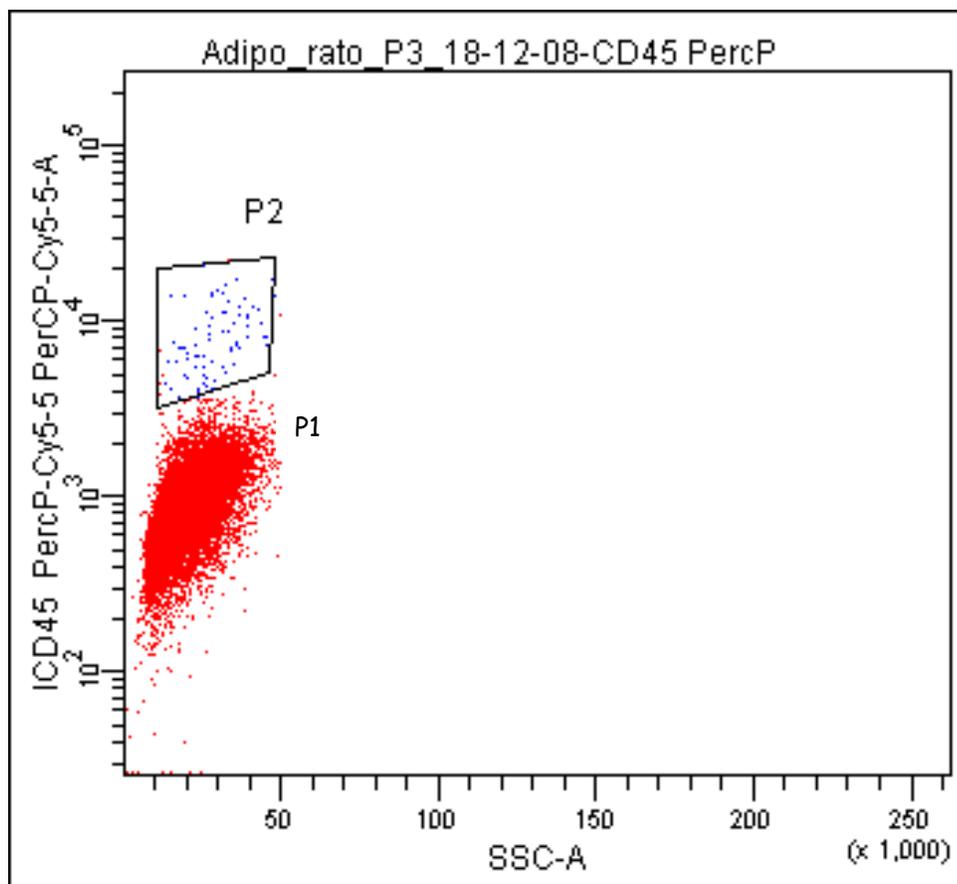


FIGURA 18– Histograma da citometria de fluxo das ADSC em 3ª passagem. Observação das populações encontradas: população 1 (P1) e população 2 (P2).

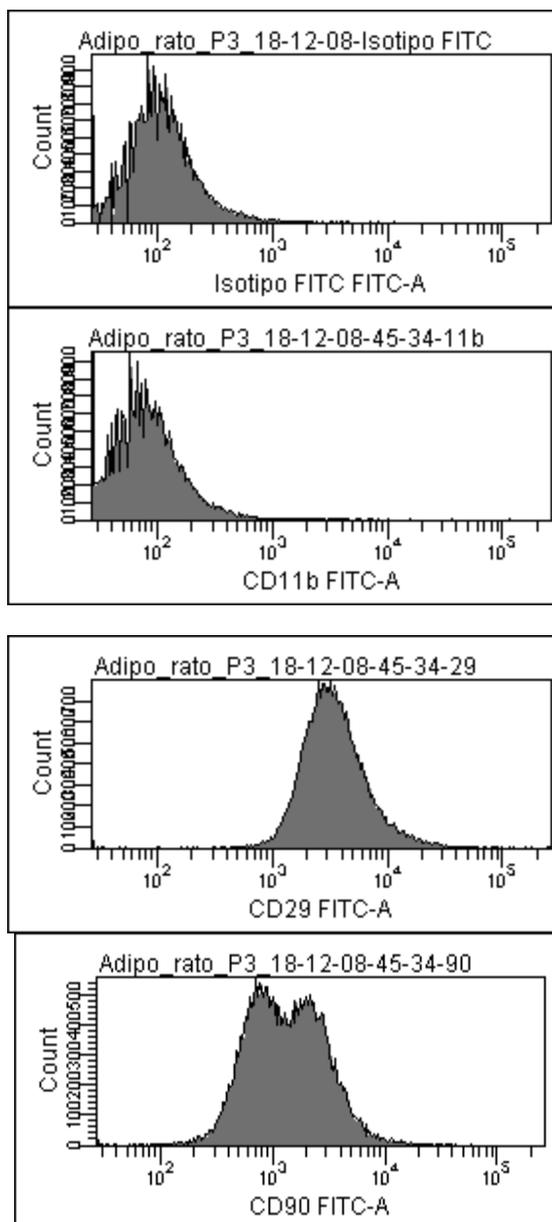
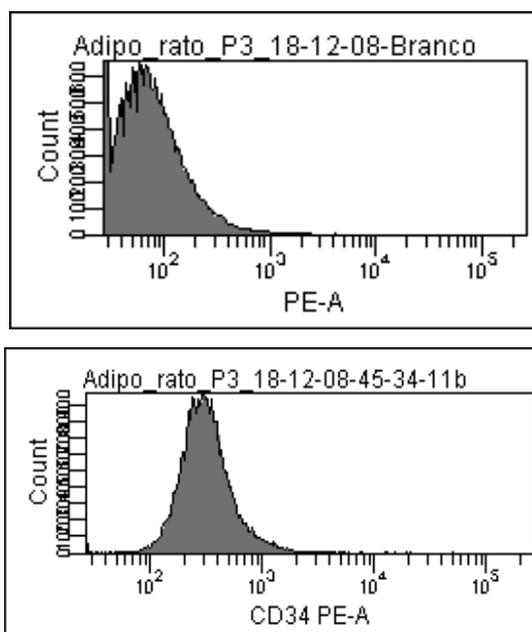


FIGURA 19– Histogramas da citometria de fluxo das ADSC em 3ª passagem. CD11b-; CD29++; CD90++.

(A)



(B)

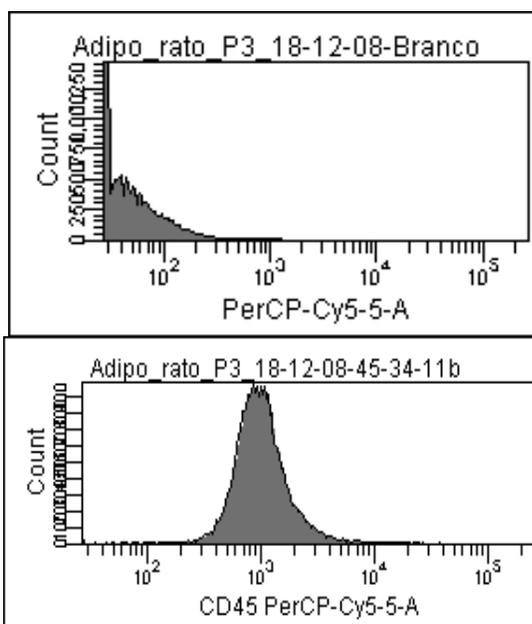


FIGURA 20– Histogramas da citometria de fluxo das ADSC em 3ª passagem. (A) CD 34-; (B) CD45<sup>low</sup>.

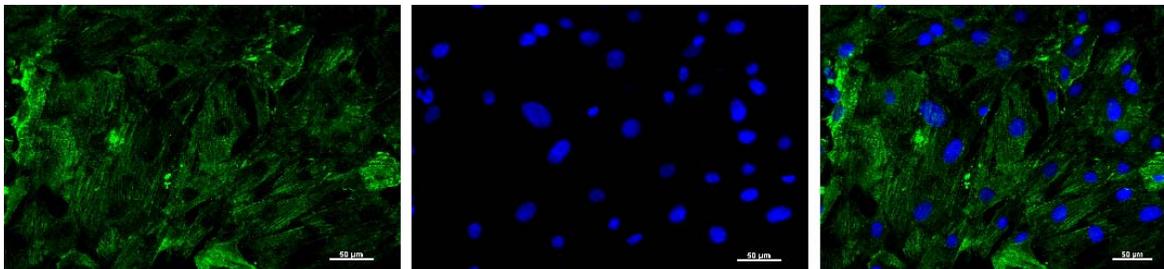
### 4.3 - IMUNOCITOQUÍMICA DAS ADSC

A fim de avaliar se as ADSC apresentam marcação constitutivamente de proteínas de células de origem mesenquimal em 3ª passagem (N=2) ensaios de imunocitoquímica foram realizados para desmina e vimentina.

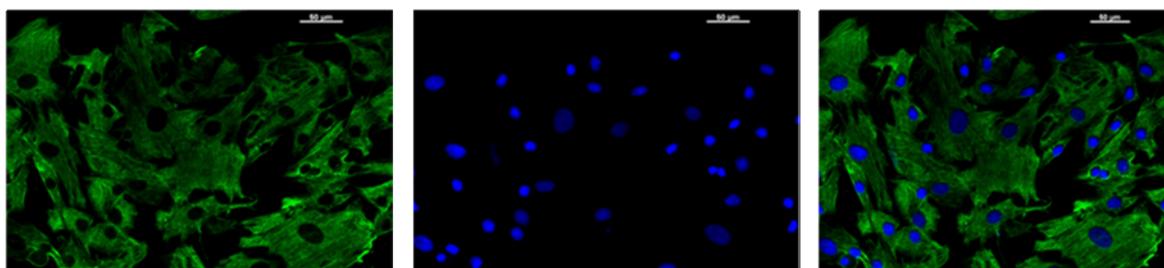
O núcleo das células foi marcado por DAPI, um marcador que se liga fortemente ao DNA e é capaz de passar pela membrana intacta das células.

Em nosso estudo, as ADSC apresentaram marcação positiva para desmina, vimentina e para DAPI, em todas as células da amostra, em #3 (FIGURA 21 - A; B).

(A) Desmina #3



(B) Vimentina #3



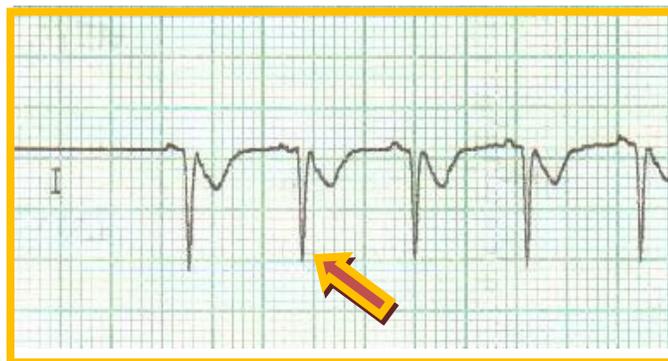
**FIRGURA 21 –** Imagens de imunocitoquímica das ADSC em 3<sup>a</sup> passagem (marcação para desmina e vimentina). (A) marcação para desmina, marcação para dapi e colocalização das duas fotos para demonstrar as células marcadas com desmina com seus respectivos núcleos. (B) marcação para vimentina, marcação para dapi e colocalização das duas fotos para demonstrar as células marcadas com vimentina com seus respectivos núcleos (N=2).

#### 4.4 - AVALIAÇÃO ELETROCARDIOGRÁFICA

Em relação ao ECG, podemos observar que a presença de onda Q em DI, uma característica predominante nos animais infartados por oclusão permanente da artéria coronária esquerda, não ocorre nos animais do grupo FO (N=5) (FIGURA 22). Nestes, assim como nos animais normais, o perfil eletrocardiográfico foi caracterizado pela ausência de onda Q na derivação DI. Desta forma, a presença de onda Q em DI foi parâmetro fundamental para considerar presença de lesão isquêmica nos animais tanto do grupo tratado com células (ADSC/N=10\*) como do grupo tratado apenas com veículo (CONTROLE/N=7\*). \*O número de animais nos grupos infartados ADSC e CONTROLE foi menor, devido às interferências que alguns eletrocardiogramas apresentaram nas derivações D2 e aVF, dificultando o cálculo do ângulo do vetor médio de despolarização e índice de amplitude do complexo QRS.



ECG de um animal Falso Operado



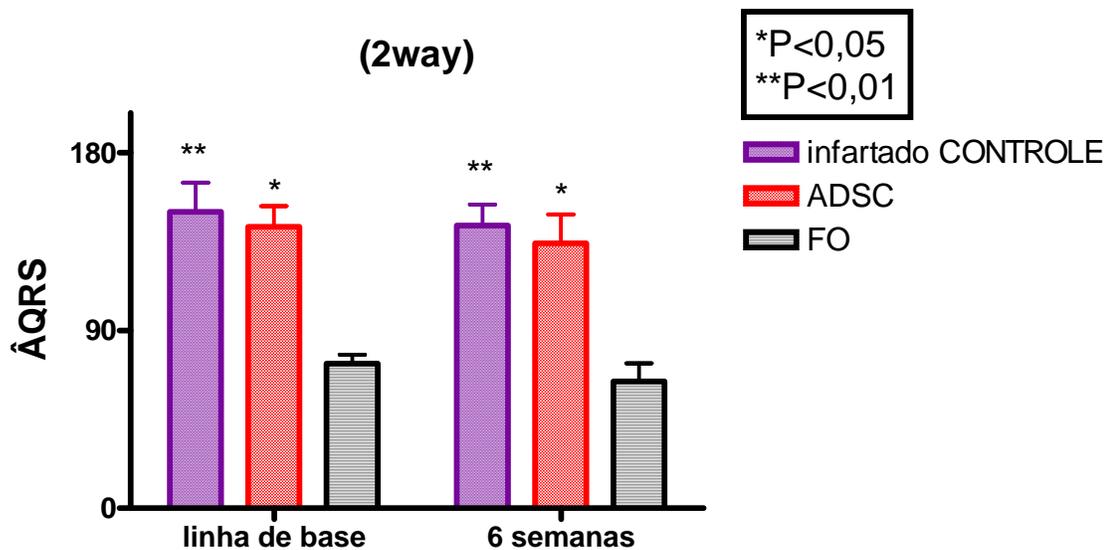
ECG de um animal infartado

**FIGURA 22 - Registros eletrocardiográficos em derivação DI, 48 horas após a ligadura permanente da artéria coronária esquerda.** Presença de onda Q indicada pela seta no ECG do animal infartado.

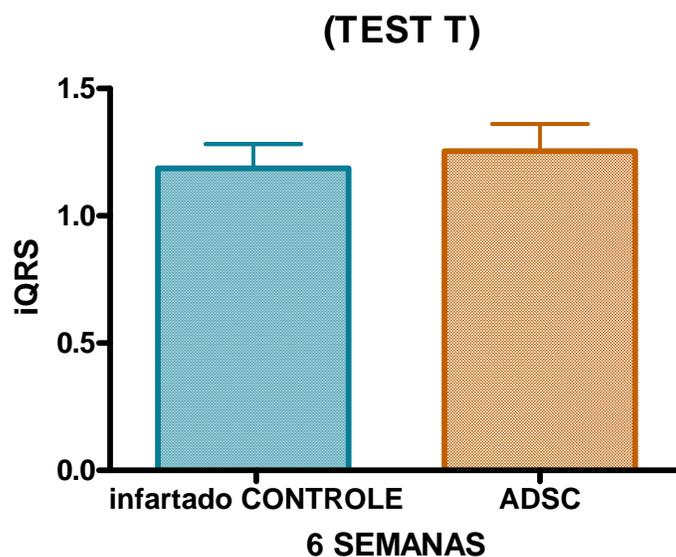
Com relação à orientação do ângulo do vetor médio de despolarização ventricular ( $\hat{a}QRS$ ), observamos na FIGURA 23; (A), que nos animais do grupo Falso Operado (FO) o  $\hat{a}QRS$  encontrava-se entre 0 e 90° (vetor de despolarização para esquerda), assim como é encontrado em animais normais. Entretanto, nos animais submetidos à oclusão permanente (grupo infartado ADSC e infartado CONTROLE), o  $\hat{a}QRS$  localizou-se entre 90° e 180° (vetor de despolarização para direita) (TABELA 8). Não houve diferença significativa quanto ao  $\hat{a}QRS$  entre os grupos que receberam ligadura permanente em relação ao tempo (linha de base vs 6 semanas pós-tratamento). Este resultado sugere que todos os animais permaneciam com uma extensão muito grande de infarto em ambos os grupos mesmo após a terapia celular (FIGURA 23; A).

Não observamos diferença significativa quanto ao índice de amplitude do complexo QRS ( $iQRS$ ) entre os dois grupos infartados: ADSC e CONTROLE ( $p>0,05$ ), 6 semanas após a terapia (FIGURA 23; B).

(A)



(B)



**FIGURA 23 – Parâmetros eletrocardiográficos, média das análises:  $\hat{A}QRS$  e iQRS dos registros de ECG.** (A) gráfico que representa  $\hat{A}QRS$  dos animais dos grupos: infartado CONTROLE (N=07), infartado ADSC (N=10) e FO (N=05) 28 dias após o infarto permanente (linha de base) e 6 semanas após a terapia; (B) gráfico que representa iQRS dos grupos CONTROLE e ADSC 6 semanas após a terapia.

	Infartado CONTROLE (N=7)	Infartado ADSC (N=10)	FO (N=5)
ONDA Q EM DI	7/7 +	10/10 +	0/5 -
ÂNGULO QRS (vetor de despolarização)	143±10,59 Esquerda 0/Direita 7	134±14,64 Esquerda 0/Direita 10	64,16±9,27* Esquerda 5/Direita 0

média erro padrão \*  $p < 0,001$  em relação ao grupo FO

**TABELA 8- Parâmetros eletrocardiográficos (presença de onda Q e âQRS) de animais dos grupos infartados CONTROLE, ADSC e FO, 6 semanas após a terapia.**

#### 4.5 - AVALIAÇÃO ECOCARDIOGRÁFICA

Nos grupos infartados (ADSC/N=11) e (CONTROLE/N=9\*), 28 dias depois da ligadura permanente da artéria coronária esquerda (infarto), foi possível observar que todos os animais apresentaram comprometimento da função cardíaca, a fração de encurtamento de área (FEA) se encontrou abaixo de 40% enquanto que o percentual de acinesia do ventrículo esquerdo (%IM) se encontrou acima de 40%. Já o grupo FO (N=5) apresentou valores normais destes parâmetros (TABELA 9). \*Um animal do grupo infartado CONTROLE apresentou aderência do coração na parede torácica na 4<sup>a</sup> semana após a injeção, a janela de visualização das câmaras cardíacas dificultou a mensuração dos parâmetros ecocardiográficos. Este animal foi descartado desta análise.

Vinte e oito dias após a cirurgia os animais infartados já possuíam alterações significativas dos parâmetros sistólicos e da geometria ventricular. Neste mesmo momento, a FE (FIGURA 24; A) e a FEA (TABELA 9) foram menores em todos os ratos submetidos ao infarto quando comparados aos animais do grupo FO ( $p < 0,05$ ). Na TABELA 9, também pode ser observada a presença acinesia na parede anterior do VE (IM%) e o cálculo do percentual desta acinesia ventricular obtido nos grupos infartados (grupo ADSC e CONTROLE) revelou valores semelhantes (IM%: grupo ADSC =  $72,1 \pm 5,07$ ; grupo CONTROLE =  $64,6 \pm 7,55$ ,  $p > 0,05$ ) enquanto o grupo FO não apresentou acinesia.

Os dados referentes à fração de ejeção (FE%) estão representados na FIGURA 24 (A; B). Podemos observar que os dois grupos que receberam a ligadura permanente (infarto do miocárdio) encontravam-se homogêneos 28 dias após o infarto e imediatamente antes da terapia

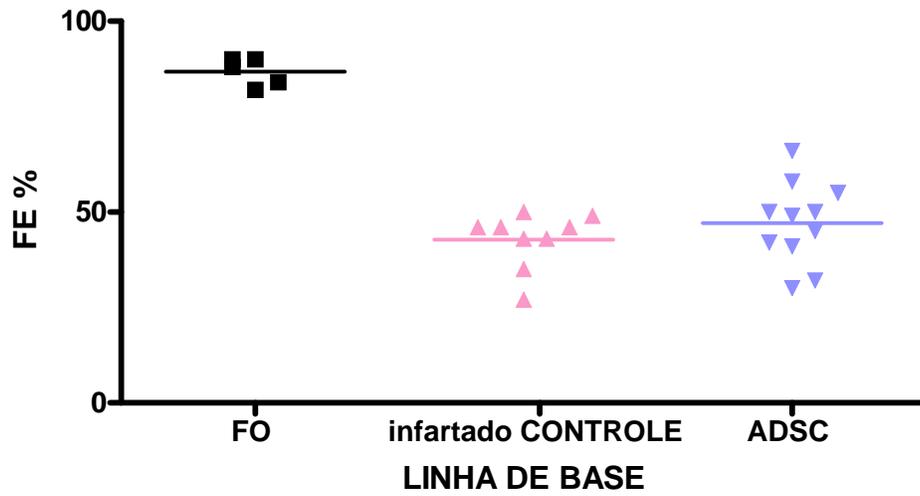
(linha de base), com os respectivos valores: (FE%: grupo ADSC =  $47,1 \pm 3,23$ ; grupo CONTROLE =  $42,8 \pm 2,45$ ; SEM). A partir destes dados, os valores da FE foram normalizados em relação à linha de base. No GRÁFICO B da FIGURA 24, podemos observar que houve diferença significativa entre os grupos infartados (ADSC:  $1,064 \pm 0,05$  e CONTROLE:  $0,8507 \pm 0,12$ ;  $p=0,0499$ ; SEM), 6 semanas após a terapia. O grupo infartado ADSC aumentou em 6% o valor médio da FE em relação à linha de base enquanto o grupo infartado CONTROLE diminuiu em 15% a FE em relação a linha de base. Estas variações em relação aos valores de linha de base em cada grupo não alcançaram significância estatística.

28 DIAS APÓS LIGADURA PERMANENTE NOS GRUPOS ADSC E CONTROLE E ESTRESSE CIRÚRGICO NO GRUPO FO			
	FE%	FEA %	IM%
FO (N=5)	$86,80 \pm 1,62$	$58,2 \pm 4,03$	0
Infartado ADSC (N=11)	$47,09 \pm 3,23^*$	$28,0 \pm 10,34^*$	$72,1 \pm 5,07$
Infartado CONTROLE (N=9)	$42,8 \pm 2,45^*$	$28,4 \pm 9,12^*$	$64,6 \pm 7,55$

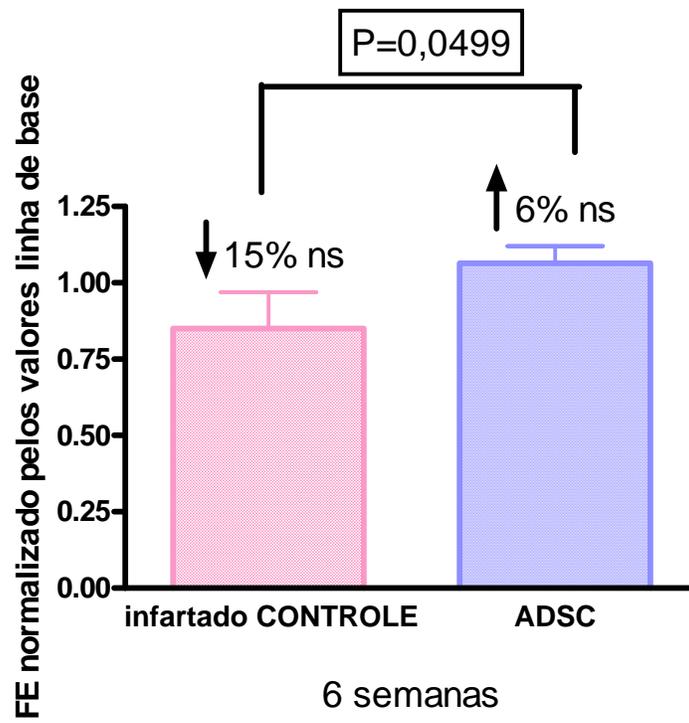
média erro padrão / \* ( $P < 0,005$ ) em relação ao grupo FO.

**TABELA 9 – Parâmetros ecocardiográficos obtidos dos grupos: ADSC (N=11), CONTROLE (N=9) e FO (N=5), 28 dias após a ligadura permanente da artéria coronária esquerda.**

(A)

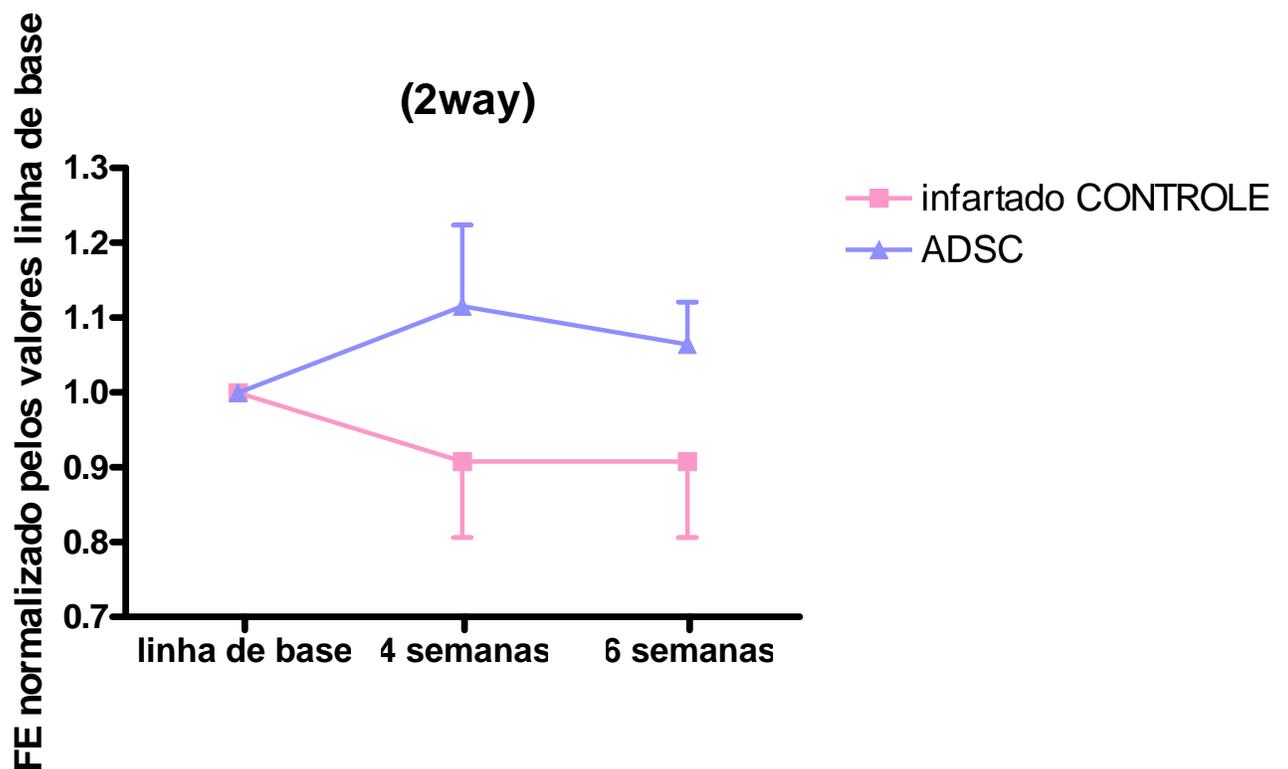


(B)



**FIGURA 24 – Parâmetros ecocardiográficos: fração de ejeção; grupos: FO (N=05), CONTROLE (N=09) e ADSC (N=11).** (A) Fração de ejeção homogênea dos grupos infartados CONTROLE e ADSC, 28 dias após ligadura permanente (linha de base). (B) gráfico de FE% normalizado pelos valores da linha de base. diferença significativa com aumento da FE no grupo ADSC vs CONTROLE, 6 semanas após a terapia (P=0,0499).

Apesar do aumento significativo da fração de ejeção normalizada nos animais do grupo ADSC comparado aos animais do grupo CONTROLE 6 semanas após a terapia, com relação ao tempo de tratamento não houve diferença significativa em ambos os grupos (ADSC e CONTROLE),vide FIGURA 25.

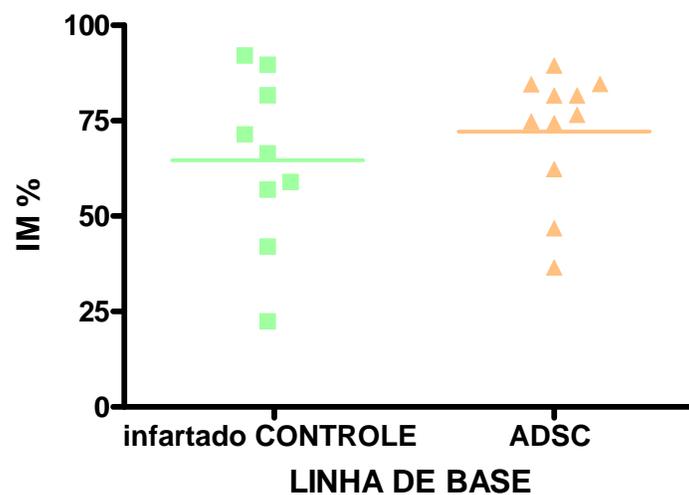


**FUGURA 25 - Gráfico de FE% normalizado pelos valores da linha de base. relação tratamento vs tempo.** tendência do aumento da fração de ejeção com estabilização no grupo infartado ADSC (N=11) e diminuição no grupo infartado CONTROLE (N=09) ao longo do tempo.

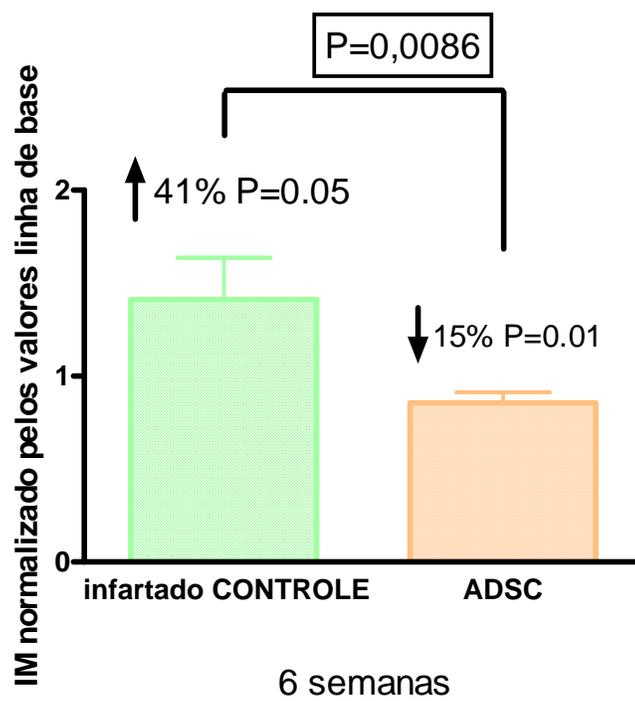
Além da fração de ejeção, uma medida importante a ser avaliada nos animais infartados é a área de acinesia na parede anterior do VE, já que esta análise nos permite inferir a extensão do infarto do miocárdio.

Os dados referentes à área de acinesia (IM%) estão representados na FIGURA 26 (A; B). Podemos observar que os dois grupos infartados (ADSC e CONTROLE) encontravam-se homogêneos 28 dias após o infarto e imediatamente antes da terapia (linha de base), com os respectivos valores: (IM%: grupo ADSC =  $72,1 \pm 5,07$ ; grupo infartado CONTROLE =  $64,6 \pm 7,55$ ; SEM,  $p > 0,05$ ). A partir destes dados, os valores do IM foram normalizados em relação à linha de base. No gráfico B da FIGURA 26 podemos observar que houve diferença significativa entre os grupos infartados (ADSC:  $0,8564 \pm 0,06$  e CONTROLE:  $1,412 \pm 0,22$ ;  $p = 0,0086$ ; SEM), 6 semanas após a terapia. O grupo infartado ADSC apresentou uma diminuição significativa de 15% nos valores de acinesia em relação à linha de base ( $p = 0,001$ ) enquanto o grupo infartado CONTROLE apresentou um aumento significativo de 41% em relação a linha de base ( $p = 0,05$ ).

(A)



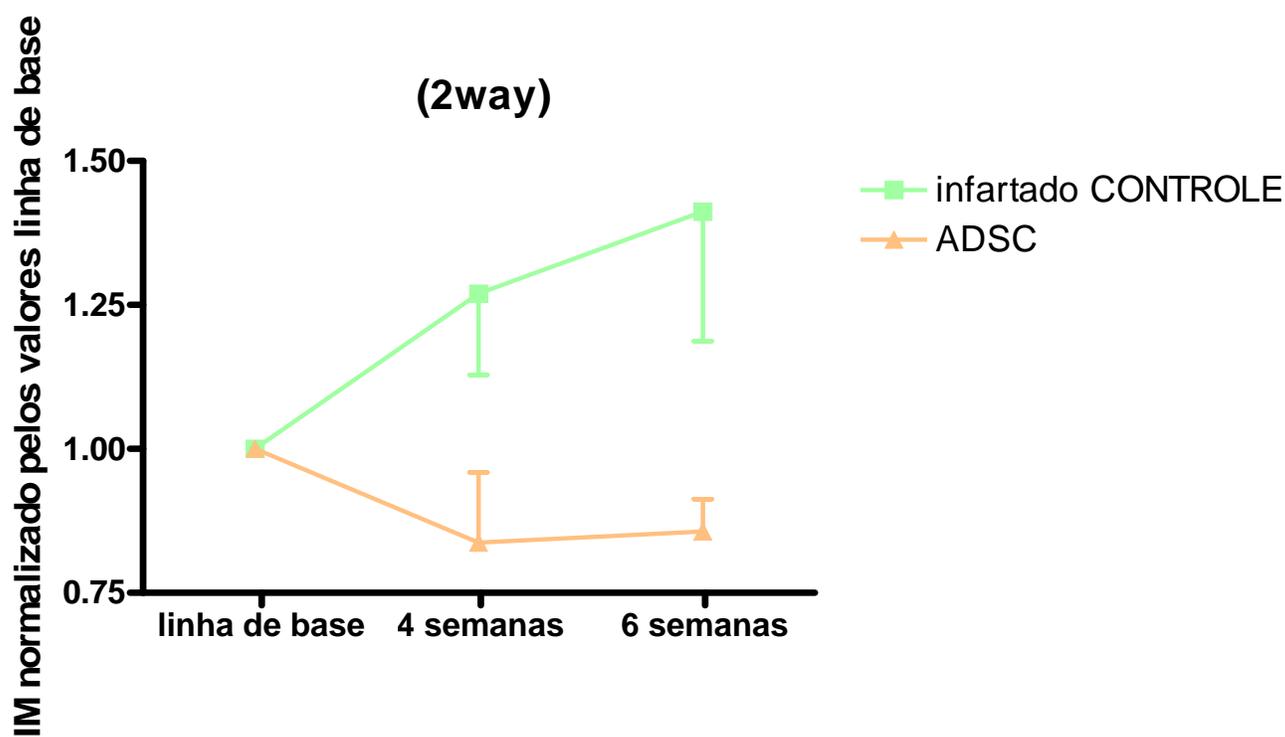
(B)



**FIGURA 26 – Parâmetros ecocardiográficos: infarto do miocárdio; grupos infartados CONTROLE (N=09) e ADSC (N=11).** (A) área de acinesia homogênea entre os grupos infartados CONTROLE e ADSC, 28 dias após ligadura permanente (linha de base). (B) gráfico de IM% normalizado pelos valores da linha de base. diferença significativa com diminuição do IM no grupo infartado ADSC vs infartado CONTROLE, 6 semanas após a terapia (P=0,0086).

Apesar da diminuição significativa da área de acinesia da parede do VE nos animais do grupo infartado ADSC comparado aos animais do grupo infartado CONTROLE 6 semanas após a terapia, com relação ao tempo de tratamento não houve diferença significativa em ambos os grupos infartados (ADSC e CONTROLE), vide FIGURA 27.

Assim, os dados ecocardiográficos demonstraram que o tratamento com células progenitoras obtidas do tecido adiposo (grupo infartado ADSC) foi capaz de conter o remodelamento cardíaco, promovendo uma melhora funcional quando comparamos com o grupo infartado CONTROLE e estabilizar o quadro de insuficiência cardíaca. Isto foi refletido não só no aumento dos valores da FE como também na diminuição da área de acinesia (IM).



**FIGURA 27 – Gráfico de IM% normalizado pelos valores da linha de base. Relação tratamento vs tempo.** Tendência de aumento da área acinesia na parede anterior do VE no grupo infartado CONTROLE (N=09) e diminuição com estabilização do quadro no grupo infartado ADSC (N=11), ao longo do tempo.

#### 4.6 - AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA

A TABELA 10 mostra o perfil hemodinâmico dos animais através dos parâmetros médios do registro de pressão ventricular esquerda (FC, PS, PDF, PDVE, dP/dT + e dP/dT-) dos grupos: infartado CONTROLE (N=10) e infartado ADSC (N=11), em ratos anestesiados, no final das 6 semanas do protocolo experimental.

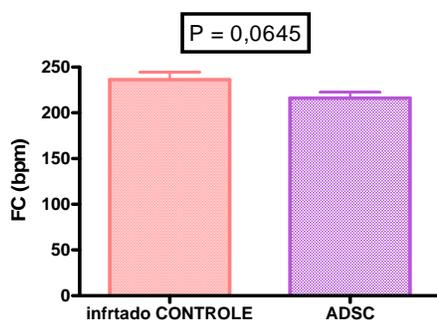
GRUPOS	PDF (mmHg)	PS (mmHg)	PDVE (mmHg)	FC (bpm)	DP/DT+ (mmHg/s)	DP/DT- (mmHg/s)
Infartado ADSC (N=11)	10,5±2,45	93,6±5,27	83,2±4,65	216,2±6,46	4793±215,0 *	- 3530±140,8
Infartado CONTROLE (N=10)	15,6±2,95	87,9±3,41	72,4±5,23	236,3±8,09	3999±352,3	- 3098±273,2

SEM;  
\*P=0,0322

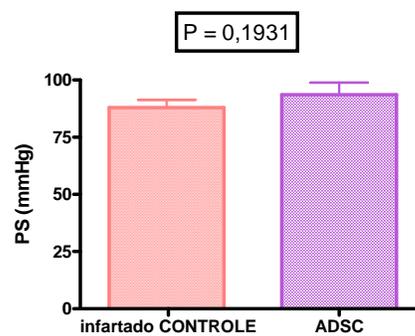
**TABELA 10 – Perfil hemodinâmico dos grupos 6 semanas após a terapia.** Parâmetros funcionais obtidos do registro de pressão ventricular esquerda - PDF: pressão diastólica final; PS: pressão sistólica; PDVE: pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo; FC: frequência cardíaca; dP/dT+: índice de contratilidade cardíaca; dP/dT- : índice de relaxamento cardíaco. \* P<0,05 infartado ADSC vs infartado CONTROLE.

A  $dp/dt^+$  do grupo infartado ADSC foi significativamente maior que a do grupo infartado CONTROLE ( $P < 0,05$ ) 6 semanas após a terapia, indicando um maior índice de contratilidade cardíaca (função sistólica) no grupo tratado com células (FIGURA 28; C). Em relação ao índice de relaxamento cardíaco (função diastólica) do grupo infartado ADSC, a  $dp/dt^-$  6 semanas após a terapia não demonstrou diferença significativa comparado ao grupo infartado CONTROLE ( $P = 0,827$ ). Da mesma forma, a pressão sistólica (PS) e a pressão diastólica final (PDF) também não diferiram significativamente em relação aos animais do grupo infartado CONTROLE ( $P > 0,05$ ). Vale ressaltar que mesmo após a terapia celular, apesar da maior capacidade contrátil no grupo tratado com células, tanto a capacidade contrátil quanto a capacidade de relaxamento do ventrículo esquerdo (VE) destes animais encontravam-se bastante comprometidas, ou seja, a injeção intramiocárdica de ADSC em infarto cicatrizado promoveu uma estabilidade na capacidade hemodinâmica dos animais tratados com ADSC em comparação com o grupo CONTROLE, que demonstrou piora progressiva.

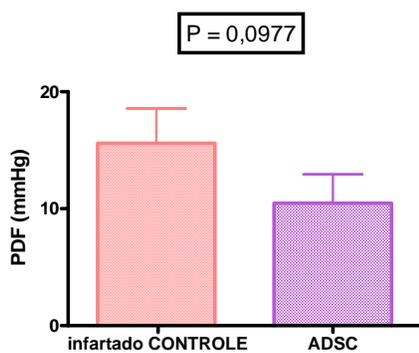
(A)



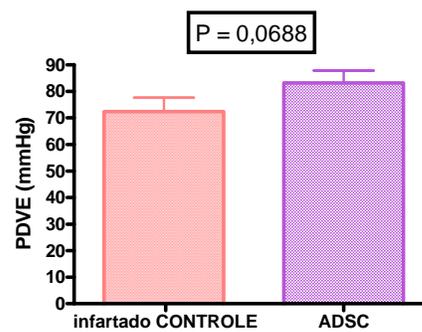
(D)



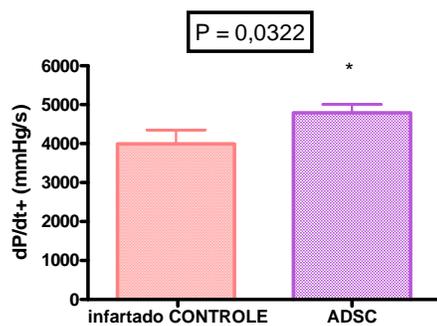
(B)



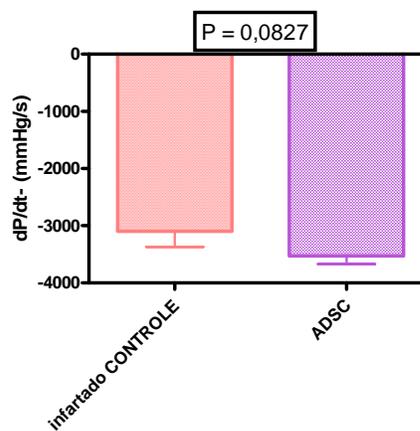
(E)



(C)



(F)



**FIGURA 28 – (A-F) Perfil hemodinâmico dos grupos infartados: CONTROLE (N=10) e ADSC (N=11), 6 semanas após terapia (FC, PDF, dP/dT +, PS, PDVE e dP/dT-). (C) aumento significativo no índice de contratilidade cardíaca (dP/dT +). tendência de melhora na função hemodinâmica no grupo ADSC.**

#### **4.7 - PESQUISA DAS CÉLULAS MARCADAS COM HOECHST APÓS ADMINISTRAÇÃO INTRAMIOCÁRDICA DE ADSC**

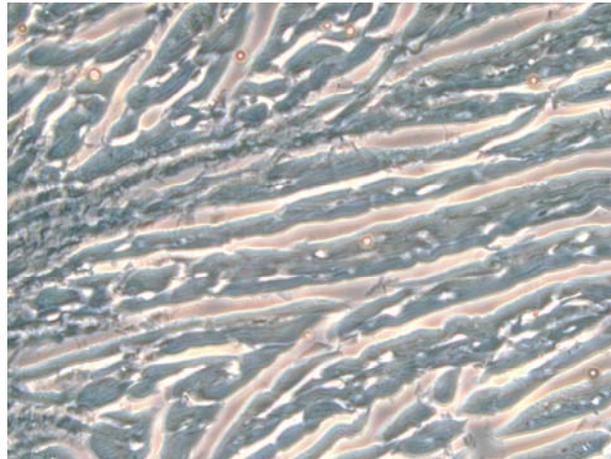
Os animais do grupo infartado ADSC receberam injeção intramiocárdica de células progenitoras obtidas de tecido adiposo (marcadas com o corante nuclear HOECHST) 28 dias após o infarto (linha de base). Após a avaliação hemodinâmica, os animais sofreram eutanásia, seus corações retirados, emblocados em OCT e congelados (N=5) para posteriormente verificarmos se as células seriam capazes de permanecerem no tecido cardíaco submetido à isquemia permanente.

A análise de 4 cortes histológicos na região de injeção das células em cada um dos corações (N=5) examinados não demonstrou presença de células marcadas com HOECHST 6 semanas após a terapia celular (FIGURA 29).

(A)



(B)

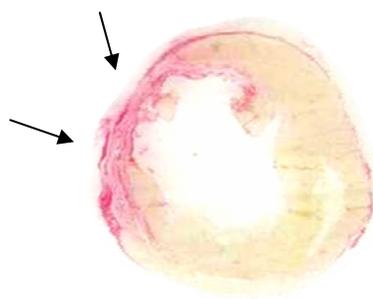


**FIGURA 29- Imagens de fluorescência da fatia C (altura dos papilares) dos cortes cardíacos de um animal que recebeu células (ADSC).** (A) Foto em campo escuro do tecido cardíaco do VE de animais submetidos à ligadura permanente, sacrificados 6 semanas após o tratamento intramiocárdico com ADSC marcadas com o corante nuclear HOECHST e; (B) foto em campo claro. Note que não há presença de célula no tecido. Imagem original aumentada 20x. A análise foi feita em 4 cortes histológicos na região de injeção das células em cada um dos corações examinados(N=5).

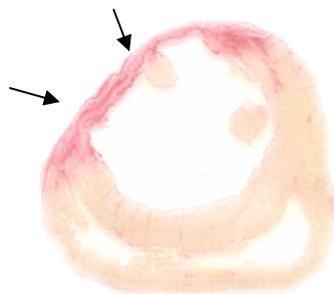
#### **4.8 - ESTUDO ANÁTOMO-HISTOPATOLÓGICO**

O exame de corações infartados dos dois grupos experimentais 6 semanas após a injeção das células ou placebo revelou que em ambos os grupos (ADSC e CONTROLE) havia ainda infartos de grande extensão, acometendo aproximadamente 40% do ventrículo esquerdo (FIGURA 30; A). Entretanto, foi observado efeito da injeção intramiocárdica de ADSC, o tamanho do infarto estimado por histopatologia ( $37.11 \pm 1.735\%$ ) foi significantivamente menor do que no grupo controle ( $48.28 \pm 1.974\%$ ) (FIGURA 30; B). [N=5]

(A)

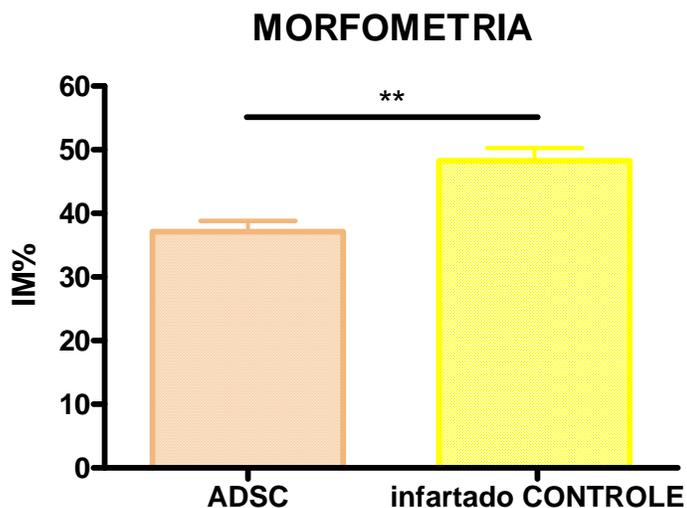


GRUPO ADSC



GRUPO CONTROLE

(B)



**FIGURA 30 – Análise morfológica do infarto do miocárdio, *post mortem*.** (A) amostras de fatias C (altura dos papilares) grupo infartado ADSC (N=05) e infartado CONTROLE (N=05), clara visualização da diferença da espessura da parede anterior do VE demonstradas pelas setas; (B) gráfico demonstrando a diferença entre a extensão do infarto do miocárdio em ambos os grupos infartados (ADSC e CONTROLE), (P=0,0028).

## 5. DISCUSSÃO

Embora o reparo cardíaco, através da terapia celular, esteja adquirindo importância crescente na cardiologia moderna, evidência sólida de um efeito benéfico ainda não está sedimentada. Em modelos animais, utilizando células derivadas de medula óssea (BMSC), a melhora funcional cardíaca demonstrou ser importante, embora variável quantitativamente [ORLIC e cols., 2001 a; BOOMSMA e cols., 2007; HU e cols., 2007]. Em humanos os resultados obtidos em todos os estudos clínicos já publicados indicam ter havido uma melhora significativa, porém modesta, tanto nos parâmetros hemodinâmicos quanto na perfusão cardíaca nos pacientes que receberam os transplantes de células derivadas de medula óssea humana [DOHMANN e cols., 2005; KOCHER e cols., 2001; RUAN e cols., 2005; PERIN e cols., 2004]. Tal fato tem

incentivado a realização de estudos clínicos ainda que o mecanismo de melhora não tenha sido esclarecido.

Uma variedade de fontes de células-tronco tem sido estudada em modelos animais e, em menor escala em pacientes. Clinicamente, as células obtidas da medula óssea tem sido a fonte mais comum para os estudos de reparo cardíaco, provavelmente pelo fato delas serem facilmente obtidas, e porque esta fonte contém uma população heterogênea, com características de células-tronco hematopoética, endotelial e mesenquimal [FUKUDA e cols., 2006; ORLIC e cols., 2001a]. Apesar de muitos trabalhos demonstrarem a eficácia terapêutica dessas células, a sua coleta ocorre de forma invasiva [BUCKNER e cols., 1983].

Dentre outras fontes de células-tronco, o tecido adiposo demonstrou conter uma população atrativa pela sua capacidade de diferenciação em linhagens de células osteogênicas, condrogênicas, adipogênicas, miogênicas, e provavelmente, ligamentar, neurogênica, endotelial, hematopoética e cardiomiogênica quando tratadas com fatores específicos para cada linhagem. A capacidade de se obter um número significativamente elevado de células progenitoras derivadas do tecido adiposo do próprio paciente, através de um procedimento fácil e pouco invasivo pela localização da gordura no tecido subcutâneo, as tem tornado boas candidatas a serem empregadas na terapia celular em doenças crônico-degenerativas [HELDER e cols., 2007; NAKAGAMI e cols., 2006; ROMANOV e cols., 2005; ZUK e cols., 2001; ZUK e cols., 2002].

Neste presente estudo, demonstramos que a população de células progenitoras obtidas do tecido adiposo (ADSC) de ratos, em 3ª passagem, apresentaram características de células-tronco mesenquimais (CD11b – ; CD29++ ; CD34- ; CD 90++) (TBELA 7), corroborando com resultados encontrados em 2006 por MCINTOSH e colaboradores, que através de experimentos realizados por citometria de fluxo, caracterizaram fenotipicamente as ADSC de humanos em

diversas passagens. Eles puderam observar que a população de células estudada apresentava características heterogêneas e a expressão de marcadores hematopoéticos clássicos variava nas diferentes passagens. Segundo MITCHELL e colaboradores [2006], as ADSC após duas ou mais passagens em cultura passam a expressar proteínas associadas ao fenótipo celular de células-tronco mesenquimais.

YAMAMOTO e colaboradores, em 2007, realizaram experimentos “in vitro” com a fração do estroma-vascular derivada do tecido adiposo de camundongos e demonstraram que estas células tinham várias características fenotípicas semelhantes aos estudos anteriores realizados com fração do estroma-vascular de humanos. Porém, de acordo com nosso estudo, as ADSC de ratos em 3ª passagem, apresentam uma população expressando fraca marcação positiva para CD45, diferentemente de YAMAMOTO e cols. que observaram uma porcentagem de células positivas para CD34 baixa e negativa para CD45. Isto nos leva pensar que apesar de serem células da mesma procedência, obtidas de tecido adiposo inguinal, o perfil delas pode variar em função do tempo, da passagem, da aderência ao plástico e da espécie em estudo.

A desmina é um filamento intermediário do citoesqueleto intracelular extremamente insolúvel, de composição proteica, presente principalmente em células musculares, tanto estriadas como lisas. Junto com os outros filamentos intermediários forma uma rede estrutural que conecta as membranas celulares, organelas citoplasmáticas e o núcleo [POLAK & VAN NOORDEN, 1986]. Assim, a desmina é, portanto, considerada um marcador para células com propriedades miogênicas [ALLEN e cols., 1991].

Assim como a desmina, a vimentina também é um membro da família de filamentos intermediários de proteínas do citoesqueleto intracelular presentes em células de origem mesenquimal. Ambas são proteínas importantes de células eucarióticas.

Embora a maioria dos filamentos intermediários estabilizem estruturas, em fibroblastos a vimentina está presente como uma estrutura dinâmica. Esta natureza dinâmica é importante por oferecer flexibilidade para a célula, é um componente importante por manter a integridade celular. A vimentina exerce um importante papel de defesa e proteção do posicionamento de organelas no citosol. Em essência, a vimentina é responsável por manter a forma da célula, integridade do citoplasma, e estabilização da interação citoesquelética [KATSUMOTO e cols., 1990].

Então, para nos certificarmos que as células em questão tinham realmente características fenotípicas de células de origem mesenquimal, optamos por realizar ensaios de imunocitoquímica para desmina e vimentina em 3ª passagem. Pudemos observar que as células apresentaram marcação positiva para ambos os marcadores (FIGURA 21; A e B).

Além da caracterização fenotípica das ADSC, nos preocupamos em cultivar células indiferenciadas para serem injetadas no estudo *in vivo*, por isso, para cada cultura expandida, lamínulas de ADSC em 3ª passagem foram fixadas e marcadas com OIL RED O. Através de microscopia ótica não visualizamos presença de gotículas de lipídeos coradas em vermelho nas lâminas analisadas (FIGURA 17; A e B). Este resultado nos mostrou que as células ainda permaneciam em estágio indiferenciado no momento do processamento. O corante OIL RED O é o de escolha para analisar diferenciação de células-tronco em linhagem adipogênica, por marcar lipídeos na cor vermelha [ZUK e cols., 2001].

No ano de 2008 foram publicados alguns estudos que investigaram a eficácia terapêutica das ADSC em modelo de infarto agudo do miocárdio [SCHENKE-LAYLAND e cols., 2008] e infarto crônico [MAZO e cols., 2008]. A maioria deles, assim como o presente trabalho, demonstra melhora cardíaca funcional. Isto reforça o fato de que as células progenitoras obtidas

do tecido adiposo (ADSC) assim como a fração do estroma vascular são células com potencial para serem aplicadas na medicina regenerativa.

As células progenitoras de tecido adiposo (ADSC) demonstraram ser multipotentes e ter capacidade de secretar citocinas angiogênicas que possibilitam promover uma neovascularização no tecido lesionado [REHMAN e cols., 2004]. Além desta vantagem, tais células indiferenciadas quando transplantadas têm capacidade de agir contra o progressivo remodelamento cardíaco [MIYAHARA e cols., 2008].

Nosso estudo propôs então avaliar o potencial terapêutico das células progenitoras de tecido adiposo no modelo de infarto cicatrizado de ratos Wistar. A injeção intramiocárdica única de ADSC, neste trabalho, não foi capaz de mostrar diferença nos valores do âQRS, sugerindo que todos os animais permaneciam com uma extensão grande de infarto em ambos os grupos infartados (ADSC e CONTROLE), mesmo após a terapia celular, quando comparados com o grupo FO (FIGURA 23, A; TABELA 8). Diferentemente dos nossos resultados eletrocardiográficos (TABELA 8), trabalho desenvolvido por OLIVARES e cols. em 2004, obtiveram resultados positivos em relação à análise eletrocardiográfica (âQRS) e ecocardiográfica usando células-tronco mesenquimais de medula óssea (BMSC) em infarto do miocárdio cicatrizado. Eles observaram que o ângulo QRS (âQRS) retornava ao seu valor normal no grupo dos animais infartados que receberam células-tronco de medula óssea, o que sugere que tenha havido um processo de regeneração de cardiomiócitos, restaurando o ventrículo esquerdo como principal fonte de despolarização no coração e indicando que, 2 semanas após a terapia, o grupo tratado com BMSC apresentava uma área de infarto significativamente menor comparada ao grupo infartado CONTROLE, que recebeu apenas veículo. No entanto, sabe-se que a eletrocardiografia não é o método de análise de eleição para se avaliar a função cardíaca como

um todo, este método apenas mensura as variações de potencial na superfície do coração e nos possibilita visualizar a presença de infarto e arritmias acusando a disfunção elétrica quando presentes, mas não nos permite analisar a função mecânica das câmaras cardíacas e suas propriedades sistólicas (capacidade de contratilidade) e diastólicas (capacidade de relaxamento).

Corroborando com os resultados funcionais ecocardiográficos encontrados por OLIVARES e cols. (2004) que sugeriram que o transplante de BMSC no miocárdio originou novo tecido miocárdico e vasos sangüíneos, MAZO e cols. (2008) demonstraram que as ADSC de camundongo eGFP transplantadas em corações de ratos com infarto cicatrizado promoveram uma melhora da função cardíaca com aumento da FE% no grupo tratado. Assim como nos trabalhos desenvolvidos por OLIVARES e colaboradores e Mazo e colaboradores, os valores normalizados de FE% e IM% encontrados no presente trabalho e mensurados 6 semanas após a terapia, mostraram diferenças significativas entre o grupo infartado ADSC e o grupo infartado CONTROLE (FIGURA 24, B; FIGURA 26, B).

Em adição, na análise da hemodinâmica, o índice de contratilidade cardíaca demonstrou ter diferença significativa entre ambos os grupos infartados (ADSC *vs* CONTROLE), 6 semanas após a terapia (FIGURA 28, C). Logo, pudemos concluir que as células progenitoras de tecido adiposo (ADSC), assim como as BMSC no trabalho de OLIVARES e cols. (2004), foram capazes de promover melhora da função cardíaca de animais com infarto cicatrizado, quando comparados ao grupo infartado CONTROLE.

No nosso estudo não encontramos células (ADSC) com núcleo marcado (HOECHST) nos cortes histológicos na borda do infarto, em áreas próximas a injeção, sugerindo que não há permanência das células no local injetado 6 semanas após a terapia (FIGURA 29; A e B). Estes dados diferem dos resultados apresentados por MAIA (2006), que encontrou um grande número

de células mononucleares de cordão umbilical com núcleos marcados com Hoechst, apesar de a marcação ter sido analisada com 21 dias após a injeção intramiocárdica. Assim como os dados de MAIA (2006), OLIVARES (2004 e 2007) também conseguiu encontrar as células derivadas de medula óssea marcadas com Hoechst e injetadas no bordo do infarto em seus experimentos. Estes achados nos levam a pensar que as células injetadas permanecem por pouco tempo no tecido alvo. Esta hipótese é relevante e tem implicação sobre os mecanismos de reparo promovidos pela injeção das células. Há outro estudo que mostra que nenhuma célula do doador foi identificada no tecido cardíaco 4 semanas após a terapia com ADSC em IM cicatrizado. Interessantemente, os autores verificaram que uma semana após o transplante, os benefícios na função cardíaca já eram evidentes e que menos de 0.5% das células ainda permaneciam no tecido [MAZO e cols., 2008]. Esse fato valida a hipótese da via parácrina estar envolvida na melhora funcional observada após injeção de ADSC em modelo de infarto.

O insucesso na sobrevivência das células tem sido relacionado a diversos fatores como a resposta inflamatória, o microambiente em hipóxia e a ausência dos sinais de sobrevivência do contato célula-célula. Além disso, a própria injeção pode causar uma grande taxa de mortalidade devido à lesão mecânica e uma subsequente resposta inflamatória aguda (HU e cols., 2007).

Em relação ao tamanho do infarto, os resultados do presente estudo mostram que a injeção de ADSC foi capaz de diminuir a extensão do infarto (FIGURA 30; A e B) quando realizada 28 dias após o IM. A melhora da função cardíaca após terapia celular com ADSC já foi observada com a diminuição do remodelamento cardíaco e aumento da densidade capilar (VALINA e cols., 2007).

Alguns autores ainda atribuem a melhora funcional ao processo de diferenciação e/ou fusão celular (SHAKE e cols., 2002; KAWADA e cols., 2004). Entretanto, trabalhos mais

recentes mostram que a melhora funcional após terapia com CTM se manifesta mesmo sem evidências de transdiferenciação ou fusão celular significativa (BOOMSMA e cols., 2007; HU e cols., 2007). Logo, outros mecanismos começaram a ser sugeridos como responsáveis pela melhora funcional que foi observada após terapia celular com CTM. Estudos recentes propõem que o efeito benéfico da terapia celular utilizando CTM estaria relacionado a um efeito parácrino, no qual essas células, uma vez presentes no tecido receptor, secretariam fatores angiogênicos (KINNAIRD e cols., 2004a,b) e/ou antiapoptóticos (GNECCHI e cols., 2005; XU e cols., 2007) capazes de proteger o tecido da propagação do dano isquêmico, não sendo a incorporação destas células ao tecido um pré-requisito para o efeito final da melhora na função.

Segundo MAZO e colaboradores (2008) a melhora da função cardíaca ocorreria pelo aumento da angiogênese e pela diminuição do grau de fibrose encontrados no tecido infartado. Eles especularam que o evento angiogênico estaria envolvido no aumento da viabilidade e da função cardíaca, e especulam que, provavelmente, se as células fossem inoculadas no local da lesão juntamente com um biomaterial, este efeito se potencializaria por manter as células enxertadas viáveis secretando fatores angiogênicos por um tempo prolongado beneficiando então as células residentes do órgão alvo.

As ADSC já demonstraram ter potencial angiogênico e antiapoptótico por secretarem fator de crescimento endotelial (VEGF) e fator de crescimento de hepatócito (HGF). Quando as ADSC estão sob condições de hipóxia em cultura, a secreção de VEGF aumenta consideravelmente [REHMAN e cols., 2004].

Há de se considerar que a indução da vascularização é uma possível explicação para a redução da área de fibrose e um aumento da viabilidade tissular. Especula-se que o aumento do fluxo sanguíneo associado ao enxerto de células ADSC provavelmente resgata cardiomiócitos

hibernantes ou até mesmo estimula a divisão de células-tronco cardíacas e substituição, limitada, do tecido contrátil perdido. Todos estes efeitos resultam em um aumento do desempenho cardíaco. Por outro lado, além do suposto efeito parácrino, a capacidade das ADSC em remodelar o tecido fibroso pode ser também devido a suas propriedades macrofágicas, como foi demonstrado anteriormente. COUSIN e colaboradores em 1999 mostraram que os pré-adipócitos desenvolvem propriedades fagocíticas apresentando uma função semelhante a dos macrófagos, participando da reação inflamatória que se desenvolve durante o processo de reparo após o infarto do miocárdio, o que provavelmente auxilia na redução do remodelamento cardíaco [VAN AMERONGEN e cols., 2007].

Já em 2007, SADAT e colaboradores investigaram os efeitos protetores das ADSC em cultura de cardiomiócitos. Os resultados demonstram que cardiomiócitos em co-cultura com ADSC apresentam um decréscimo da taxa de apoptose de 65,9% para 25%. Quando a expressão do IGF-1 era bloqueada nas ADSC, a taxa aumentava novamente para 62,5%, e quando se bloqueava a expressão do VEGF, aumentava para 34,2%. Estes achados mostraram que a co-cultura de cardiomiócitos neonatos com ADSC em condições de hipóxia e privação de soro diminuíram a taxa de apoptose dos cardiomiócitos.

Ainda são necessários mais estudos que comprovem a importância da via parácrina e que investiguem os mecanismos moleculares envolvidos na cardioproteção para que a terapia celular se torne uma realidade clínica. Além disso, apesar dos avanços, a disponibilidade das células-tronco permanece um desafio para os cientistas e clínicos no segmento da medicina regenerativa [GIMBLE e cols., 2007]. É neste contexto, que nosso trabalho demonstra o potencial das células tronco derivadas de tecido adiposo, uma fonte de fácil acesso e capaz de gerar um número de células compatível para a terapia em um curto intervalo de tempo.

## 6. CONCLUSÕES

Conclui-se que as células obtidas do tecido adiposo, utilizadas neste estudo para a terapia celular do infarto do miocárdio cicatrizado, apresentaram, principalmente:

- Características de células aderentes ao frasco de cultura, morfologicamente semelhante ao fibroblasto, com tamanho mínimo de 30  $\mu\text{m}$  e com facilidade de expansão *in vitro*, atingindo um grau de 85% de confluência em cinco dias de plaqueamento;
- Características fenotípicas de células-tronco mesenquimais CD11b – ; CD29++ ; CD34- ; CD 90++ (citometria de fluxo) e marcação positiva para desmina e vimentina que são filamentos intermediários de proteínas do citoesqueleto intracelular presentes em células de origem mesenquimal (imunocitoquímica) ;
- Características de células indiferenciadas em linhagem adipogênica demonstradas pela ausência de vacúolos lipídicos quando marcadas com OIL RED O, antes de serem injetadas nos animais infartados.

Após seis semanas de terapia, as células progenitoras obtidas do tecido adiposo, mesmo que não tenham sido encontradas no local da injeção pela ausência de células marcadas com HOECHST, quando administradas por via intramiocárdica promoveram:

- Diminuição da área de acinesia do VE e aumento da fração de ejeção (ECO) no grupo infartado e tratado com ADSC em relação ao grupo que recebeu veículo;
- Aumento da  $dp/dt+$  (Hemodinâmica), ou seja, aumento do índice de contratilidade cardíaca no grupo infartado e tratado com ADSC em relação ao grupo que recebeu veículo;
- Diminuição do perímetro da área infartada (morfometria) no grupo infartado e tratado com ADSC em relação ao grupo que recebeu veículo.

## 7. REFERÊNCIAS

AHIMA RS, FLIER JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab.*;11:327-332. 2000.

AILHAUD G, GRIMALDI P, NEGREL R. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu Rev Nutr*;12:207–33. 1992.

ALBRIGHT A, STERN J. Adipose tissue. *Encyclopedia of sports medicine and science*. Internet Society for Sport Science; 1998.,20 Lanza RP, Langer RS, Vacanti J. *Principles of tissue engineering*. 2nd ed. San Diego, CA: Academic Press; 2000.

ALLEN RE, RANKIN LL, ET AL. Desmin is present in proliferating rat muscle satellite cells but not in bovine muscle satellite cells. *J Cell Physiol* 149(3): 525-35. 1991.

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

ATALA A, LANZA RP. *Methods of tissue engineering*. San Diego, CA:Academic Press. 2002

AWAD HÁ, BOIVIN GP, DRESSLER MR, SMITH FM, YOUNG RG, BUTLER DL. Repair of patellar tendon injuries using a cell-collagen composite. *J Orthop Res*, 21(3): 420-31. 2003.

BAKSH D, SONG L, TUAN RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J. Cell. Mol. Med.* 8, (3): 301-316. 2004.  
BARBOSA DA SILVA E COLS. In: Rouquairol & Almeida Filho: *Epidemiologia & Saúde*. pp. 293. 2003.

BEAHM EK, WALTON RL, PATRICK JR CW. Progress in adipose tissue construct development. *Clin Plast Surg*;30(4):547–58 viii. 2003.

BJORNTORP P, KARLSSON M, PERTOFT H ET AL. Isolation and characterization of cells from rat adipose tissue developing into adipocytes. *J Lipid Res.*, 19: 316–324. 1978.

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.* 37, 17-18. 2007.

BUCKNER CD, CLIF RA, THOMAS ED, HERSMAN J, SANDERS PS, STEWART S, WADE JC, MURPHY M, COUNTS G, MEYERS JD. Early infectious complications in allogeneic marrow transplant recipients with acute leukemia: effects of prophylactic measures. *Infection* 1(2): 149-57. 1983.

BUTTERWITH SC. Molecular events in adipocyte development. *Pharmacol Ther*;61(3):399–411. 1994.

CANNON B, NEDERGAARD J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.*;84:277-359. 2004.

CARVALHO ACC, SANTOS RR. De Coração Novo. *Scientific American Brasil*, 26: 54-57. 2004.

COUSIN B, MIREILLE A, ARNAUD E ET AL. Reconstitution of lethally irradiated mice by cells isolated from adipose tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 301:1016–1022. 2003.

COUSIN B, MUNOZ O, ANDRE M, ET AL. A role for preadipocytes as macrophage-like cells. *Faseb J*;13:305–12. 1999.

CROISSANDEAU G, CHRETIEN M, MBIKAY M. Involvement of matrix metalloproteinases in the adipose conversion of 3T3-L1 preadipocytes. *Biochem J*;364(Part 3):739–46. 2002.

CURI R, POMPÉIA C, MIYASAKA CK, PROCÓPIO J. Entendendo a gordura: os ácidos graxos. São Paulo: Manole. 2002.

DAÍ W, HALE SL, MARTIN BJ, KUANG JQ, DOW JS, WOLD LE, ET AL. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short- and long – term effects. *Circulation*, 112 (2): 214-23. 2005.

DE UGARTE DA, ASHJIAN PH, ELBARBARY A, HEDRICK MH. Future of fat as raw material for tissue regeneration. *Ann Plast Surg*;50(2):215–9. 2003.

DOHMANN HFR; PERIN EC; TAKIYA CM; SILVA GV; SILVA AS; SOUSA ALS; MESQUITA CT; ROSSI MID; PASCARELLI BM; ASSIS IM; DUTRA HS; ASSAD JAR; CASTELLO-BRANCO RV; DRUMMOND C; DOHMANN HJF; WILLERSON JT; BOROJEVIC R. Transendocardial Autologous Bone Marrow Mononuclear Cell Injection in Ischemic Heart Failure. Postmortem Anatomicopathologic and Immunohistochemical Findings. *Circ*. 112:521. 2005.

ELLIS LB, ALLISON RB, RODRIGUEZ FL, ROBBINS SL. Relations of the degree of coronary artery disease and of myocardial infarctions to cardiac hypertrophy and chronic congestive heart failure. *New England Journal of Medicine* 266(11): 525-9. 1962.

ERICKSON, GR; GIMBLE, JM; FRANKLIN, DM ET AL. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, 290: 763–769. 2002.

FACTOR SM. Pathophysiology of myocardial ischemia. In: HURST JW, SCHLANT RC, RACKLEY CE, SONNENBLICK EH, WENGER NK. ed. *The heart. Arteries and veins*. 7 ed. New York, Mc Graw-Hill, Cap. 49, p. 940-59. 1990.

FISHBEIN MC, MACLEAN D, MAROKO PR. Experimental Myocardial infarction in the rat: qualitative and quantitative changes during pathologic evolution. *Am. J. Pathol.*, 90: 57-70. 1978.

FONSECA-ALANIZ MH, TAKADA J, ALONSO-VALE MI, LIMA FB. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *J Pediatr (Rio J)*. 2007 Nov;83(5 Suppl):S192-203. Epub 2007 Nov 8.

FRUHBECK G, GÓMEZ-AMBROSI J, MURUZABAL J, BURREL MA. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signalling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metabol*.;280:E827-47. 2001.

FUKUDA K, YUASA S. Stem cells as a source of regenerative cardiomyocytes. *Circ Res*. 2006 Apr 28;98(8):1002-13. Review..

GIMBLE JM, KATZ AJ, BUNNELL BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res*. 100(9):1249-60. 2007.

GNECCHI M, HUAMEI H, OLIN DL, MELO LG, FULVIO M, HUI M, NICOLAS N, ZHANG L, PRATT RE, INGWALL JS, DZAU VJ. Paracrine Action Accounts for marked Protection of Ischemic Heart by Akt-modified Mesenchymal Stem Cells. *Nature* 4, 367-368. 2005.

GREGOIRE FM, SMAS CM, SUL HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev*;*78*:783Y809. 1998.

HAGSTROM RM, BILLINGS FT, CHAPNICK EM, BALL COT, MENEELY GR. Sudden death in survivors of myocardial infarction. *Circulation* 30(Suppl. III): III-91-2. 1964.

HANABUSA K, NAGAYA N, IWASE T, ITOH T, MURAKAMI S, SHIMIZU Y, ET AL. Adrenomedullin enhances therapeutic potency of mesenchymal stem cells after experimental stroke in rats. *Stroke*, 36(4): 853-8. 2005.

HAUSMAN DB, DIGIROLAMO M, BARTNESS TJ, HAUSMAN GJ, MARTIN RJ. The biology of white adipocyte proliferation. *Obes Rev*;*2*(4):239-54. 2001.

HEARSE DJ, RICHARD V, YELLON DM, KINGMAN JG JR. Evolving myocardial infarction in the rat in vivo: inappropriate model for the investigation of drug-induced infarct size limitation during sustained regional ischemia. *J Cardiovasc Pharmacol* 11: 701-710. 1988.

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

HELDER MN, KNIPPENBERG M, KLEIN-NULEND J, WUISMAN PI. Stem cells from adipose tissue allow challenging new concepts for regenerative medicine. *Tissue Eng.* Aug;13(8):1799-808. Review. 2007.

HEMMRICH K, VON HEIMBURG D, RENDCHEN R, DI BARTOLO C, MILELLA E, PALLUA N. Implantation of preadipocyte-loaded hyaluronic acidbased scaffolds into nude mice to evaluate potential for soft tissue engineering. *Biomaterials*;26(34):7025–37. 2005.

HOFSTETTER CP, SCHWARZ EJ, HESS D, WIDENFALK J, EL MA, PROCKOP DJ, ET AL. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(4): 2199-204. 2002.

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. *European Journal of Cardiothoracic Surgery* 31, 438—443. 2007.

IBGE. População/ Assistência Médico-Sanitária: estatística da saúde. 2005. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaoodevida/ams/2005/default.shtm> .

JAIN M, DERSIMONIAN H, BRENNER DA, NGOY S, TELLER P, EDGE ASB, ZAWADZKA A, WETZEL K, SAWYER D, COLUCCI WS, APSTEIN CS, LIAO R. Cell Therapy attenuates deleterious ventricular remodeling and improves cardiac performance after myocardial infarction. *Circulation* 103:1920-1927. 2001.

JING W, WU L, LIN Y, LIU L, TANG W, TIAN W. Odontogenic differentiation of adipose-derived stem cells for tooth regeneration: necessity, possibility, and strategy. *Med Hypotheses*. 2007 Aug 17.

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

JULIAN DG. Prognosis, risk stratification and rehabilitation after acute myocardial infarction. In: JULIAN DG, CAMM AJ, FOX KM, HALL RJC, POOLEWILSON PA. ed. *Diseases of the heart*. London, Baillière Tiddall Cap. 51, p. 1192- 1202. 1989.

KATSUMOTO T, MITSUSHIMA A, KURIMURA T. The role of the vimentin intermediate filaments in rat 3Y1 cells elucidated by immunoelectron microscopy and computer-graphic reconstruction. *Biol Cell* 68 (2): pp. 139–46. 1990.

KAWADA H, FUJITA J, KINJO K, MATSUZAKI Y, TSUMA M, MIYATAKE H, MUGURUMA Y, TSUBOI K, ITABASHI Y, IKEDA Y, OGAWA S, OKANO H, HOTTA T, ANDO K, FUKUDA K. Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood* 104, 3581-3587. 2004.

KEMPF FC, JOSEPHSON ME. Cardiac arrest recorded on ambulatory electrograms. *American Journal of Cardiology* 53: 1577-1582. 1984.

KINNAIRD T, STABILE E, BURNETT MS, LEE CW, FUCHS S, EPSTEIN SE. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res* 94, 678-685. 2004a.

KINNAIRD T, STABILE E, BURNETT MS, SHOU M, LEE SW, BARR S, FUCHS S, EPSTEIN SE. Local delivery of marrow derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation* 109, 1543-1549. 2004b.

KOC ON, DAY J, NIEDER M, GERSON SL, LAZARUS HM, KRIVIT W. Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). *Bone Marrow Transplant*, 30(4):215-22. 2002.

KOCHER A, SCHUSTER MD, SZABOLCS MJ, TAKUMA S, BURKHOF D, WANG. Neovascularization of ischemic myocardial by human bone marrow-derived endothelial precursors prevents post-infarction remodeling and improve cardiac function. *Nature Med.* 7: 430-436. 2001.

LAU DC, DHILLON B, YAN H, SZMITKO PE, VERMA S. Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005 May;288(5):H2031-41. Review. Epub 2005 Jan 14.

LE BK, GOTHERSTROM C, RINGDEN O, HASSAN M, MCMAHON R, HORWITZ E, ET AL. Fetal mesenchymal stem-cell engraftment in bone after in utero transplantation in a patient with severe osteogenesis imperfecta. *Transplantation*, 79(11): 1607-14. 2005.

LINDSAY DT. Functional human anatomy. St. Louis: Mosby. 1996.

LITWIN SE, KATZ SE, MORGAN JP, DOUGLAS PS. Serial ecocardiographic assessment of the ventricular geometry and function after large myocardial infarction in the rat .Circulation 89:345-354. 1994.

MACDOUGALD OA, MANDRUP S. Adipogenesis: forces that tip the scales. Trends Endocrinol Metab;13(1):5–11. 2002.

MACLEAN D, FISHBEIN MC, MAROKKO PR, BRAUNWALD E. Hyaluronidase induced reductions in myocardial infarct size. Science 194, 199–200. 1976.

MAIA, ACV. Avaliação do potencial terapêutico de células mononucleares do cordão umbilical humano no modelo de infarto agudo do miocárdio experimental. Tese de mestrado – IBCCF-UFRJ. 2006.

MALLORY GK, WHITE PD, SALCEDO-SALGAR J. The speed of healing of myocardial infarction. A study of the pathologic anatomy in seventy-two cases. American Heart Journal 18(6): 647-71. 1939.

MARTINO HF, OLIVEIRA PS, ASSUNÇÃO E, VILLELA R, GAZE M, COSTA PC, SOUZA FC, WEITZEL LH, VELLOSO AP, OLIVEIRA JÚNIOR A, DE CARVALHO AC. Cell therapy in dilated cardiomyopathy. Arq Bras Cardiol. 86(5):390-2. 2006.

MAZO M, PLANAT-BÉNARD V, ABIZANDA G, PELACHO B, LÉOBON B, GAVIRA JJ, PEÑUELAS I, CEMBORAIN A, PÉNICAUD L, LAHARRAGUE P, JOFFRE C, BOISSON M, ECAY M, COLLANTES M, BARBA J, CASTEILLA L, PRÓSPER F. Transplantation of adipose derived stromal cells is associated with functional improvement in a rat model of chronic myocardial infarction. Eur J Heart Fail. May;10(5):454-62. 2008.

MCINTOSH K, ZVONIC S, GARRETT S, MITCHELL JB, FLOYD ZE, HAMMILL L, KLOSTER A, DI HALVORSEN Y, TING JP, STORMS RW, GOH B, KILROY G, WU X, GIMBLE JM. The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro. Stem Cells. 2006 May;24(5):1246-53. Epub 2006 Jan 12.

MEYERROSE TE, DE UGARTE DA, HOFLING AA, HERRBRICH PE, CORDONNIER TD, SHULTZ LD, EAGON JC, WIRTHLIN L, SANDS MS, HEDRICK MA, NOLTA JA. In vivo

distribution of human adipose-derived mesenchymal stem cells in novel xenotransplantation models. *Stem Cells*, 25(1):220-7. 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Morbidade Hospitalar do SUS – Brasil. Sistema Único de Saúde. 2008. Disponível em <http://www.datasus.gov.br> .

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância à Saúde (SVS): Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM) e base demográfica do IBGE – Brasil. 2004. Disponível em <http://portal.saude.gov.br/SAUDE>.

MITCHELL JB, MCINTOSH K, ZVONIC S, GARRETT S, FLOYD ZE, KLOSTER A, DI HALVORSEN Y, STORMS RW, GOH B, KILROY G, WU X, GIMBLE JM. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells*. 2006 Feb;24(2):376-85. Epub 2005 Dec 1.

MIYAHARA Y, NAGAYA N, KATAOKA M, YANAGAWA B, TANAKA K, HAO H, ISHINO K, ISHIDA H, SHIMIZU T, KANGAWA K, SANO S, OKANO T, KITAMURA S, MORI H. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med*. 2006 Apr;12(4):459-65. Epub 2006 Apr 2.

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

NAKAGAMI H, MORISHITA R, MAEDA K, KIKUCHI Y, OGIHARA T, KANEDA Y. Adipose tissue-derived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy. *J Atheroscler Thromb*. Apr;13(2):77-81. Review. 2006.

NIH (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH). Report on Stem Cells (STEM CELLS: SCIENTIFIC PROGRESS AND FUTURE RESEARCH DIRECTIONS). 2001. Disponível em <http://stemcells.nih.gov/info/scireport/> .

NIH (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH). Regenerative Medicine. 2006. Disponível em <http://stemcells.nih.gov/info/scireport/>

NOVAES MAS. Estudo das alterações morfológicas e funcionais do músculo papilar do ventrículo esquerdo de ratos submetidos ao infarto do miocárdio. Vitória, Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, 92p. (Tese, Mestrado). 1992.

OGDEN CL, CARROLL MD, CURTIN LR, MCDOWELL MA, TABAK CJ, FLEGAL KM. Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2004. *JAMA*. Apr 5;295(13):1549-55. 2006.

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

OLIVARES EL, COSTA-E-SOUSA RH, WERNECK-DE-CASTRO JP, PINHO-RIBEIRO V, SILVA MG, RIBEIRO KC, MATTOS EC, GOLDENBERG RC, CAMPOS DE CARVALHO AC, MASUDA MO. Cellular cardiomyoplasty in large myocardial infarction: can the beneficial effect be enhanced by ACE-inhibitor therapy? *Eur J Heart Fail*, 9(6-7):558-67. 2007.

OLIVETTI G, CAPASSO JM, MEGGS LG, SONNENBLICK EH, ANVERSA P. Cellular basis of chronic left ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *Circulation Research* 68(3): 856-69. 1991.

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

ORLIC, D.; KAJSTURA, J.; CHIMENTI, S.; JAKONIUK, I.; ANDERSON, S.M.; LI B.; PICKEL J.; MCKAY, R.; NADAL-GINARD, B.; BODINE, DM.; LERI, A.; ANVERSA, P. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *PNAS* 98 (18):10344-1349. 2001 b.

ORTIZ LA, GAMBELLI F, MCBRIDE C, GAUPP D, BADDOO M, KAMINSKI N, ET AL. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(14): 8407-11, 2003.

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

PATRICK CW, MIKOS AG, MCINTIRE LV. *Frontiers in tissue engineering*, 1st ed. Oxford, UK and New York: Pergamon. 1998.

PATRICK CW. Breast tissue engineering. *Annu Rev Biomed Eng*; 6:109–30. 2004.

PENN MS, MAL N. Stem cells in cardiovascular disease: methods and protocols. *Methods Mol Med.* 129:329-51. 2006.

PERIN EC, DOHMANN HF, BOROJEVIC R, SILVA SA, SOUSA AL, SILVA GV, MESQUITA CT, BELEM L, VAUGHN WK, RANGEL FO, ASSAD JA, CARVALHO AC, BRANCO RV, ROSSI MI, DOHMANN HJ, WILLERSON JT. Improved exercise capacity and ischemia 6 and 12 months after transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic cardiomyopathy. *Circulation*, 110(11 Suppl 1):II213-8. 2004.

PERIN EC, DOHMANN HF, BOROJEVIC R, SILVA SA, SOUSA AL, MESQUITA CT, ROSSI MI, CARVALHO AC, DUTRA HS, DOHMANN HJ, SILVA GV, BELEM L, VIVACQUA R, RANGEL FO, ESPORCATE R, GENG YJ, VAUGHN WK, ASSAD JA, MESQUITA ET, WILLERSON JT. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation.*, 107(18):2294-302. 2003.

PFEFFER MA, BRAUNWALD, E. Ventricular Remodeling after myocardial infarction: experimental observations and clinical implications. *Circulation* 81, 1161-1172. 1990.

PITTENGER MF, MARTIN BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res.*, 95(1):9-20. 2004.

POLAK J, VAN NOORDEN S. *Imunocytochemistry:modern methods and applications*, Wright, Bristol. 1986.

POND C. Ecology of storage and allocation of resources: animals. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. Chichester, UK: John Wiley Sons; p. 1-5. 2001.

QUARTO R, MASTROGIACOMO M, CANCEDDA R, KUTEPOV SM, MUKHACHEV V, LAVROUKOV A, ET AL. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med*, 344(5): 385-6. 2001.

REDE INTERAGENCIAL DE INFORMAÇÃO PARA A SAÚDE. *Indicadores básicos para a saúde no Brasil: conceitos e aplicações*. Ed. Organização Pan-Americana da Saúde. 2008.

REHMAN J, TRAKTUEV D, LI J, ET AL. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*;109:1292–8. 2004.

RODRIGUEZ AM, ELABD C, AMRI EZ, AILHAUD G, DANI C. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie*. Jan;87(1):125-8. Review. 2005.

ROMANOV YA, DAREVSKAYA AN, MERZLIKINA NV, BURAVKOVA LB. Mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue: isolation, characterization, and differentiation potentialities. *Bull Exp Biol Med*, 140(1):138-43. 2005.

ROMANOV YA, DAREVSKAYA AN, KABAEVA NV, ANTONOVA OA. Optimum conditions for culturing of human bone marrow and adipose tissue mesenchymal precursor cells. *Bull Exp Biol Med*, 142(4):515-20. 2006.

ROSEN ED, MACDOUGALD OA. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Dec;7(12):885-96. Review. 2006.

RUAN W, PAN CZ, HUANG GQ, LI YL, GE JB AND SHU XH. Assessment of left ventricular segmental function after autologous bone marrow stem cells transplantation in patients with acute myocardial infarction by tissue tracking and strain imaging. *Chin Med J*, 118(14):1175-1181. 2005.

SADAT, S.; GEHMERT, S.; SONG, Y.H.; YEN, Y.; BAI, X.; GAISER, S.; KLEIN, H.; ALT, E. The cardioprotective effect of mesenchymal stem cells is mediated by IGF-I and VEGF. *Biochem Biophys Res Commun*; 363(3):674-9. Epub Sep 24. 2007.

SANTOS RR, SOARES MB, DE CARVALHO AC. Bone marrow cells transplant in the treatment of chronic chagasic cardiomyopathy Review. *Rev Soc Bras Med Trop*. 37(6):490-5. 2004.

SCHÄFFLER A, BÜCHLER C. Adipose Tissue-Derived Stromal Cells—Basic and Clinical Implications for Novel Cell-Based Therapies. *Stem Cells*, 25(4):818-827. 2007.

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

SCHENKE-LAYLAND K, STREM BM, JORDAN MC, DEEMEDIO MT, HEDRICK MH, ROOS KP, FRASER JK, MACLELLAN WR. Adipose Tissue-Derived Cells Improve Cardiac Function Following Myocardial Infarction. *J Surg Res.* 2008 Apr 10.

SELL H, DESHAIES Y, RICHARD D. The brown adipocyte: update on its metabolic role. *Int J Biochem Cell Biol.* Nov;36(11):2098-104. Review. 2004.

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

SEO MJ, SUH SY, BAE YC, JUNG JS. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun,* 328 (1): 258-64. 2005.

SHAKE JG, GRUBER PJ, BAUMGARTNER WA, SENECHAL G, MEYERS J, REDMOND JM, PITTENGER MF, MARTIN BJ. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional. *Ann Thorac Surg* 73,1919 –26. 2002.

SILVA GV, PERIN EC, DOHMANN HF, BOROJEVIC R, SILVA SA, SOUSA AL, ASSAD JA, VAUGHN WK, MESQUITA CT, BELÉM L, CARVALHO AC, DOHMANN HJ, BARROSO DO AMARAL E, COUTINHO J, BRANCO R, OLIVEIRA E, WILLERSON JT. Catheter-based transendocardial delivery of autologous bone-marrow-derived mononuclear cells in patients listed for heart transplantation. *Tex Heart Inst J,* 31(3):214-9. 2004.

SOARES MB, GARCIA S, CAMPOS DE CARVALHO AC, RIBEIRO DOS SANTOS R. Cellular therapy in Chagas' disease: potential applications in patients with chronic cardiomyopathy. *Regen Med.* 2(3):257-64. 2007.

SOARES MB, LIMA RS, ROCHA LL, TAKYIA CM, PONTES-DE-CARVALHO L, DE CARVALHO AC, RIBEIRO-DOS-SANTOS R. Transplanted bone marrow cells repair heart tissue and reduce myocarditis in chronic chagasic mice. *Am J Pathol.* 164(2):441-7. 2004.

SOLCHAGA LA, GAO J, DENNIS JE, AWADALLAH A, LUNDBERG M, CAPLAN AI, ET AL. Treatment of osteochondral defects with autologous bone marrow in a hyaluronan-based delivery vehicle. *Tissue Eng,* 8 (2): 333-47. 2002.

SPADARO J, CICOGNA AC, TUCCI PJF, CURY PR, MONTENEGRO MR. Morphometric evaluation of the time course of right ventricular hypertrophy after left artery coronary ligation in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 22: 517-522. 1989.

STREM BM, HICOK KC, ZHU M, WULUR I, ALFONSO Z, SCHREIBER RE, FRASER JK, HEDRICK MH. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med* 54 (3): 132–141. 2005.

TURA BR, MARTINO HF, GOWDAK LH, DOS SANTOS RR, DOHMANN HF, KRIEGER JE, FEITOSA G, VILAS-BOAS F, OLIVEIRA SA, SILVA SA, BOZZA AZ, BOROJEVIC R, DE CARVALHO ACC. Multicenter randomized trial of cell therapy in cardiopathies – MiHeart Study. *Trials* 2007, 8:2 (18 January 2007). Disponível em <http://www.trialsjournal.com/content/8/1/2>.

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

VALINA C, PINKERNELL K, SONG YH, BAI X, SADAT S, CAMPEAU RJ, LE JEMTEL TH, ALT E. Intracoronary administration of autologous adipose tissue-derived stem cells improves left ventricular function, perfusion, and remodelling after acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2007 Nov;28(21):2667-77. Epub 2007 Oct 11.

VAN AMERONGEN MJ, HARMSSEN MC, VAN ROOIJEN N, PETERSEN AH, VAN LUYN MJ. Macrophage depletion impairs wound healing and increases left ventricular remodeling after myocardial injury in mice. *Am J Pathol*;170:818–29. 2007.

VON HEIMBURG D, KUBERKA M, RENDCHEN R, HEMMRICH K, RAU G, PALLUA N. Preadipocyte-loaded collagen scaffolds with enlarged pore size for improved soft tissue engineering. *Int J Artif Organs*;26(12):1064–76. 2003a.

VON HEIMBURG D, SEROV G, OEPEN T, PALLUA N. Fat tissue engineering. In: Ashammakhi N, Ferretti P, editors. *Topics in Tissue Engineering*. 2003b.

WEISMAN HF, BUSH DE, MANNISI JA, WEISFELDT ML, HEALY B. Cellular mechanisms of myocardial infarct expansion. *Circulation* 78,186-201. 1988.

WORLD HEALTH ORGANIZATION.. The World Health Report. 1998, 1999, 2000, 2001. Disponível em [www.who.int/](http://www.who.int/)

WICKHAM, MQ; ERICKSON, GR; GIMBLE, JM ET AL. Multipotent stromal cells derived from the infrapatellar fat pad of the knee. *Clinical Orthopaedics*, 196–212. 2003.

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*. 42, 441-448. 2007.

YAMADA Y, YOKOYAMA S, FUKUDA N, KIDOYA H, HUANG XY, NAITOH H, SATOH N, TAKAKURA N. A novel approach for myocardial regeneration with educated cord blood cells cocultured with cells from brown adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun.*, 353(1):182-8. 2007.

YAMAMOTO N, AKAMATSU H, HASEGAWA S, YAMADA T, NAKATA S, OHKUMA M, MIYACHI E, MARUNOUCHI T, MATSUNAGA K. Isolation of multipotent stem cells from mouse adipose tissue. *J Dermatol Sci*. 2007 Oct;48(1):43-52. Epub 2007 Jul 17.

YAÑEZ R, LAMANA ML, GARCÍA-CASTRO J, COLMENERO I, RAMÍREZ M, BUEREN JA. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem Cells*, 24(11):2582-91. 2006.

YUKSEL E, WEINFELD AB, CLEEK R, WAUGH JM, JENSEN J, BOUTROS S, ET AL. De novo adipose tissue generation through long-term, local delivery of insulin and insulin-like growth factor-1 by PLGA/PEG microspheres in an in vivo rat model: a novel concept and capability. *Plast Reconstr Surg*;105:1721–9. 2000.

ZAGO MA, COVAS DT. *Células-tronco: a nova fronteira da medicina*. Atheneu: São Paulo. 2006.

ZHANG DZ, GAI LY, LIU HW, JIN QH, HUANG JH, ZHU XY. Transplantation of autologous adipose-derived stem cells ameliorates cardiac function in rabbits with myocardial infarction. *Chin Med J (Engl)*. Feb 20;120(4):300-7. 2007.

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

ZUK PA, ZHU M, MIZUNO H, HUANG J, FUTRELL JW, KATZ AJ, BENHAIM P, LORENZ HP, HEDRICK MH . Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* Apr;7(2):211-28. 2001.

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.* Dec;13(12):4279-95. 2002.

# 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](#)