



**Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2008**

PATRICIA FIDELIS DE OLIVEIRA

**CÉLULAS MULTIPOTENTES MESENQUIMAIS ESTROMAIS DE MEDULA ÓSSEA
SECRETAM FATORES SOLÚVEIS CAPAZES DE PROMOVER
CARDIOPROTEÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO***

**Rio de Janeiro
2008**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Patrícia Fidelis de Oliveira

**CÉLULAS MULTIPOTENTES MESENQUIMAIS ESTROMAIS DE MEDULA ÓSSEA
SECRETAM FATORES SOLÚVEIS CAPAZES DE PROMOVER
CARDIOPROTEÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO***

Tese de Doutorado 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 Doutor em Ciências Biológicas (Fisiologia)

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

Rio de Janeiro
2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Fidelis-de-Oliveira, P

Células multipotentes mesenquimais estromais de medula óssea secretam fatores solúveis capazes de promover cardioproteção *in vitro* e *in vivo* – Rio de Janeiro, 2008

xv – 137 fls.

Tese (Doutorado em Fisiologia Cardíaca) – Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho do Centro de Ciências da Saúde, 2008

Orientador: Antônio Carlos Campos de Carvalho.

1. Infarto do miocárdio; 2. MSC; 3. apoptose; 4. via parácrina cardíaca – Teses I. Campos-de-Carvalho, Antônio Carlos (orient.) e Goldenberg, Regina Coeli dos Santos. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho do Centro de Ciências da Saúde. III. Células multipotentes mesenquimais estromais de medula óssea secretam fatores solúveis capazes de promover cardioproteção *in vitro* e *in vivo*

FOLHA DE APROVAÇÃO

Patrícia Fidelis de Oliveira

Células multipotentes mesenquimais estromais de medula óssea secretam fatores solúveis capazes de promover cardioproteção *in vitro* e *in vivo*

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

Rio de Janeiro, 29 de maio de 2008.

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

Profa. Dra. Regina Coeli dos Santos Goldenberg – Orientadora

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

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

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

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

Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. José Hamilton Matheus Nascimento – Membro da banca examinadora

Laboratório de Eletrofisiologia Cardíaca Antônio Paes de Carvalho
do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Ricardo Augusto de Melo Reis - Revisor

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

Prof. Dr. Marcelo Felipe Santiago – Suplente Externo

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

Prof. Dra. Denise Pires de Carvalho – Suplente Interno

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

Rio de Janeiro - 2008

*Dedico esta obra aos meus pais, Saulo e
Sandra, como demonstração de carinho e
reconhecimento pelo constante apoio e amor
incondicional.*

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos:

- *Aos meus pais, Saulo e Sandra, pelo constante apoio e incentivo, pelo amor gratuito e incondicional que sempre me fortalece.*
- *Aos demais familiares, pelo amor e incentivo e por me proporcionar momentos felizes e contribuírem para meu equilíbrio diante das dificuldades.*
- *À você, Eli, por sempre me incentivar a seguir em frente, pela compreensão, carinho e amor. Tudo foi mais fácil por você, simplesmente, existir em minha vida. Você sempre terá o meu amor.*
- *Ao meu orientador, Antônio Carlos Campos de Carvalho, pelo aprendizado adquirido, pela confiança e liberdade as quais foram de fundamental importância para meu crescimento pessoal e profissional.*
- *À minha orientadora, Regina Coeli dos Santos Goldenberg, pela constante presença, confiança, dedicação e principalmente, pela compreensão e incentivo.*
- *Ao meu amigo, João Pedro Saar Werneck de Castro, pela imensa contribuição em minha formação, pelo incentivo e presença em todas as etapas deste trabalho. Trabalhar com você será sempre um prazer.*
- *Ao querido amigo, mestre Luis Carlos Reis, pelo constante apoio, amizade e por ser fonte de constante inspiração.*
- *Ao meu amigo, Ricardo Henrique, pela amizade e por enriquecer de forma significativa minha formação. Sempre aprendo com você.*

- *As técnicas do Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular, Juliana e Andresa, pela assistência na execução deste trabalho, pela amizade e apoio. Vocês sempre serão lembradas com muito carinho.*
- *Aos alunos de iniciação científica, Brenda e Renan, pela oportunidade de crescimento profissional, pelo apoio e amizade.*
- *Aos professores Fábio Fagundes da Rocha e Magda Medeiros do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pelo aprendizado, apoio, compreensão e incentivo.*
- *Ao professor Ricardo Reis, do laboratório de Neuroquímica do IBCCF pelo grande aprendizado e apoio em momentos cruciais.*
- *Aos amigos do Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular pelos momentos de discussão científica e pelos ótimos momentos de descontração.*
- *Aos professores do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, pelo aprendizado adquirido.*
- *Aos funcionários do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, em especial à funcionária “Sandrinha” pela competência e assistência durante esses anos de convívio.*
- *A minha ex-orientadora, Profa. Dra. Maria de Lourdes, do departamento de física, química e biologia da UNESP – campus de Presidente Prudente, pela amizade e por me iniciar no mundo da ciência de forma tão competente. Você nunca será esquecida.*
- *à Capes pelo apoio financeiro que possibilitou a dedicação a este trabalho.*
- *A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.*

"Se não houve frutos, valeu a beleza das flores

Se não houve flores, valeu a sombra das folhas

Se não houve folhas, valeu a firmeza do caule

Se não houve caule, Valeu a intenção da

semente"

Autor desconhecido

RESUMO

Fidelis-de-Oliveira, P. Células multipotentes mesenquimais estromais de Medula óssea secretam fatores solúveis capazes de promover cardioproteção *in vitro* e *in vivo*. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Fisiologia) – IBCCF-UFRJ

Os mecanismos relacionados à melhora funcional cardíaca após injeção de células multipotentes mesenquimais estromais de medula óssea (MSC) em corações infartados ainda não foram completamente elucidados. O objetivo do presente estudo foi investigar se fatores solúveis secretados pelas MSC poderiam promover cardioproteção *in vivo* e se essa cardioproteção envolvia um efeito parácrino anti-apoptótico. Para tanto, utilizou-se o meio condicionado (MC) de MSC de terceira passagem submetidas a 72 horas de condicionamento com meio de cultura DMEM sem soro em condições de normóxia (MCN) ou hipóxia (MCH). Em alguns grupos e condições experimentais utilizou-se MC obtidos em normóxia (MCN-C) e hipóxia (MCH-C) concentrados 25 vezes por ultrafiltração. A cardioproteção *in vivo* foi testada em modelo de infarto agudo (IAM) e crônico (ICM) do miocárdio induzido em ratos Wistar pela ligadura permanente da artéria coronária esquerda. Nos grupos com IAM, a injeção intramiocárdica de MCN (n=9), MCN-C (n=6), MCH-C (n=15) ou meio DMEM não condicionado (n=17) foi realizada 3 horas após a ligadura e a função cardíaca foi avaliada 21 dias após a injeção. Nos grupos com ICM a injeção intramiocárdica de DMEM (n=3) ou MCH-C (n=6) foi feita 4 semanas após IM e a função cardíaca foi avaliada 2 semanas após injeção. A função cardíaca foi avaliada por eletro e ecocardiograma, por parâmetros obtidos da pressão ventricular esquerda e por teste de esteira. A cardioproteção *in vitro* foi avaliada quantificando a apoptose em cardiomiócitos ventriculares de ratos neonatos submetidos à privação de soro associada a 24 horas de hipóxia (O₂ de 1%) na ausência ou presença de diferentes diluições de MCN e MCH. Os resultados do estudo *in vivo* mostram que o MCH-C quando administrados 3 horas após IAM foi capaz de promover redução significativa (35%) nos valores de pressão diastólica final e aumento discreto da contratilidade (15%) e relaxamento (12%) cardíaco, embora a capacidade máxima ao exercício não tenha sido diferente entre os grupos. Este mesmo efeito não foi observado quando o MCH-C foi administrado tardiamente em ICM. Estes dados sugerem um possível efeito citoprotetor precoce do MC que foi testado *in vitro* em cultura de cardiomiócitos. Os resultados *in vitro* mostram que o MCN e MCH foram capazes de reduzir o percentual de cardiomiócitos em apoptose tardia e/ou necrose. Em conclusão, os dados mostram que fatores solúveis secretados *in vitro* pelas MSC promovem cardioproteção *in vivo* e que portanto o mecanismo parácrino via ação anti-apoptótica pode estar envolvido na melhora funcional após terapia com MSC.

ABSTRACT

Fidelis-de-Oliveira, P. Bone marrow-derived multipotent Mesenchymal stromal cells secrete soluble factors able to promote cardioprotection *in vitro* and *in vivo*. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Fisiologia) – IBCCF-UFRJ

The mechanisms underlying the functional improvement after intramyocardial injection of multipotent mesenchymal stromal cells (MSC) in infarcted hearts remain incomplete understood. The aim of this study was to investigate if MSC soluble factors could promote cardioprotection *in vivo* through anti-apoptotic paracrine pathway. For this purpose, conditioned médium (CM) was obtained from passage 3 MSC culture submitted to 72 hours of conditioning in DMEM serum-free at normoxia (NCM) or hypoxia (HCM). In some groups and experimental conditions, CM obtained at normoxia (C-NCM) and hypoxia (C-HCM) was previously 25-fold concentrated by ultrafiltration. The *in vivo* cardioprotection was tested in a model of acute (AMI) and chronic (CMI) myocardial infarction induced in Wistar rats by permanent left coronary occlusion. In AMI groups, intramyocardial injection of NCM (n=9), C-NCM (n=6), C-HCM (n=15) or non-conditioned DMEM (n=17) was done 3 hours after coronary occlusion and cardiac function was evaluated at 21 days after injection. In CMI groups, intramyocardial injection of DMEM (n=3) ou C-HCM (n=6) was done 4 weeks after MI and cardiac function was evaluated at 2 weeks after injection. The cardiac function was evaluated by eletro and echocardiogram, left ventricular cateterization and treadmill test. The *in vitro* cardioprotection was evaluated by neonatal ventricular cardiomyocytes apoptosis quantification after 24 hours of serum deprivation associated with hypoxia (O₂ 1%) in absence or presence of NCM and HCM at different dilutions. The *in vivo* results show C-HCM when administrated 3 hours after AMI was able to promote significant reduction (35%) in left ventricular end-diastolic pressure and slight increase in cardiac contractility (15%) and relaxation (12%). These effects were not observed when C-HCM was injected lately in CMI. So, these results suggest a early citoprotector effect of CM which was tested cardiomyocytes *in vitro*. The *in vitro* results showed that NCM and HCM were able to decrease percentual late cardiomyocytes apoptosis and/or necrosis. In conclusion, these results showed that soluble factors secreted *in vitro* by MSC can promote cardioprotection *in vivo* and suggest that paracrine mechanisms by anti-apoptotic effect may be involved in functional improvement after MSC therapy.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Dispositivo de Ultrafiltração Centriprep. _____	39
FIGURA 2 – Análise por citometria de fluxo de conteúdo de DNA marcado com EtBr. _____	55
FIGURA 3 – Cultura de células multipotentes mesenquimais estromais de medula óssea. A: 12-14 dias após o plaqueamento; B, C e D: após primeira, segunda e terceira passagem com tripsina, respectivamente. Fotos com aumento de 100X. _____	60
FIGURA 4 – Cultura de células multipotentes mesenquimais estromais de rato (MSC) após privação de soro. A: MSC uma semana após a terceira passagem com tripsina já no estado de confluência em meio DMEM com 10% de SFB. B, C e D: MSC de terceira passagem com 24, 48 e 72 horas de privação de soro em normóxia, respectivamente. Setas indicam células com retração citoplasmática. _____	61
FIGURA 5 – Viabilidade das MSC após privação de soro pela exclusão do corante azul de Trypan. _____	63
FIGURA 6 – Viabilidade das MSC após privação de soro associada a hipóxia por exclusão do corante azul de Trypan. _____	65
FIGURA 7 – Estudo eletrocardiográfico realizado 3 horas e 21 dias após a injeção intramiocárdica – Protocolo experimental I. _____	69
FIGURA 8 – Estudo ecocardiográfico realizado 3 horas e 21 dias após a injeção intramiocárdica – Protocolo experimental I. _____	72
FIGURA 9 – Tempo de exercício em esteira – Protocolo Experimental I _____	73
FIGURA 10 – Quantificação do tamanho do infarto (%) obtido através do percentual de perímetro infartado visualizado em coloração histológica de <i>Picrosirius Red</i> . – Protocolo experimental I. _____	77
FIGURA 11 – Estudo eletrocardiográfico realizado 3 horas e 21 dias após a injeção intramiocárdica – Protocolo experimental II. _____	81
FIGURA 12 – Estudo ecocardiográfico realizado 3 horas após infarto e 21 dias após a injeção intramiocárdica – Protocolo experimental II. _____	83
FIGURA 13 – Tempo de exercício em esteira – Protocolo Experimental II _____	84
FIGURA 14 – Quantificação do tamanho do infarto (%) obtido através do percentual de perímetro infartado visualizado em coloração histológica de <i>Picrosirius Red</i> – Protocolo Experimental II. _____	88
FIGURA 15 – Estudo eletrocardiográfico realizado 4 (pré-administração) e 6 semanas após infarto (pós-administração) – Protocolo experimental III. _____	90
FIGURA 16 – Estudo ecocardiográfico realizado 4 (pré-administração) e 6 semanas após infarto (pós-administração) – Protocolo experimental III. _____	91
FIGURA 17 – Tempo de exercício em esteira (minutos) 6 semanas após IM – Protocolo Experimental III _____	92
FIGURA 18 – Quantificação do tamanho do infarto (%) obtido através do percentual de perímetro infartado visualizado em coloração histológica de <i>Picrosirius Red</i> – Protocolo Experimental III. _____	95
FIGURA 19 – Quantificação da apoptose, por citometria de fluxo, em cardiomiócitos permeabilizados e marcados com EtBr – MCN-d. _____	98
FIGURA 20 - Histogramas obtidos da quantificação de apoptose em cardiomiócitos permeabilizados e marcados com EtBr. _____	100

FIGURA 21 – Quantificação da apoptose (%), por citometria de fluxo, em cardiomiócitos permeabilizados e marcados com EtBr. _____	101
FIGURA 22 – Viabilidade celular nas diferentes condições experimentais, quantificadas por citometria de fluxo como a população negativa para marcação com Anexina-V e PI - Estudo do MCN _____	104
FIGURA 23 – Percentual de células em apoptose precoce quantificadas por citometria de fluxo e marcação por anexina-V e PI - Estudo do MCN _____	106
FIGURA 24 – Percentual de células em apoptose tardia quantificadas por citometria de fluxo e marcação por anexina-V e PI - Estudo do MCN _____	107
FIGURA 25 – Viabilidade celular nas diferentes condições experimentais, quantificadas por citometria de fluxo como a população negativa para marcação com Anexina-V e PI. - Estudo do MCH _____	109
FIGURA 26 – Percentual de células em apoptose precoce quantificadas por citometria de fluxo e marcação por anexina-V e PI - Estudo do MCH _____	111
FIGURA 27 – Percentual de células em apoptose tardia quantificadas por citometria de fluxo e marcação por anexina-V e PI - Estudo do MCH _____	112

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Estudo eletrocardiográfico (Protocolo experimental I) obtido 3 horas (pré-injeção im) e 21 dias após infarto e injeção intramiocárdica de DMEM , meio condicionado obtido em normóxia não concentrado (MCN) e concentrado em 25 vezes (MCN-C). FO : grupo falso-operado. Â-QRS : vetor médio de despolarização do ventricular. _____	67
TABELA 2 – Parâmetros funcionais obtidos do registro de pressão ventricular esquerda 21 dias após IM – Protocolo experimental I _____	75
TABELA 3 – Estudo eletrocardiográfico (Protocolo Experimental II) obtido 3 horas (pré-injeção im) e 21 dias após infarto e injeção intramiocárdica de DMEM ou meio condicionado obtido em hipóxia concentrado, MCH-C . Â-QRS : vetor médio de despolarização ventricular. _____	79
TABELA 4 – Parâmetros obtidos a partir da pressão ventricular esquerda – Protocolo II _____	86
TABELA 5 – Parâmetros obtidos do registro de pressão ventricular esquerda - Protocolo Experimental III _____	94

LISTA DE SIGLAS

ADVE	Área em diástole do ventrículo esquerdo
ÂQRS	Ângulo do vetor médio de despolarização ventricular
ASVE	Área em sístole do ventrículo esquerdo
CCS	Centro de Ciências da Saúde
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DP/dt -	Índice de relaxamento cardíaco
dP/dt+	Índice de contratilidade cardíaca
ECG	Eletrocardiograma
ECO	Ecocardiograma
FC	Frequência cardíaca
FEA	Fração de encurtamento de área
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
G-CSF	Fator de estimulação de colônia de granulócitos
GFP+	Proteína fluorescente verde
IAM	infarto agudo do miocárdio
ICM	Infarto crônico do miocárdio
IL-1	interleucina 1
Il-6	Interleucina 6
IM	Infarto do miocárdio
IQRS	Índice QRS
MC	Meio condicionado
MCH	Meio Condicionado obtido em hipóxia
MCH1X	Meio condicionado obtido em hipóxia 1 vez concentrado
MCH25X	Meio condicionado obtido em hipóxia 25 vez concentrado
MCH5X	Meio condicionado obtido em hipóxia 5 vez concentrado
MCH-C	Meio Condicionado obtido em hipóxia 25 vezes concentrado
MCN	Meio Condicionado obtido em normóxia
MCN1X	Meio condicionado obtido em normóxia 1 vez concentrado
MCN25X	Meio condicionado obtido em normóxia 25 vez concentrado
MCN5X	Meio condicionado obtido em normóxia 5 vez concentrado
MCN-C	Meio Condicionado obtido em normóxia 25 vezes concentrado
MSC	Células multipotentes mesequimais estromais da medula óssea
NGF	Fator de crescimento neuronal
PDFVE	pressão diastólica final do ventrículo esquerdo
PDVE	Pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo
PSF	Pressão sistólica final
SDF-1	Fator derivado de estroma 1
TGF- β	Fator transformador de crescimento
TNF- α	fator de necrose tumoral α
VE	Ventrículo esquerdo
VEGF	Fator de crescimento de endotélio

Sumário

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 O INFARTO DO MIOCÁRDIO	16
1.2 O MODELO DE INFARTO EM RATOS	20
1.3 A MORTE CELULAR NO INFARTO DO MIOCÁRDIO	22
1.4 A TERAPIA CELULAR NO INFARTO	24
2. OBJETIVOS	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 ANIMAIS	33
3.2 CULTURA DE CÉLULAS MULTIPOTENTES MESENQUIMAIS ESTROMAIS DE MEDULA ÓSSEA	33
3.2.1 Isolamento de células	33
3.2.2 Expansão das células	34
3.3 COLETA DO MEIO CONDICIONADO	36
3.3.1 Concentração do meio condicionado	37
3.3.2 Avaliação da viabilidade celular após coleta do meio condicionado	40
3.4 ESTUDO IN VIVO DO EFEITO DO MEIO CONDICIONADO	40
3.4.1 Indução do Infarto	40
3.4.2 Protocolos e grupos experimentais	41
3.4.3 Análises Funcionais	44
3.4.4 Análise histológica e obtenção do tamanho do infarto	48
3.5 ESTUDO IN VITRO DO EFEITO DO MEIO CONDICIONADO	49
3.5.1 Cultura de cardiomiócitos	50
3.5.2 Quantificação da apoptose em cardiomiócitos de ratos neonatos	51
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	58
4. RESULTADOS	59
4.1 CULTURA DE MSC	59
4.2 VIABILIDADE DAS MSC APÓS 72 HORAS DE PRIVAÇÃO DE SORO	59
4.3 VIABILIDADE DAS MSC APÓS 72 HORAS DE PRIVAÇÃO DE SORO E HIPÓXIA	64
4.4 ESTUDO IN VIVO DO EFEITO DO MEIO CONDICIONADO	66
4.4.1 Protocolo Experimental I	66
4.4.2 Protocolo Experimental II	78
4.4.3 Protocolo Experimental III	87
4.5 ESTUDO IN VITRO DO EFEITO DO MEIO CONDICIONADO	96
4.5.1 Quantificação da apoptose por marcação com EtBr e citometria de fluxo	96
4.5.2 Quantificação da apoptose por marcação com anexina-V e PI e citometria de fluxo	102
4.5.2.1 Estudo do MC obtido em normóxia – MCN	103
4.5.2.1 Estudo do MC obtido em hipóxia – MCH	108
5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	113
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128

1. INTRODUÇÃO

1.1 O infarto do miocárdio

As doenças cardiovasculares são responsáveis por aproximadamente 30% das causas de mortalidade mundial estando 10% deste percentual relacionado a eventos isquêmicos (WHO, 2000). Dentre as doenças cardiovasculares, o infarto do miocárdio tem apresentado prevalência crescente na população.

O infarto do miocárdio é causado pela obstrução de vasos da circulação coronariana com conseqüente redução do fluxo local e perda de cardiomiócitos. A interrupção do fluxo sanguíneo promove uma série de alterações funcionais e estruturais chamadas de remodelamento cardíaco. Do ponto de vista funcional, 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 e 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).

Do ponto de vista estrutural, durante as primeiras horas após a interrupção do fluxo sanguíneo e conseqüente morte dos miócitos, ocorre 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 e Braunwald, 1990). Dependendo da espécie, o processo finaliza dentro de semanas ou meses.

Durante o período de reabsorção do tecido necrótico, porém ainda antes da extensa deposição de colágeno, a região infartada torna-se fina e alongada. Este processo foi denominado expansão do infarto que é definido como uma dilatação aguda e afinamento da parede na região do infarto (Weisman e cols., 1988; Pfeffer e Braunwald, 1990). Após esta fase de alterações agudas, segue-se uma fase de remodelamento tardio que acomete a região não infartada levando a uma dilatação progressiva do ventrículo esquerdo. Em um primeiro momento, a dilatação do ventrículo esquerdo consiste em uma reação adaptativa no sentido de preservar o débito sistólico (Pfeffer e Braunwald, 1990). Logo, a perda de força contrátil seria contrabalançada por aumento de volume que então manteria o débito sistólico apesar da fração de ejeção estar diminuída após o infarto. Entretanto, de acordo com a Lei de Laplace que relaciona tensão diretamente com o raio, o aumento do raio da cavidade ventricular leva a aumento do estresse de parede que por sua vez atua como um estímulo adicional contribuindo para a dilatação do ventrículo esquerdo e aumentando o consumo de oxigênio pelo miocárdio. Devido à contratilidade prejudicada, o estresse de parede é mantido alto mesmo durante a ejeção uma vez que o coração infartado apresenta dificuldades em diminuir o diâmetro durante a sístole (Pfeffer & Braunwald, 1990; Holmes e cols., 2005).

A dilatação progressiva do ventrículo esquerdo parece não estar relacionada ao estiramento muscular, visto que a análise histológica mostra que o comprimento dos sarcômeros está normal em regiões remotas ao infarto, mas sim a um rearranjo

das miofibrilas (Linzbach, 1960). Pacientes que exibem expansão do infarto e maiores níveis de dilatação do ventrículo esquerdo são mais suscetíveis ao desenvolvimento de insuficiência cardíaca congestiva, formação de aneurisma e ruptura do miocárdio (McKay e cols., 1986; Pierard e cols., 1987; Jugdutt e Michorowski, 1987; Weiss e cols., 1991)

O remodelamento tardio que acomete a região não infartada pode também envolver alterações na matrix extracelular onde um aumento na deposição de colágeno (Weber e cols., 1994; Van Kerckloven e cols., 2000) e alteração na atividade de metaloproteinases e inibidores de metaloproteinases foi observado (Peterson e cols., 2000).

Além da expansão do infarto e dilatação do ventrículo esquerdo, a hipertrofia excêntrica da região viável também consiste em um fator estrutural morfológico importante que se inicia precocemente após o infarto e que perdura após o processo de cicatrização. O aumento no estresse de parede decorrente da dilatação ventricular e perda de massa contrátil consiste em um estímulo à hipertrofia dos miócitos. Neste caso, a hipertrofia funciona também como um mecanismo compensatório que atua na tentativa de aumentar a fração de encurtamento e o débito sistólico. Porém, em infartos que acometem grande porcentagem do ventrículo esquerdo, a hipertrofia reativa do tecido remanescente não consegue compensar a perda de miócitos e falha em promover a redução no estresse de parede (Pfeffer & Braunwald, 1990).

Logo, a insuficiência dos mecanismos compensatórios não consegue conter a dilatação que ocorre de forma progressiva em um ciclo vicioso que acaba por culminar no quadro de insuficiência cardíaca. Vale ressaltar que a dilatação do

ventrículo esquerdo está associada com aumento do risco relativo de morte em pacientes infartados (Mackay e cols., 1986).

Até recentemente, o coração era dito um órgão sem capacidade regenerativa e portanto, os mecanismos compensatórios envolvidos no processo de remodelamento não abordavam a proliferação de miócitos como componente deste processo. Na verdade, a primeira evidência da capacidade proliferativa de miócitos surgiu em um estudo realizado por Linzbach (1960) que mostrou um aumento no número de miócitos em corações humanos hipertrofiados. Poucos anos depois, Rumyantsev (1964) demonstrou que as células cardíacas eram capazes de passar por todas as fases do ciclo celular. Entretanto, somente a partir do meio da década de noventa esse assunto foi retomado e novos estudos surgiram (Anversa & Kajstura, 1998; Beltrami e cols., 2003; Urbanek e cols., 2005; Mouquet e cols., 2005) confirmando essas primeiras evidências e mostrando que a relação entre morte e replicação de miócitos está presente no “*turnover*” do tecido cardíaco e em situações fisiopatológicas como o infarto (Kajstura e cols., 1998; Beltrami e cols., 2001).

As células progenitoras cardíacas apresentam marcadores específicos de células-tronco (c-Kit⁺, Sca1⁺ e MDR) e são capazes de se diferenciar *in vitro* e *in vivo* em cardiomiócitos, músculo liso vascular e células endoteliais (Beltrami e cols., 2003; Dawn e cols., 2005). Essas células foram encontradas em maior número no átrio e na porção ventricular viável apical (Urbanek e cols., 2005) após o infarto. São células com capacidade de migrar pelo interstício e que parecem não depender da via vascular (Urbanek e cols., 2005) para a migração. Em um coração infartado, o índice mitótico é maior quando comparado a um coração intacto (Nadal-Ginard e cols., 2003), fato que sugere que a isquemia em si e/ou fatores ligados a esse evento desencadeiam uma resposta proliferativa (hiperplasia) que juntamente com a

hipertrofia cardíaca irão contribuir para formação de massa cardíaca funcional. Entretanto, a hiperplasia e a hipertrofia são processos restritos à área viável remanescente e, com maior significância, à área de borda do infarto, visto que as próprias células progenitoras são vítimas da interrupção do fluxo e portanto não podem exercer papel regenerativo na região infartada (Anversa & Nadal-Ginard, 2002; Urbanek e cols., 2005).

Logo o remodelamento cardíaco, que ocorre em resposta ao evento isquêmico, é a resultante de uma série de alterações estruturais e geométricas na área necrótica e peri-infarto bem como na região viável. É um mecanismo adaptativo à injúria que quando é incapaz de compensar a perda tecidual acaba por culminar em um quadro de insuficiência cardíaca congestiva grave.

1.2 O modelo de infarto em ratos

Modelos experimentais de infarto são essenciais para estudos que investigam a fisiopatologia e intervenções terapêuticas nesta doença. O modelo de infarto do miocárdio em rato foi primeiramente estabelecido por Heimburger em 1946 e posteriormente modificado para pequenos animais por Johns & Olson (1954). Johns & Olson realizavam a cirurgia através de uma toracotomia e mantinham o animal ventilando artificialmente por pressão positiva através de um tipo de máscara com 90% de O₂, por um período de 30 minutos. Em 1960, Selye e cols., publicaram uma técnica modificada, na qual o animal permanecia respirando espontaneamente e onde o acesso ao coração era feito rapidamente (60 a 90s) através de uma incisão anterior no sexto espaço intercostal. Em 1976, Maclean e cols. apresentaram uma técnica cirúrgica diferente 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.

No modelo de infarto em rato, a função ventricular e a sobrevivência estão relacionadas com o tamanho do infarto. Neste modelo, a região infartada já se encontra histologicamente preenchida por tecido cicatricial após 3 semanas de indução do infarto (Fletcher e cols., 1981) e um aumento adicional de até 30% do volume ventricular foi observado em animais analisados 3 meses após indução de infarto moderado com acometimento de 20-40% do ventrículo esquerdo (Pfeffer e cols., 1985).

Francis e cols (2001) realizaram um estudo no qual se investigou as alterações cardíacas e humorais na progressão da insuficiência cardíaca em ratos submetidos à ligadura permanente da coronária esquerda. Neste estudo, através da análise ecocardiográfica, a fração de ejeção do ventrículo esquerdo foi reduzida a valores típicos de insuficiência cardíaca imediatamente após a ligadura da coronária, com insignificante alteração após 6 semanas da ligadura. Em contraste, o volume diastólico final apresentou-se imediatamente aumentado e continuou a aumentar ao longo das 6 semanas de acompanhamento. Esta dilatação, em um primeiro momento, é descrita como favorável do ponto de vista hemodinâmico, uma vez que o débito sistólico pode ser mantido em detrimento do aumento do estresse de parede apesar da fração de ejeção permanecer baixa.

A ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona foi precocemente requisitada e também contribuiu com a manutenção do débito sistólico por aumentar a pressão de enchimento do ventrículo dilatado. Neste estudo, o mecanismo compensatório descrito atingiu o patamar máximo na quarta semana após o infarto

quando o débito sistólico alcançou seu valor de pico, mas o volume do ventrículo esquerdo continuou a aumentar. Essa progressiva dilatação ventricular frente à ausência de incrementos no débito sistólico indicou que este mecanismo compensatório se exauriu e mostrou que a persistência dos mecanismos regulatórios neuro-humorais associados com retenção de volume e vasoconstrição periférica passaram a ter ação deletéria caracterizando o quadro de insuficiência cardíaca.

1.3 A morte celular no infarto do miocárdio

A persistência da isquemia leva à perda irreversível dos cardiomiócitos. Essa perda pode ser por necrose, que é o tipo de morte celular que ocorre em decorrência da privação de fluxo sanguíneo. A necrose caracteriza-se por falência e ruptura da membrana plasmática que é acompanhada clinicamente através da elevação de marcadores bioquímicos de lise celular tais como a troponina T e enzima creatinofosforquinase (Antman e cols., 2000; Hernandez e cols., 2003). A lise celular desencadeia por sua vez uma resposta inflamatória que pode repercutir negativamente sobre o tecido (Moens e cols., 2004).

Um outro tipo de morte celular relacionada com a perda de miócitos no infarto do miocárdio é a apoptose (Bialik e cols., 1997; Palojoki e cols., 2001; Abbate e cols., 2002). A apoptose é um tipo de morte celular programada induzida por sinais externos ou internos que ativam caspases proteolíticas levando a desestabilização celular. A apoptose começa internamente com a condensação e subsequente fragmentação do núcleo enquanto a membrana celular permanece intacta. Outras características da apoptose incluem a fragmentação do DNA e exposição dos grupamentos de fosfatidilserina para o meio extracelular. Em geral, a apoptose é

induzida em resposta a uma grande variedade de estímulos tais como citocinas, drogas citotóxicas, estresse oxidativo e radiação ionizante (Revee e cols., 2005). Este tipo de morte celular é o mais bem caracterizado e sua natureza altamente regulada faz com que seja um alvo atrativo para se estudar intervenções terapêuticas.

A apoptose é um processo fisiológico envolvido no desenvolvimento cardíaco. Entretanto sua importância em processos fisiopatológicos incluindo infarto do miocárdio, injúria de isquemia e reperfusão, estágio final de insuficiência cardíaca, hipertensão arterial e cardiomiopatia dilatada têm sido apontada em diversos estudos (Anversa e cols., 1998; Vakeva e cols., 1998; Sabbah e cols., 2000; Hamet e cols., 1995; Yamamura e cols., 1999).

No infarto do miocárdio, particularmente, a apoptose tem sido quantificada por diferentes métodos, fator que contribui para a variação de resultados entre os diversos estudos. Entretanto, apesar desta variação, há um certo consenso em se afirmar que a apoptose está envolvida com a perda considerável de cardiomiócitos após interrupção ou redução do fluxo sanguíneo à determinada região do miocárdio. Bialik e cols (1997) investigaram o nível de apoptose, em diferentes tempos, em camundongos submetidos à ligadura permanente da coronária descendente anterior. Neste estudo, após 4 horas de interrupção do fluxo sanguíneo foi possível verificar fragmentação do DNA em gel de agarose sugerindo que a perda de cardiomiócitos ocorreu em parte por apoptose. Esta fragmentação apresentou valor de pico 18 horas após a ligadura, mantendo-se por até 48 horas e declinando com o tempo de 72 horas pós-ligadura. Ainda neste estudo, através da técnica de TUNEL, foi possível verificar no tecido um maior nível de apoptose nas regiões hipoperfundidas e regiões em hipóxia.

Estudos *in vitro* utilizando cultura de cardiomiócitos de ratos neonatos mostram que a privação de soro consiste em estímulo para apoptose (González-Juanatey e cols., 2004) sendo potencializado quando em associação com a hipóxia (Chao e cols., 2005). Este modelo tem sido utilizado para simular *in vitro* os componentes da isquemia.

Embora diferentes modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* relatem a importância da apoptose nas doenças cardiovasculares, pouco ainda se conhece a respeito de fatores anti-apoptóticos e sua relevância clínica. Fatores tróficos tais como o HGF (do inglês *hepatocyte growth factor*), FGF (do inglês *fibroblastic growth factor*) e IGF-1 (do inglês *insuline-like growth factor*) parecem reduzir o índice de apoptose em cardiomiócitos *in vivo* e *in vitro* (Wang e cols., 1998; Lin e cols., 2005; Jiang e cols., 2002; Taketani e cols., 2005). Portanto, diante do impacto da apoptose nas doenças cardiovasculares, intervenções terapêuticas com efeito anti-apoptótico ainda merecem estudos adicionais.

1.4 A Terapia celular no infarto

Após o infarto do miocárdio, a sobrevivência dos cardiomiócitos está relacionada com o tempo de permanência na condição de isquemia. A reperfusão precoce do tecido isquêmico por angioplastia ou trombolítico tem se mostrado eficaz em diminuir o tamanho do infarto (Moens e cols., 2004). Porém, esta conduta acaba por desencadear uma série de alterações deletérias chamadas coletivamente de injúria de reperfusão. Os maiores mediadores da injúria de reperfusão são os radicais de oxigênio, sobrecarga de Ca^{2+} e a infiltração neutrofílica (Moens e cols., 2004; Buja, 2005). Os radicais de oxigênio são produzidos pelos miócitos e células endoteliais afetadas pela isquemia. Estes radicais exacerbam o dano da membrana

celular, o que leva a um aumento da permeabilidade ao Ca^{2+} . Os neutrófilos se acumulam na microcirculação e liberam mediadores inflamatórios contribuindo para a obstrução microvascular e a disfunção endotelial.

Sabe-se que o quadro de isquemia quando detectado nem sempre é passível de reparo por reperfusão, visto que muitas vezes a janela temporal recomendada para este procedimento já foi excedida. Nesses casos, a disfunção cardíaca estará relacionada diretamente com o tamanho da área acometida (Moens e cols., 2004). Em infartos extensos, os mecanismos compensatórios e as terapias usuais tornam-se insuficientes na manutenção da homeostase e o quadro de insuficiência cardíaca acaba sendo inevitável.

A conduta terapêutica até então, frente a um caso de insuficiência cardíaca grave, consistia em transplante cardíaco, o qual tem mostrado desproporcionalidade entre o número de doadores e receptores. Além disso, o transplante cardíaco exige que o paciente se submeta ao tratamento imunossupressor que apresenta alto custo e efeitos adversos indesejáveis. Frente ao índice impactante de morte por doenças do sistema cardiovascular e devido as limitações das condutas terapêuticas em promover melhora funcional do quadro de insuficiência cardíaca congestiva grave, nos últimos anos, terapias alternativas utilizando células-tronco após infarto do miocárdio têm sido investigadas em humanos (Strauer e cols., 2002; Perin e cols., 2003) e em animais experimentais (Orlic e cols., 2001a,b; Amado e cols., 2005).

A célula-tronco é uma célula indiferenciada, sem especialização funcional e marcadores de diferenciação tecido-específico, com capacidade de proliferação, autorenovação e plasticidade (Herzog e cols., 2003). As células-tronco podem ser obtidas de diferentes tecidos adultos, incluindo medula óssea (Pittenger e cols., 1999), coração (Beltrami e cols., 2003), cérebro (Doetsch e cols., 1999), tecido

adiposo (Cousin e cols., 2003) dentre outros, e também da massa interna do embrião de onde se obtém as células-tronco embrionárias (Min e cols., 2002). O uso de células-tronco embrionárias ainda é limitado por entraves éticos-religiosos, por questões de segurança (formação de teratoma) e por necessitar de terapia imunossupressora após o transplante (Fujikawa e cols., 2005). Logo, estudos utilizando a terapia celular com células-tronco adultas autólogas tem sido bastante encorajados.

Dentre as fontes de células-tronco adultas mais estudadas destaca-se a medula óssea. A medula óssea é um tecido complexo que contém células-tronco hematopoiéticas, capazes de se diferenciar em todos os tipos celulares da linhagem hematopoiética, e células-tronco não hematopoiéticas com característica de células multipotentes (Pittenger e cols., 1999; Hung e cols., 2002)

As células-tronco não hematopoiéticas foram primeiramente isoladas por Friedenstein e cols. (1976), baseando-se na propriedade que essas células apresentam de aderir à superfície dos frascos de cultura. Essa população aderente ao frasco de cultura era constituída de células de morfologia heterogênea que foram denominadas células de estroma de medula óssea (CEMO). Dentro da população estromal encontram-se, em pequena porcentagem, as células-tronco mesenquimais de medula óssea (MSC), ditas multipotentes devido à capacidade de se diferenciar em diferentes tipos celulares (osteoblastos, condrócitos, adipócitos, miócitos) quando em cultura sob condições específicas (Herzog e cols., 2003; Bianco e cols., 2001; Pittenger e cols., 1999). Recentemente, a ISCT (do inglês *International Society for Cellular Therapy*) se pronunciou diante da utilização do termo célula-tronco mesenquimal no sentido de esclarecer e padronizar a terminologia utilizada na literatura (Horwitz e cols., 2005). Foi sugerido que as células aderentes ao frasco de

cultura com morfologia semelhante aos fibroblastos, independente do tecido do qual tenham sido isoladas, sejam denominadas células multipotentes mesenquimais estromais. O termo células-tronco mesenquimais deve ser utilizado apenas para as células que apresentem os requisitos específicos estipulados para célula-tronco (Horwitz e cols., 2005). Em adição, a ISCT informou que a sigla MSC pode ser empregada para ambos os tipos celulares desde que os autores utilizem uma das duas definições em seus estudos. Esses critérios mínimos, entretanto estão melhor definidos para as MSC humanas visto que a fenotipagem de MSC murina ainda não foi totalmente estabelecida.

Em relação as células-tronco mesenquimais, ainda não há um consenso totalmente formado, principalmente em relação aos marcadores específicos, mas três critérios mínimos têm sido sugeridos para a definição de célula-tronco mesenquimal: a) aderência ao frasco de cultura; b) marcação positiva para CD105, CD90, CD73 e negativa para CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19, HLA-DR e c) diferenciação *in vitro* em condroblastos, osteoblastos e adipócitos (Dominici e cols., 2006).

Considerando a multipotencialidade das células de medula óssea (Herzog e cols., 2003; Bianco e cols., 2001; Pittenger e cols., 1999; Song & Tuan, 2004) demonstrada *in vitro*, estudos *in vivo* investigando o uso terapêutico dessas células no infarto do miocárdio foram fortemente encorajados (Orlic e cols., 2001; Strauer e cols., 2002; Kocher e cols., 2001). Orlic e cols. (2001a) mostraram que células lin⁻ e c-kit⁺, oriundas da medula óssea, quando injetadas em corações de camundongos infartados promoviam melhora da função cardíaca através da transdiferenciação dessas células nos três tipos celulares (cardiomiócitos, células endoteliais e músculo liso) encontrados no tecido cardíaco. Ainda recentemente, um estudo desenvolvido

em nosso laboratório, mostrou que a injeção intramiocárdica de células de estroma de medula óssea (CD34⁺/CD45⁻), isoladas pela propriedade de aderência ao frasco de cultura, em ratos com modelo de infarto crônico promovia melhora na função cardíaca podendo estar associada à angiogênese ou formação de novos cardiomiócitos (Olivares e cols., 2004).

A eficácia da injeção intramiocárdica de MSC foi demonstrada em modelo de isquemia e reperfusão em porco (Amado e cols., 2005). Neste estudo, as MSC obtidas após terceira passagem com tripsina foram injetadas diretamente no coração (2×10^8 células), 3 dias após a indução da isquemia e reperfusão. Os resultados mostraram que a injeção intramiocárdica promoveu melhora funcional e redução no tamanho do infarto. Resultado semelhante, porém de menor magnitude, foi obtido sobre o tamanho do infarto e função cardíaca utilizando o mesmo modelo experimental e injetando MSC (2×10^7 células) 2 semanas após o infarto (Shake e cols., 2002). Vale ressaltar que nestes estudos o tamanho do infarto resultante da isquemia e reperfusão foi de aproximadamente 16% sendo portanto, um infarto de pequena extensão.

Além da injeção intramiocárdica, a mobilização de células-tronco da medula óssea para a circulação periférica, através da administração de G-CSF (do inglês *granulocyte colony-stimulating factor*), tem sido estudada como alternativa terapêutica não invasiva no infarto do miocárdio (Fu & Liesveld, 2000; Orlic e cols., 2001b). Ohtsuka e cols. (2004) mostraram que o G-CSF sozinho ou em combinação com SCF (do inglês *stem cell factor*) antes ou após o infarto resultou em melhora da função cardíaca que foi atribuída ao aumento na densidade de capilares e redução da apoptose na área de borda de infarto, visto que somente um pequeno número de células oriundas da medula apresentaram marcação específica para cardiomiócito e

células endotelial. Recentemente, em um estudo realizado em nosso laboratório, a administração de G-CSF duas vezes ao dia, durante 7 dias consecutivos não foi capaz de promover melhora na função cardíaca em modelo de infarto agudo em ratos, apesar da mobilização de células ter sido efetiva (Werneck de Castro e cols., 2006).

Nota-se que os estudos com terapia celular e infarto apresentam grande variabilidade quanto ao modelo de infarto, tipo celular, número de células para o transplante, momento e via de administração das células, análise funcional utilizada e outros parâmetros. Essa variabilidade representa a busca incessante pela terapia ideal e busca dos mecanismos de ação pelos quais as células estariam promovendo benefício da função cardíaca após infarto do miocárdio.

Percebe-se que a terapia celular, em um primeiro momento, foi pensada como alternativa terapêutica no infarto do miocárdio com o objetivo de se repovoar o coração através da transdiferenciação de células-tronco da medula óssea, em células do tecido receptor, seja por transplante ou mobilização induzida por citocinas. Entretanto essa possibilidade parece um tanto improvável, pelo menos para as células-tronco hematopoiéticas, visto que há evidências que a esperada transdiferenciação parece não ocorrer *in vivo* (Wurmser & Gage, 2002; Murry e cols., 2004; Nygren e cols., 2004). Estudos mais elaborados mostraram que as células transplantadas quando fenotipicamente semelhantes às células do tecido receptor apresentaram-se tetraplóides e/ou hexaplóides, o que sugere, por sua vez, que tenha ocorrido fusão entre as células transplantadas e as células do tecido receptor ao invés de transdiferenciação (Terada cols., 2002; Ying e cols., 2002; Alvarez-Dolado e cols., 2003; Nygren e cols., 2004). Em adição, evidências mostram que mesmo o processo de fusão ocorre em baixa frequência (Alvarez-Dolado e cols.,

2003) fato que enfraquece este mecanismo como provável e único responsável pela melhora funcional observada após um transplante celular.

Até o presente momento, os mecanismos pelos quais a terapia celular estaria promovendo melhora da função em corações lesados ainda são controversos, mas três mecanismos gerais são propostos: a) transdiferenciação (Orlic e cols., 2001a; Kawada e cols., 2004), b) fusão celular (Alvarez-Dolado e cols., 2003; Ying e cols., 2002) e c) e um mecanismo parácrino de secreção de fatores (Kinnaird e cols., 2004a,b; Gneocchi e cols., 2005; Uemura e cols., 2006).

Frente à dúvida quanto à contribuição da transdiferenciação e/ou fusão, acredita-se que outros mecanismos, além da incorporação de células-tronco propriamente dita em diferentes tecidos estejam envolvidos na melhora substancial da função após a terapia celular. Estudos recentes têm demonstrado que a angiogênese observada em membros isquêmicos de camundongos está associada à ação parácrina mediada pelas MSC através de citocinas arteriogênicas liberadas no meio condicionado, descartando a incorporação destas células aos vasos como um pré-requisito para o efeito final de melhora na perfusão local (Kinnaird e cols., 2004a,b).

Além da ação angiogênica via mecanismo parácrino, o efeito anti-apoptótico das MSC foi demonstrado em um estudo realizado por Gneocchi e cols. (2005) no qual o sobrenadante condicionado (MC) de MSC, transfectadas para superexpressarem a proteína Akt, foi capaz de reduzir o índice de apoptose em cardiomiócitos isolados submetidos à privação de soro e hipóxia. Ainda neste mesmo estudo, efeito anti-apoptótico e redução do tamanho do infarto foram observados quando o MC obtido em condição de hipóxia foi injetado no coração de ratos submetidos à ligadura permanente da coronária esquerda. O efeito

cardioprotetor via parácrina foi também demonstrado *in vitro* e sugerido *in vivo* por Uemura e cols. (2006). Estes autores demonstraram que a cocultura de células de medula óssea com cardiomiócitos foi capaz de reduzir o índice de apoptose nos cardiomiócitos quando em condição de privação de soro e hipóxia, utilizando um sistema de dois compartimentos divididos por uma membrana (*transwell system*). Um efeito citoprotetor foi também demonstrado pelo nosso laboratório (Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular) em colaboração com o laboratório de Neuroquímica deste mesmo Instituto em um estudo onde o MC das MSC foi capaz de prevenir a morte celular e induzir neuritogênese em neurônios simpáticos de embrião de pinto (dados não publicados). Recentemente, Takahashi e cols. (2006), mostraram que a injeção intramiocárdica seguida de injeção intraperitoneal de MC obtido da população de células mononucleares da medula óssea foi capaz de promover redução do tamanho do infarto e melhora funcional em ratos 28 dias após o tratamento.

Estudos investigando a importância da via parácrina na melhora funcional em corações infartados ainda são escassos. Portanto, o esclarecimento do mecanismo pelo qual as MSC estariam promovendo melhora na função cardíaca é fundamental para otimizar e permitir a evolução da terapia celular no infarto do miocárdio.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral:

- Avaliar se o(s) fator(es) secretado(s) pelas MSC é (são) capaz(es) de promover cardioproteção via efeito anti-apoptótico.

Objetivos específicos:

- avaliar o efeito *in vivo*, utilizando modelo de infarto do miocárdio em ratos, dos fatores liberados pelas MSC em condições de normóxia e hipóxia sobre a função cardíaca e tamanho do infarto.
- Avaliar *in vitro*, utilizando cultura de cardiomiócitos submetidos à hipóxia e privação de soro, se o eventual efeito cardioprotetor observado *in vivo* estaria relacionado a um efeito anti-apoptótico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar singenéticos machos e fêmeas fornecidos pelo biotério local vinculado ao Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada entre 22°C e 24°C e com ciclo claro/escuro de 12 horas. Foram respeitadas as normas recomendadas pelo Guia para uso e cuidado de animais de laboratório (NIH, 1985, USA).

3.2 CULTURA DE CÉLULAS MULTIPOTENTES MESENQUIMAIS ESTROMAIS DE MEDULA ÓSSEA

3.2.1 Isolamento de células

Ratos Wistar singenéticos machos pesando entre 200 e 250 g foram utilizados para extração das células da medula óssea. Previamente ao sacrifício, os animais receberam injeção intraperitoneal de 0,2 mL de heparina sódica (5000 UI/mL) para evitar a formação de coágulos durante o procedimento de extração da medula. Após 20 minutos da administração de heparina, os animais foram anestesiados com éter etílico PA (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e sacrificados por deslocamento cervical. Em seguida, o fêmur e a tíbia foram isolados e as epífises ósseas cortadas para permitir o acesso à cavidade medular. O conteúdo da medula foi retirado com auxílio de uma seringa (gauge 18) preenchida com meio de cultura DMEM sem soro (Life Technologies[®], Grand Island, NY, EUA). O conteúdo medular total foi homogeneizado com auxílio de pipeta Pasteur e centrifugado a 250xg por 10 minutos à temperatura ambiente. Após centrifugação, o sedimento de células foi

ressuspenso em 4 mL de DMEM sem soro e adicionado cuidadosamente sobre 4 mL de Histopaque (densidade 1,083 g/ml, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) de forma que duas fases distintas obtidas por diferença de densidade fossem observadas. Em seguida, este conteúdo foi centrifugado a 400xg por 30 minutos à temperatura ambiente com o objetivo de se obter um anel de células formado por diferença de velocidade de sedimentação e visível na interface Histopaque-meio de cultura. Este anel, contendo as células mononucleares (linfócitos e monócitos) e células-tronco da medula óssea, foi coletado cuidadosamente, ressuspenso em solução salina balanceada (BSS) e centrifugado a 250 g, durante 10 minutos, à temperatura ambiente. Após esta centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e este procedimento repetido mais duas vezes para retirada de resíduos de Histopaque. Após a lavagem com BSS foi feita a contagem em hematocitômetro e avaliação da viabilidade celular através da exclusão do corante Azul de Trypan.

As células foram plaqueadas na densidade de $1,2 \times 10^6$ células/cm² em garrafa de poliestireno de 25 cm² (Falcon[®] 3847, Becton Dickson and Company, Lincoln Park, NJ, EUA) e mantidas em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cutilab[®]), 2mM de L-glutamina (Sigma[®]), 1% de penicilina-streptomicina (Gibco). A cultura permaneceu em condições constantes em estufa a 37°C com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

3.2.2 Expansão das células

Após o plaqueamento, foi aguardado um período de 7 dias para obtenção da população aderente ao frasco de cultura e durante este intervalo foi feita uma troca de meio retornando a população não aderente à cultura. Para isso, a população não aderente foi coletada e centrifugada a 450xg por 10 minutos e em seguida foi

ressuspensa em meio de cultura novo e assim devolvida a garrafa de cultura. Vencido o período de 7 dias após plaqueamento, a população não aderente foi desprezada e 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 hematopoiéticas não aderentes. As células aderentes ao frasco de cultura foram denominadas células multipotentes mesenquimais estromais (MSC) conforme a terminologia sugerida pela ISCT (Horwitz e cols., 2005).

Entre o 12-15^o 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. O procedimento de soltura das células foi evitado quando do uso de pipeta Pasteur uma vez que este procedimento afeta de forma significativa a viabilidade celular, conforme observado em procedimentos anteriores realizados no laboratório. 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 $1,2 \times 10^4$ células/cm² em garrafa de 25 cm² contendo DMEM com 10% de SFB. 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.

3.3 COLETA DO MEIO CONDICIONADO

Após a terceira passagem com tripsina e obtenção do estado de confluência o meio de cultura com soro foi retirado, a cultura foi lavada três vezes com BSS para retirada de resíduos de soro e 15 mL de DMEM sem soro foi adicionado por garrafa de 75cm² para condicionamento por 72 horas à 37°C em condição de normóxia (21% de O₂) ou de hipóxia (1% de O₂) em incubadora de O₂/CO₂ com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após este tempo, o meio condicionado obtido em condição de normóxia (MCN) e hipóxia (MCH) foi coletado, centrifugado a 250xg por 10 minutos e filtrado (0,22 µm) para retenção de debris. Após a coleta do meio condicionado, as células foram tripsinizadas para obtenção do valor médio de células referentes ao condicionamento do meio condicionado e para estudo da viabilidade celular por azul de Trypan. O volume de 15 mL de meio condicionado foi referente ao condicionamento de aproximadamente 10⁶ células. Em seguida, os sobrenadantes condicionados foram aliquotados e mantidos à 2-8 °C enquanto era aguardado o procedimento para concentração do meio condicionado. Este intervalo de tempo não excedeu o período de 5 dias.

3.3.1 Concentração do meio condicionado

Os sobrenadantes condicionados (MCN e MCH) foram concentrados através da técnica de ultrafiltração, utilizando dispositivos de ultrafiltração (centriprep Y-10, Millipore®) compostos por dois recipientes (Fig.1A): a) recipiente externo, onde foi adicionada a amostra (MCN, MCH ou DMEM) e b) o recipiente interno, que é inserido dentro do recipiente externo e que possui em sua extremidade uma membrana de corte de peso molecular de 10 KDa (Fig.1A).

O processo de filtração ocorre devido à pressão hidrostática exercida sobre a membrana desse dispositivo que se torna de maior magnitude quando o dispositivo é submetido à centrifugação (Fig. 1B e 1C). A amostra (15 mL, capacidade máxima do dispositivo) foi colocada no recipiente externo e o dispositivo foi então submetido à centrifugação de 3.000xg. Durante a centrifugação ocorre a passagem, através da membrana, das moléculas abaixo de 10KDa, do recipiente externo para o interno até que a pressão hidrostática entre os dois compartimentos se iguale (Fig. 1D). Quando o equilíbrio de pressão entre os recipientes é atingido, a filtração é interrompida . O volume retido (moléculas acima de 10KDa) é mantido no recipiente externo e o filtrado contido no recipiente interno (moléculas < 10KDa) é coletado estabelecendo-se assim um novo desequilíbrio hidrostático (Fig.1D). O dispositivo é então submetido novamente à centrifugação até que se alcance o nível de concentração desejado. O MC utilizado nos experimentos *in vitro* e *in vivo* foram concentrados em 25 vezes (capacidade máxima de concentração do dispositivo de ultrafiltração) e diluições, quando necessárias, foram feitas a partir da solução concentrada. Para tanto, os sobrenadantes condicionados (MCN e MCH) e não condicionadas (controle, DMEM sem soro) foram submetidos a três centrifugações sucessivas de 3.000xg:

- a) Primeira centrifugação (duração de 60 minutos): neste primeiro procedimento as moléculas acima de 10KDa inicialmente contidas em 15 mL ficam retidas no volume final de 3 mL.
- b) Segunda centrifugação (duração de 30 minutos): neste segundo procedimento as moléculas acima de 10KDa contidas em 3 mL ficam retidas no volume final de 0,9 mL.
- c) Terceira centrifugação (duração de 20 minutos): neste terceiro procedimento as moléculas acima de 10KDa contidas em 0,9 mL ficam retidas no volume final de 0,6 mL.

Portanto, após as centrifugações sucessivas o MC foi concentrado em aproximadamente 25 vezes (concentração de 15ml para 0,6ml). Após o procedimento de concentração, o MC foi filtrado em membrana de 0,22 μm acoplada a um dispositivo próprio para filtração de pequenos volumes (microspin, corning®) e mantido a -70°C até o momento dos experimentos.

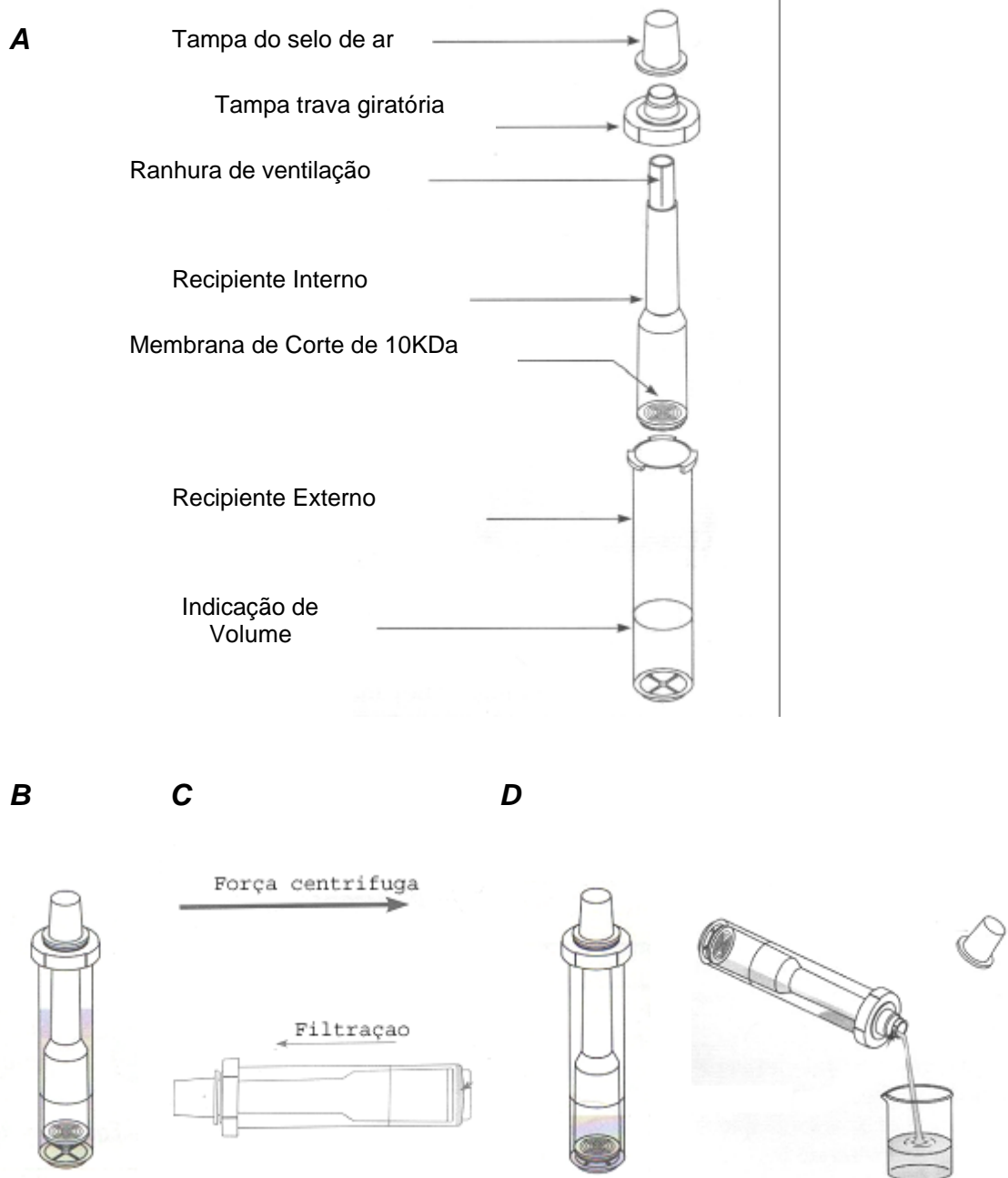


FIGURA 1 – Dispositivo de Ultrafiltração Centriprep.

A: Figura esquemática do dispositivo de ultrafiltração centriprep (millipore®) e seus componentes. **B:** Dispositivo contendo a amostra no recipiente externo antes da centrifugação. **C:** Sentido da força centrífuga gerada pela centrifugação a 3000g e da filtração que ocorre no sentido oposto. **D:** Dispositivo representando o equilíbrio de pressão hidrostática entre o recipiente externo e interno. Neste momento a filtração efetiva deixa de ocorrer e a centrifugação é interrompida. O conteúdo do recipiente interno (<10KDa) é coletado e o dispositivo pode ser submetido à outra centrifugação para concentração adicional da amostra contida no recipiente externo (> 10KDa). Figura retirada do manual de instrução, Millipore®.

3.3.2 Avaliação da viabilidade celular após coleta do meio condicionado

Após coleta do meio condicionado nas condições de normóxia e hipóxia, algumas garrafas representativas de cada condição foram tripsinizadas e a viabilidade celular testada com Azul de Trypan. O mesmo procedimento foi feito com células submetidas ao condicionamento com soro por 72 horas em normóxia com o objetivo de se avaliar o grau de comprometimento das células na condição de privação de soro e na condição de privação de soro associada a hipóxia.

3.4 ESTUDO IN VIVO DO EFEITO DO MEIO CONDICIONADO

O estudo *in vivo* do efeito do meio condicionado foi realizado em modelo de infarto do miocárdio em ratos Wistar machos.

3.4.1 Indução do Infarto

O modelo de infarto experimental utilizado foi aquele descrito por Johns & Olson (1954) e Maclean (1976). O procedimento cirúrgico foi feito sob anestesia com halotano PA (MERCK). Uma incisão de aproximadamente 2 cm foi feita no lado esquerdo do tórax a 1 centímetro da linha esternal média. Em seguida, os músculos peitoral maior e menor foram dissecados para visualização do gradil costal esquerdo. Com auxílio de uma pinça hemostática foi feita uma incisão entre o quarto ou quinto espaço intercostal esquerdo para exteriorização do coração através de uma suave compressão manual sobre o tórax do animal.

Após a localização da artéria coronária esquerda (geralmente localizada sob a aurícula esquerda) foi feita a ligação permanente do vaso com fio de seda 2-0, próximo à origem na aorta. Em seguida o coração foi reposicionado e o tórax

fechado. Este procedimento foi realizado rapidamente e o animal foi ventilado manualmente com ambú de confecção artesanal.

Em relação ao grupo controle falso operado (FO), o procedimento foi semelhante com exceção da ligadura da artéria coronária. Neste caso, o fio de sutura foi apenas passado pelo músculo cardíaco sem promover a oclusão da artéria coronária.

Após a cirurgia, os animais ficaram em observação e após as avaliações funcionais para verificação do infarto foram conduzidos ao biotério local onde permaneceram em ciclo claro-escuro de 12 horas com livre acesso à água e ração até o final do protocolo experimental.

3.4.2 Protocolos e grupos experimentais

Os animais foram divididos nos protocolos experimentais a seguir:

Protocolo Experimental I

O protocolo experimental I foi iniciado com a indução do infarto ou cirurgia fictícia. Após este primeiro procedimento cirúrgico, foi aguardado um período de 3 a 5 horas para aquisição das medidas funcionais pré-tratamento através de ecocardiograma (ECO) e eletrocardiograma (ECG). Uma vez constatado o infarto, os animais receberam aleatoriamente a injeção intramiocárdica (100 µL) de:

DMEM-I (n=4): meio de cultura sem soro não condicionado;

MCN (n=9): meio condicionado não concentrado obtido em normóxia;

MCN-C (n=6): meio condicionado concentrado 25 vezes obtido em normóxia.

A injeção intramiocárdica foi feita exteriorizando-se o coração conforme o procedimento descrito para indução do infarto. Este procedimento consistiu de uma

única injeção na região peri-infarto, a qual foi localizada visualmente por apresentar-se hipo ou acinética. A injeção foi feita lentamente de modo a garantir que todo o conteúdo da amostra fosse acomodado no tecido cardíaco. Após a injeção, o coração foi reposicionado no tórax. Os animais foram mantidos em observação e em seguida, conduzidos ao biotério onde foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas com livre acesso à água e ração.

Após 19 a 21 dias da indução do infarto e administração intramiocárdica, os animais foram submetidos a uma nova análise funcional por ECG, ECO, teste de esforço em esteira e cateterização do ventrículo esquerdo. Após a avaliação funcional no final dos 21 dias de protocolo, os animais foram anestesiados com éter e sacrificados por deslocamento cervical e os corações retirados para análise histológica.

Protocolo Experimental II

De forma similar ao primeiro protocolo descrito, o protocolo experimental II foi iniciado com a indução do infarto ou cirurgia fictícia e 3 a 5 horas após o infarto os animais foram avaliados funcionalmente para aquisição das medidas pré-tratamento através de ecocardiograma (ECO) e eletrocardiograma (ECG). Procurando-se otimizar o protocolo *in vivo*, a administração intramiocárdica de MCH foi feita utilizando-se o MC já em sua maior concentração. A administração intramiocárdica (100 μ L) foi feita de forma aleatória utilizando-se:

DMEM-II (n=13): meio de cultura sem soro não condicionado;

MCH-C (n=15): meio condicionado concentrado 25 vezes obtido em hipóxia.

A análise funcional pós-tratamento obedeceu àquele mesmo intervalo de tempo adotado no Protocolo Experimental I. Após 19 a 21 dias da indução do infarto e administração intramiocárdica, os animais foram submetidos a uma nova análise funcional por ECG, ECO, teste de esforço em esteira e cateterização do ventrículo esquerdo. Após a avaliação funcional, os corações foram retirados para análise histológica.

A análise estatística incluiu o grupo MCN-C do primeiro protocolo experimental com o objetivo de avaliar se a melhora funcional poderia ser atribuída ao fato do condicionamento das MSC ter sido realizado em condições de hipóxia.

Protocolo Experimental III

O protocolo experimental III foi iniciado com a indução do infarto conforme descrito anteriormente. Após 4 semanas da indução do infarto, os animais foram submetidos às medidas funcionais pré-tratamento através de ECO e ECG. Em seguida, os animais receberam aleatoriamente a injeção intramiocárdica (100 μ L) de:

DMEM (n=3): meio de cultura sem soro não condicionado;

MCH-C (n=6): meio condicionado concentrado 25 vezes obtido em hipóxia.

Similarmente aos protocolos I e II, a injeção intramiocárdica foi feita exteriorizando-se o coração conforme o procedimento descrito para indução do infarto e uma única injeção foi feita na região ao redor da cicatriz, facilmente visualizada pela coloração esbranquiçada e acinesia. Após a injeção, o coração foi reposicionado no tórax. Os animais foram mantidos em observação e em seguida

conduzidos ao biotério onde foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas com livre acesso à água e ração.

Após 2 semanas da administração intramiocárdica, ou seja 6 semanas após a indução do infarto, os animais foram submetidos a uma nova análise funcional por ECG, ECO, teste de esforço em esteira e cateterização do ventrículo esquerdo. Após a avaliação funcional no final das 6 semanas de protocolo, os animais foram anestesiados com éter e sacrificados por deslocamento cervical e os corações retirados para análise histológica.

3.4.3 Análises Funcionais

Estudo eletrocardiográfico

O ECG foi realizado sob efeito dos anestésicos Ketamina (50mg/mL/Kg de peso corporal) e Xilazina (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 de amplitude do complexo QRS (iQRS): a soma em módulo do complexo QRS, em voltagem, nas derivações D1, D2 e D3.

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

Estudo ecocardiográfico

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.

O parâmetro analisado referente à função cardíaca foi fração de encurtamento de área (FEA, %) obtida no modo bidimensional utilizando os valores de área em diástole (AD) e área em sístole (AS) obedecendo a seguinte relação:

$$FEA = \frac{(AD - AS)}{AD} \times 100$$

As imagens no bidimensional foram obtidas na altura dos músculos papilares para padronização das medidas.

Teste de Esforço em Esteira

O teste de esforço foi realizado em esteira, apropriada para pequenos animais, com inclinação fixa de 10° e grade de estimulação elétrica localizada ao final da pista de rolamento. O protocolo utilizado consiste em uma adaptação do teste de rampa (Henderson e col., 2002). Primeiramente, os animais foram

adaptados a correr na esteira por 5 minutos a uma velocidade de 17 cm/s por um período de 3 a 5 dias. Após este período de adaptação, cada animal foi submetido ao protocolo para teste da capacidade máxima ao exercício. O teste foi iniciado com velocidade de 17 cm/s e prosseguiu com incrementos de 2 cm/s a cada 2 minutos. O protocolo foi finalizado uma vez que o nível de exaustão por parte do animal fosse atingido. O critério de exaustão consistiu em alteração no padrão de corrida e permanência do animal sobre a grade de estimulação elétrica mesmo com aumento na intensidade dos choques.

Cateterização do ventrículo esquerdo

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. A cânula foi confeccionada com polietileno PE-50 (diâmetro interno 0,58mm e externo 0,965, 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 no dia seguinte com os animais acordados.

Após 24 horas da cirurgia de cateterização e depois de espera de um período de 30 minutos de adaptação do animal ao ambiente da sala, foi feito o registro da

pressão ventricular nos animais não anestesiados. A cânula dos animais foi previamente lavada com aproximadamente 200 μ 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, ADInstruments) 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.

3.4.4 Análise histológica e obtenção do tamanho do infarto

Ao final do protocolo experimental, os animais foram heparinizados (1000 UI/rato), anestesiados com éter e sacrificados por deslocamento cervical. Os corações foram removidos rapidamente através de toracotomia e canulados pela artéria aorta, de modo que a ponta da cânula de perfusão permaneceu distal à válvula aórtica, permitindo assim o fluxo da solução pelos óstios coronarianos. A solução de perfusão utilizada foi a solução de Tyrode modificada (pH 7.4): NaCl 126 mM; dextrose 10 mM, NaH₂PO₄ 0,33 mM, KCL 5,4 mM, MgCl₂ 0,8 mM, HEPES 10 mM, CaCl₂ 2 mM. O fluxo de 10 mL/min foi mantido constante através de uma bomba peristáltica. Após 3 a 5 minutos de perfusão com a solução de Tyrode, o coração foi parado em diástole através da perfusão de solução de Tyrode enriquecida em KCl (30mM). Após completa parada em diástole, o coração foi removido da montagem e transferido para recipiente contendo aproximadamente 40 mL de solução de paraformaldeído 4% em PBS (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. 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). 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 µm.

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 Hematoxilina-Eosina foi realizada para visualização geral do tecido e 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*. 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 definida 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.

3.5 ESTUDO IN VITRO DO EFEITO DO MEIO CONDICIONADO

O estudo *in vitro* do efeito do MC foi realizado em cultura de cardiomiócitos de ratos.

3.5.1 Cultura de cardiomiócitos

A cultura de cardiomiócitos neonatos foi feita seguindo a metodologia descrita por Suadicaní e cols. (2000). Foram utilizados ratos Wistar neonatos com 1-2 dias de nascimento. Os animais foram rapidamente sacrificados e os corações removidos e colocados em placa de petri contendo PBS gelado. Durante a remoção do coração, o corte foi feito de modo a retirar somente os ventrículos. Foi utilizada, por experimento, uma média de 3 corações. Em seguida, os corações foram transferidos para outra placa de petri com solução de dissociação (NaCl 136,7 mM; KCl 2,68 mM; Na₂HPO₄ 0,352 mM; NaHCO₃ 11,9 mM; Dextrose 11 mM) contendo pancreatina 1,25 mg/mL e BSA 3mg/mL. Os corações foram cortados em pequenos pedaços com auxílio de tesoura e pinça e transferidos para um frasco contendo uma barra magnética e 5 mL de solução de dissociação. O conteúdo foi mantido por 5 minutos a 37°C em banho-maria posicionado sobre uma placa de aquecimento e agitação magnética. Após os 5 minutos de digestão, o conteúdo digerido foi transferido para um tubo de 15 mL e a ação enzimática foi bloqueada adicionando-se 5 mL de DMEM com 10% SFB. Em seguida, o conteúdo dissociado foi centrifugado a 400xg por 5 minutos. Ao final de cada centrifugação o precipitado foi ressuspense em aproximadamente 1 mL de DMEM com 10% SFB e mantido em estufa a 37°C. A porção não digerida remanescente no frasco foi submetida a um novo ciclo de 5 minutos de digestão. Este procedimento foi repetido por 6 a 7 vezes. O conteúdo resultante da primeira digestão foi desprezado com o objetivo de reduzir o número de fibroblastos na cultura. Ao término da dissociação, as células foram submetidas a dois pré-plaqueamentos de 1 hora cada em garrafa de 75 cm² (TTP ®) gelatinizada e mantidas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Visto que os

fibroblastos aderem mais rapidamente ao frasco de cultura, o pré-plaqueamento tem por objetivo reduzir a presença deste tipo celular na cultura de cardiomiócitos.

Após o pré-plaqueamento, os cardiomiócitos não aderentes foram coletados, submetidos à centrifugação por 5 min a 400xg e ressuspensos em volume conhecido de DMEM com soro para contagem e avaliação da viabilidade. As células foram plaqueadas em placa de 24 poços preenchidas com lamínula de superfície tratada com gelatina na densidade de $1,5 \times 10^5$ células/poço e mantidas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após 24 horas de plaqueamento a cultura foi lavada com BSS para remoção de fragmentos celulares e células não aderentes e novo meio de cultura DMEM com 10% de SFB foi adicionado. As condições experimentais foram estabelecidas 48 a 72 horas após o plaqueamento.

3.5.2 Quantificação da apoptose em cardiomiócitos de ratos neonatos

Marcação por brometo de etídeo e quantificação por citometria de fluxo

A quantificação da apoptose foi feita utilizando-se a técnica de marcação de DNA com brometo de etídeo (EtBr) para avaliação do percentual da população hipodiploide por citometria de fluxo (FACS). Nesta técnica, a membrana celular perde a integridade visto que as células são permeabilizadas com 0,1% de Triton x-100 em tampão citrato 0,1%. A permeabilização das células associada ao efeito do tampão citrato permite que fragmentos nucleares de células apoptóticas sejam extraídos do meio intracelular enquanto células com DNA íntegro e não fragmentado carregam o conteúdo nuclear diplóide. A perda da integridade da membrana celular irá permitir que o EtBr atravesse a membrana celular de todas as células (viáveis e apoptóticas), intercalando-se de forma inespecífica e estequiometricamente ao DNA íntegro bem, como aos fragmentos de DNA de maior peso molecular ainda

remanescentes. Dessa forma, a intensidade de fluorescência será proporcional a quantidade de EtBr intercalado ao DNA que por sua vez é proporcional ao número de sítios disponíveis na molécula de DNA. Sendo assim, células contendo fragmentos de DNA irão apresentar menor número de sítios de ligação para o EtBr e portanto irão emitir menor intensidade de fluorescência que o DNA íntegro. Através de histograma de intensidade de fluorescência é possível discriminar a população hipodiploide que precede o pico $2n$ (Fig. 2B) por apresentar menor intensidade de fluorescência (Gong e cols., 1994).

Indução de morte e condições experimentais

O modelo de indução de morte utilizado neste protocolo experimental consistiu em privar os cardiomiócitos de soro por 24 horas. O efeito cardioprotetor do MC, obtido em condições de normóxia (MCN), foi testado mantendo-se os cardiomiócitos em regime de privação de soro mas na presença de duas diferentes diluições do MCN. As condições experimentais avaliadas foram:

- a) SORO + (controle): células em presença de DMEM com 10% de SFB.
- b) SORO - (modelo de indução de apoptose): células em presença de DMEM sem soro.
- c) MCN-d: células em presença de MC, obtido em condição de normóxia, não concentrado e diluído em DMEM sem soro na proporção 1:1 (v/v).
- d) MCN-c: células em presença de MC, obtido em condição de normóxia, concentrado 5 vezes e diluído em DMEM sem soro na proporção 1:1 (v/v).

Após 24 horas nas condições experimentais, a cultura de cardiomiócitos foi lavada com solução livre de cálcio e magnésio e em seguida cada condição experimental foi individualmente tripsinizada com tripsina 0,25% por 3 minutos. Em seguida a tripsina foi inativada com DMEM gelado com soro e as células em suspensão foram centrifugadas a 250xg. O meio DMEM com soro foi desprezado e o sedimento de células referente a cada condição experimental foi ressuspensão e mantido por 40 minutos em 500 μ L de tampão de permeabilização contendo 0,1% de Triton x-100 em solução de citrato de sódio 0,1% e RNase A (50 μ g/mL). Após permeabilização e aproximadamente 10 minutos antes da passagem pelo citômetro de fluxo, o EtBr foi adicionado à cada condição de forma que a concentração final deste marcador fosse de 50 μ g/mL. A marcação por EtBr foi realizada à baixa temperatura em ausência de luz. Após este intervalo de tempo, o conteúdo de cada condição experimental foi transferido separadamente para tubos apropriados para citômetro. A aquisição de eventos referentes a cada condição experimental (5.000 eventos) foi feita em baixa velocidade. Após a aquisição a análise foi feita visualizando os eventos em um gráfico que relaciona intensidade do sinal de fluorescência (FL3-Height) com área sob a curva do sinal de intensidade de fluorescência (FL3-Area). Eventos referentes ao DNA íntegro irão apresentar uma intensidade de fluorescência "x" com respectiva área sob a curva do sinal de fluorescência denominada " a_x ". Eventos, por sua vez, referentes à DNA duplicado (4n) irão apresentar intensidade de fluorescência duas vezes maior que um evento diplóide e, portanto, uma intensidade de fluorescência "2.x" e área sob a curva do sinal de fluorescência também duplicada ($2.a_x$). Já eventos relacionados a células apoptóticas contendo fragmentos de DNA (< 2n) irão apresentar intensidade do sinal de fluorescência menor que "x" e uma área sob a curva do sinal de intensidade

menor que “ a_x ”. Foram delimitadas duas regiões no gráfico FL3-Height x FL3-Area. A primeira região (R1) de análise teve por objetivo excluir intensidades de fluorescência de baixa magnitude, considerada marcação de debris (Fig. 2A). A segunda região (R2) compreendeu a população apoptótica, 2n e 4n, do qual foi feito o histograma de intensidade de fluorescência (Fig 2B). O intervalo M1 é a ferramenta de análise que irá fornecer o percentual dos eventos apoptóticos (Fig. 2B). As diferentes condições experimentais foram analisadas aplicando-se as mesmas delimitações das regiões R1 e R2.

Método de marcação por Anexina-V e iodeto de propídeo e quantificação por citometria de fluxo

A quantificação da apoptose foi feita utilizando a técnica de marcação com Anexina-V e iodeto de propídeo e leitura em citômetro de fluxo (BDFACSaria).

Modelo de indução de apoptose e condições experimentais

A indução de apoptose, adotada nesta metodologia, consistiu na privação de soro associada à hipoxia realizada em incubadora de O₂/CO₂ com atmosfera úmida contendo 1% de O₂ e 5% de CO₂ por um período de 24 horas. O objetivo do experimento foi avaliar se o MC, em diferentes concentrações e obtido em condição de normóxia (MCN) e hipóxia (MCH), era capaz de alterar o percentual de células em apoptose precoce e tardia. Os cardiomiócitos permaneceram por 24 horas nas seguintes condições experimentais:

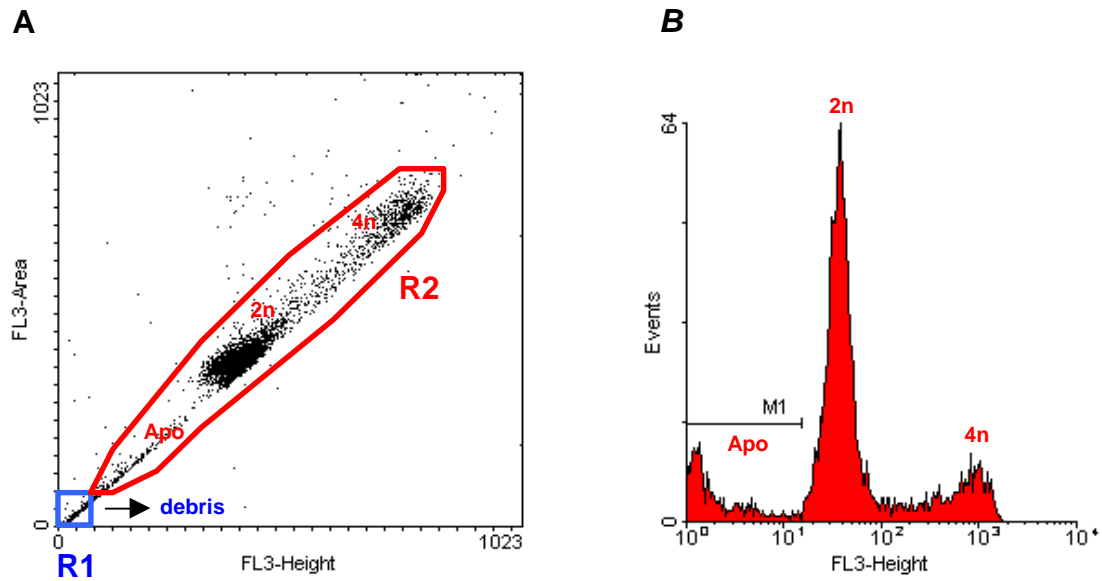


FIGURA 2 – Análise por citometria de fluxo de conteúdo de DNA marcado com EtBr. **A:** Gráfico de FL3-Area (área sob a curva do sinal de fluorescência) x FL3-Height (intensidade do sinal de fluorescência) com indicação das regiões R1 (debris) e R2 (população apoptótica:Apo; diplóide: 2n; tetraplóide: 4n). **B:** Histograma de intensidade de marcação com EtBr obtido a partir de R2. M1 representa o intervalo que contém a população em apoptose (%).

- a) Normóxia com soro (controle, H-/S+): células em presença de DMEM com 10% de SFB;
- b) Hipóxia sem soro (modelo de morte, H+/S-): células em presença de DMEM sem soro submetido ao procedimento de ultrafiltração;
- c) MCN1X: células em presença de MC, obtido em condição de normóxia, diluído a partir da solução concentrada em 25 vezes para a diluição de uma vez utilizando meio DMEM sem soro;
- d) MCN5X: células em presença de MC, obtido em condição de normóxia, diluído a partir da solução concentrada em 25 vezes para a diluição de 5 vezes concentrado utilizando meio DMEM sem soro;
- e) MCN25X: células em presença de MC, obtido em condição de normóxia, concentrado em 25 vezes;
- f) MCH1X: células em presença de MC, obtido em condição de hipóxia, diluído a partir da solução concentrada em 25 vezes para a diluição de uma vez utilizando meio DMEM sem soro;
- g) MCH5X: células em presença de MC, obtido em condição de hipóxia, diluído a partir da solução concentrada em 25 vezes para a diluição de 5 vezes concentrado utilizando meio DMEM sem soro;
- h) MCH25X: células em presença de MC, obtido em condição de normóxia, concentrado em 25 vezes;

Marcação com Anexina-V e PI e quantificação da apoptose por citômetro de fluxo

Após 24 horas nas condições experimentais, o sobrenadante de cada condição experimental foi cuidadosamente removido e reservado em tubo falcon designado para a coleta. A cultura de cardiomiócitos foi lavada 3 vezes com 1 mL de

solução livre de cálcio e magnésio e esse volume foi coletado e somado ao sobrenadante previamente coletado de forma que toda a população celular referente a cada condição experimental fosse coletada. Em seguida, as células foram individualmente removidas da placa de cultura por meio da adição de 0,5 mL por poço de tripsina 0,25% a 37°C por exatamente 3 minutos. Em seguida a tripsina foi inativada adicionando-se ao poço da placa 1 ml de DMEM com soro. O conteúdo foi cuidadosamente removido e um volume adicional de 1 mL foi adicionado e rinsado uma única vez sobre o poço da cultura e novamente o conteúdo foi cuidadosamente removido e adicionado ao tubo de coleta. A verificação da soltura das células foi realizada em microscópio óptico. Em seguida o conteúdo removido da placa de cultura foi centrifugado a 250xg por 5 minutos e o sedimento de células foi ressuspensão em 0,5 mL de solução tampão de ligação (HEPES 10mM; NaCl 0,14M; CaCl₂ 2,5mM) enriquecido com dextrose 11mM. O procedimento para soltura das células da placa de cultura foi feito simultaneamente em no máximo 3 poços por vez, para evitar grande tempo de intervalo entre este procedimento e a passagem da amostra pelo citômetro de fluxo. Imediatamente após ressuspensão das células em tampão de ligação um volume de 2,5 µL de anexina-V-FITC (concentração final: 0,25 µg/mL) e 5,0 µL de PI (concentração final de 5 µg/mL) foram adicionados aos 0,5 mL de suspensão de células e um período de 10 minutos foi aguardado para passagem das células pelo citômetro de fluxo. O tampão de ligação, a anexina-V-FITC e o PI foram utilizados de um kit de detecção de apoptose (Anexina-V-FITC apoptosis detection Kit, Sigma®). Após este intervalo de tempo, o conteúdo de cada condição experimental foi transferido separadamente para tubos apropriados para citômetro. A análise foi feita em baixa velocidade e 20.000 eventos foram adquiridos para cada condição experimental.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como média \pm EPM. Para análise entre dois grupos independentes foi utilizado teste t de Student não pareado. Análise entre 3 ou mais grupos, onde apenas um fator foi estudado como fonte de variação entre os grupos, foi feita através da análise de variância de uma via (ANOVA ONE-WAY) seguido de pós-teste de Boferroni (estudos *in vivo*) ou Dunnett (estudos *in vitro*). Análise entre 3 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). As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 CULTURA DE MSC

A figura 3 mostra fotos de campos representativos da cultura de MSC após diversas passagens com tripsina. A cultura atingiu 90% da confluência dentro de 12 a 14 dias após o plaqueamento das células (Fig. 3A). Nota-se que neste estágio a cultura apresenta uma população de células aderentes ao frasco de cultura, morfologicamente semelhantes a fibroblastos, e uma outra população de células redondas não aderentes ao frasco de cultura, mas com capacidade de aderir à camada subjacente de MSC. Estas células são possivelmente resquílios de células hematopoiéticas não aderentes que tendem a diminuir com as passagens com tripsina. As figuras 3B a 3D mostram campos representativos de MSC uma semana após a primeira, segunda e terceira passagens com tripsina, respectivamente.

4.2 VIABILIDADE DAS MSC APÓS 72 HORAS DE PRIVAÇÃO DE SORO

Uma vez atingido o estado de confluência após a terceira passagem com tripsina, as células foram submetidas à 72 horas de privação de soro em condição de normóxia e o sobrenadante condicionado (MCN) foi coletado. A figura 3 mostra o aspecto da cultura de terceira passagem imediatamente antes da privação de soro (Fig. 4A) e 24, 48 e 72 horas na condição sem soro (Fig.4B-D, respectivamente). Após 24 horas de privação de soro (Fig. 4B), já é possível observar alteração da morfologia celular com presença de células com retração citoplasmática (setas amarelas).

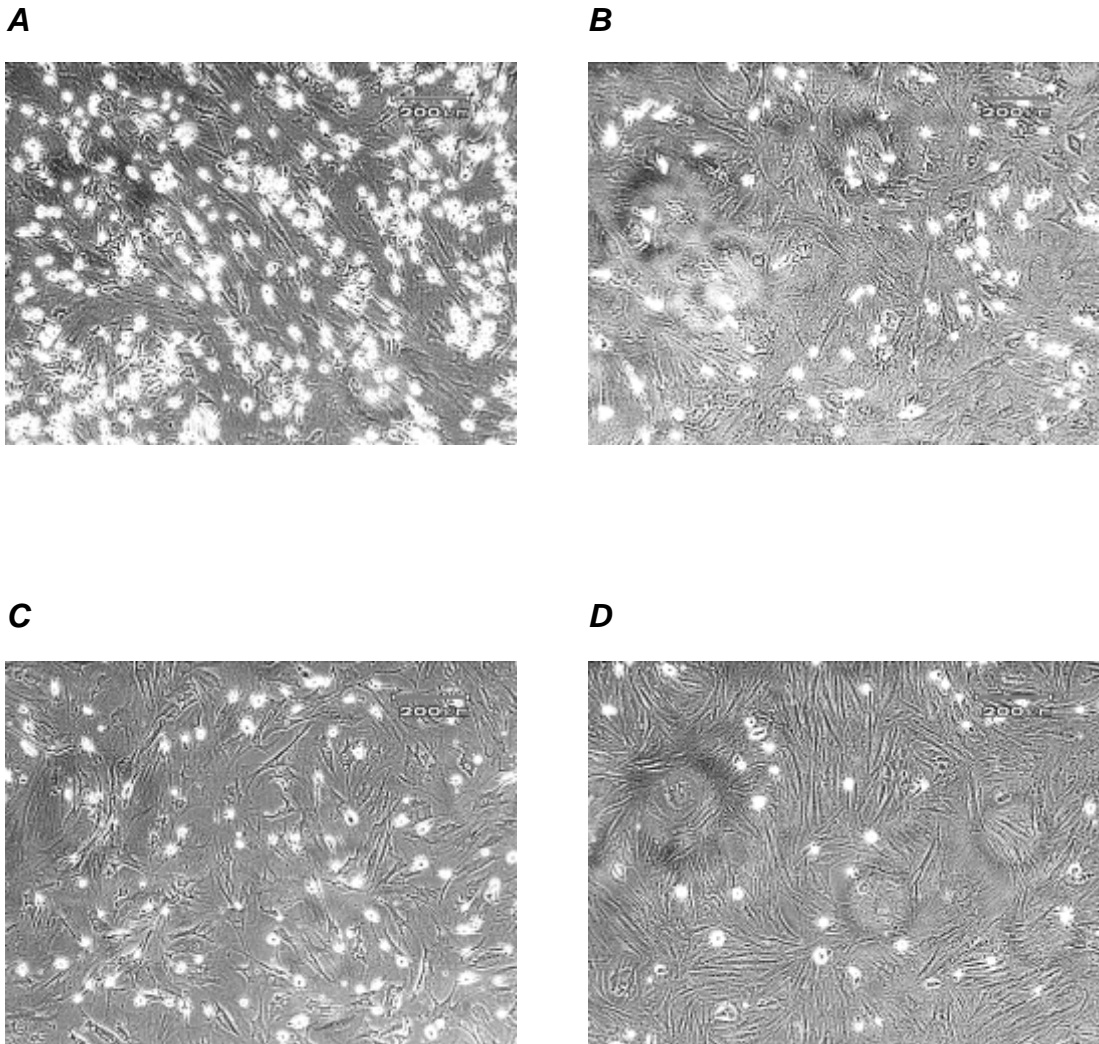


FIGURA 3 – Cultura de células multipotentes mesenquimais estromais de medula óssea. **A**: 12-14 dias após o plaqueamento; **B**, **C** e **D**: após primeira, segunda e terceira passagem com tripsina, respectivamente. Fotos com aumento de 100X.

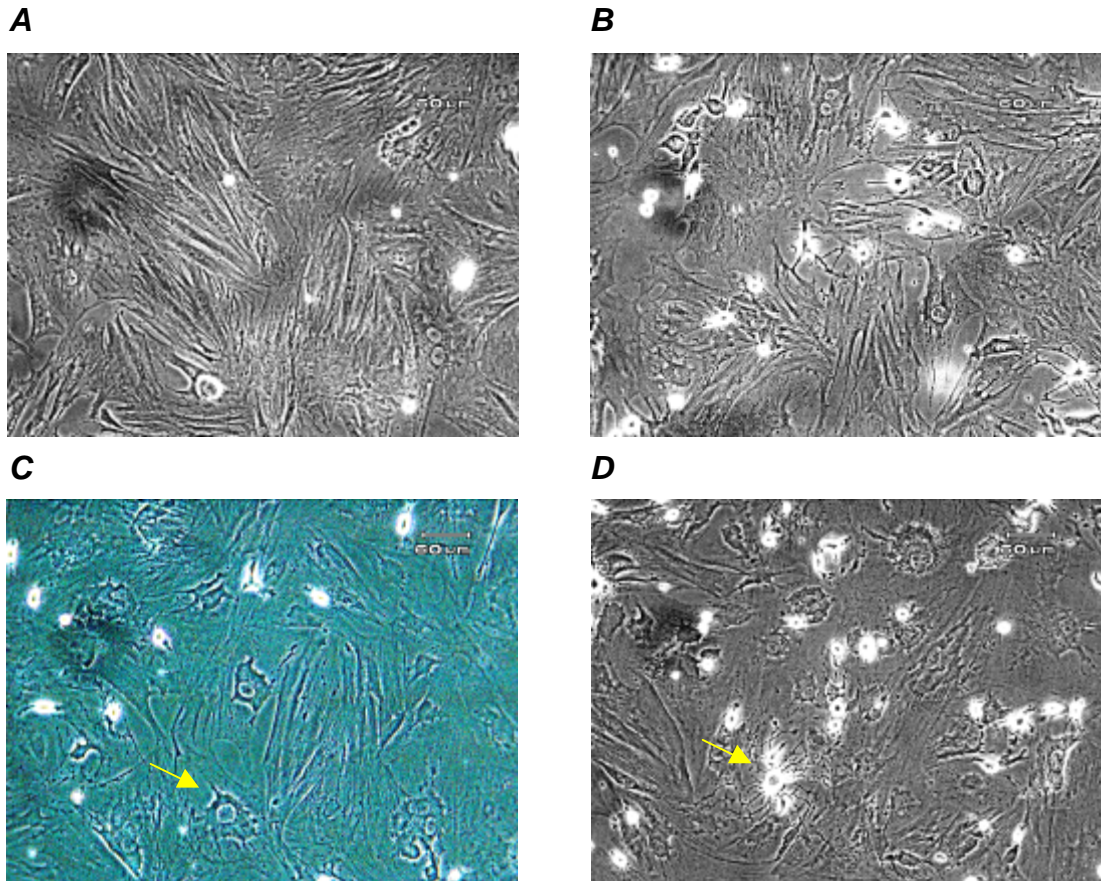


FIGURA 4 – Cultura de células multipotentes mesenquimais estromais de rato (MSC) após privação de soro. **A**: MSC uma semana após a terceira passagem com tripsina já no estado de confluência em meio DMEM com 10% de SFB. **B**, **C** e **D**: MSC de terceira passagem com 24, 48 e 72 horas de privação de soro em normóxia, respectivamente. Setas indicam células com retração citoplasmática.

Células com retração de citoplasma também foram observadas em 48 e 72 horas de privação de soro. A presença destas células foi constatada em todos os frascos de cultura do estudo. Sabe-se que a retração citoplasmática pode indicar processo de morte celular por apoptose. Logo, foi de interesse do presente estudo avaliar a viabilidade das células após 72 horas de privação de soro, período este utilizado para condicionamento do meio obtido em normóxia. Após as 72 horas na condição sem soro, as células referentes a um número de cinco garrafas representativas de cada condição experimental foram tripsinizadas e a viabilidade avaliada pela exclusão do corante azul de Trypan. Observou-se que (Fig. 4A), apesar da morfologia celular sugerir processo de morte celular programada, a viabilidade celular após privação de soro ($88,7 \pm 2,5\%$) não foi diferente da viabilidade calculada em um grupo de células submetidas a 72 horas de condicionamento com soro ($90,4 \pm 1,6\%$). Para confirmar a viabilidade, as células que foram submetidas à privação de soro por 72 horas, bem como as células que permaneceram com soro foram replaqueadas (ambas com soro), para monitorização por microscopia óptica da viabilidade e evolução das células. As Figuras 4B e 4C mostram o aspecto da cultura após 72 horas do replaqueamento das células previamente cultivadas com soro e sem soro, respectivamente. As células previamente privadas de soro retomaram a morfologia padrão semelhante a fibroblastos e proliferaram alcançando confluência de aproximadamente 70% após 72 horas do replaqueamento (Fig. 4C), característica semelhante ao observado para as células não privadas do soro (Fig. 4B). Logo, a privação de soro por 72 horas não alterou a viabilidade das MSC quando comparado à condição com soro.

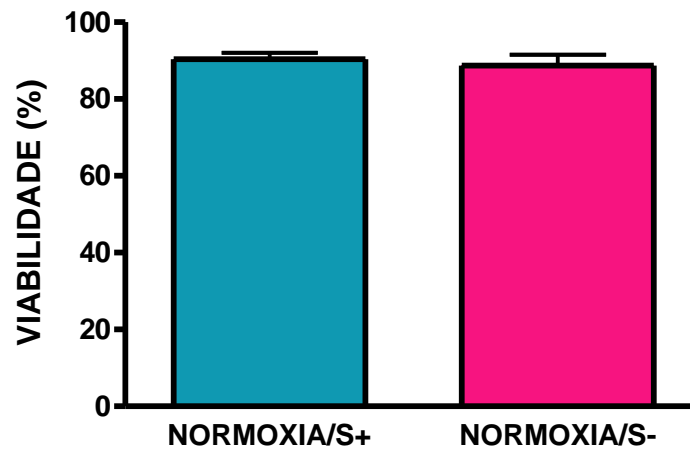
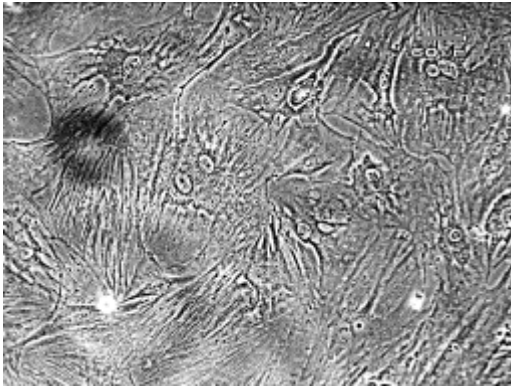
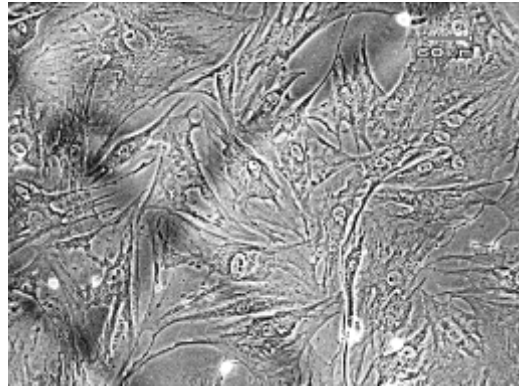
A**B****C**

FIGURA 5 – Viabilidade das MSC após privação de soro pela exclusão do corante azul de Trypan.

A: 72 horas em regime com 10% de SFB (NORMÓXIA/S +) ou sem soro (NORMÓXIA/S -) em condição de normóxia. Após teste de viabilidade as células que permaneceram previamente em condição com soro (**B**) e sem soro (**C**) foram replaqueadas em DMEM com 10% de SFB para confirmação da viabilidade pelo aspecto e evolução das células em cultura. B e C são fotos representativas (aumento de 200x) tiradas após 72 horas do replaqueamento pós-viabilidade já na condição com soro.

Após 72 horas de condicionamento o MC foi coletado, centrifugado, filtrado, concentrado quando necessário e mantido a -70°C até o momento dos experimentos.

4.3 VIABILIDADE DAS MSC APÓS 72 HORAS DE PRIVAÇÃO DE SORO E HIPÓXIA

A figura 6 mostra fotos de campos representativos de uma cultura de MSC de terceira passagem já em estado de confluência previamente à privação de soro e hipóxia de 1% (Fig. 6A) e 72 horas após esta condição (Fig. 6B). É possível observar que, similar ao observado na condição de privação de soro, as células submetidas à hipóxia e privação de soro apresentam características morfológicas sugestivas de processo de morte celular tais como aumento de granulosidade e retração citoplasmática (setas amarelas). Entretanto, a viabilidade celular (hipóxia sem soro: $93,57 \pm 1,12\%$; normoxia com soro: $90,4 \pm 1,6\%$, $p > 0,05$), quando avaliada pela capacidade de exclusão do corante Azul de Trypan, não foi diferente entre as duas condições experimentais (Fig.6 C).

A relação entre o número de células por volume de meio condicionado foi de aproximadamente 6×10^4 células para cada mL de meio condicionado e este valor foi obtido após tripsinização e contagem das células, não sendo diferente entre as condições de normóxia e hipóxia.

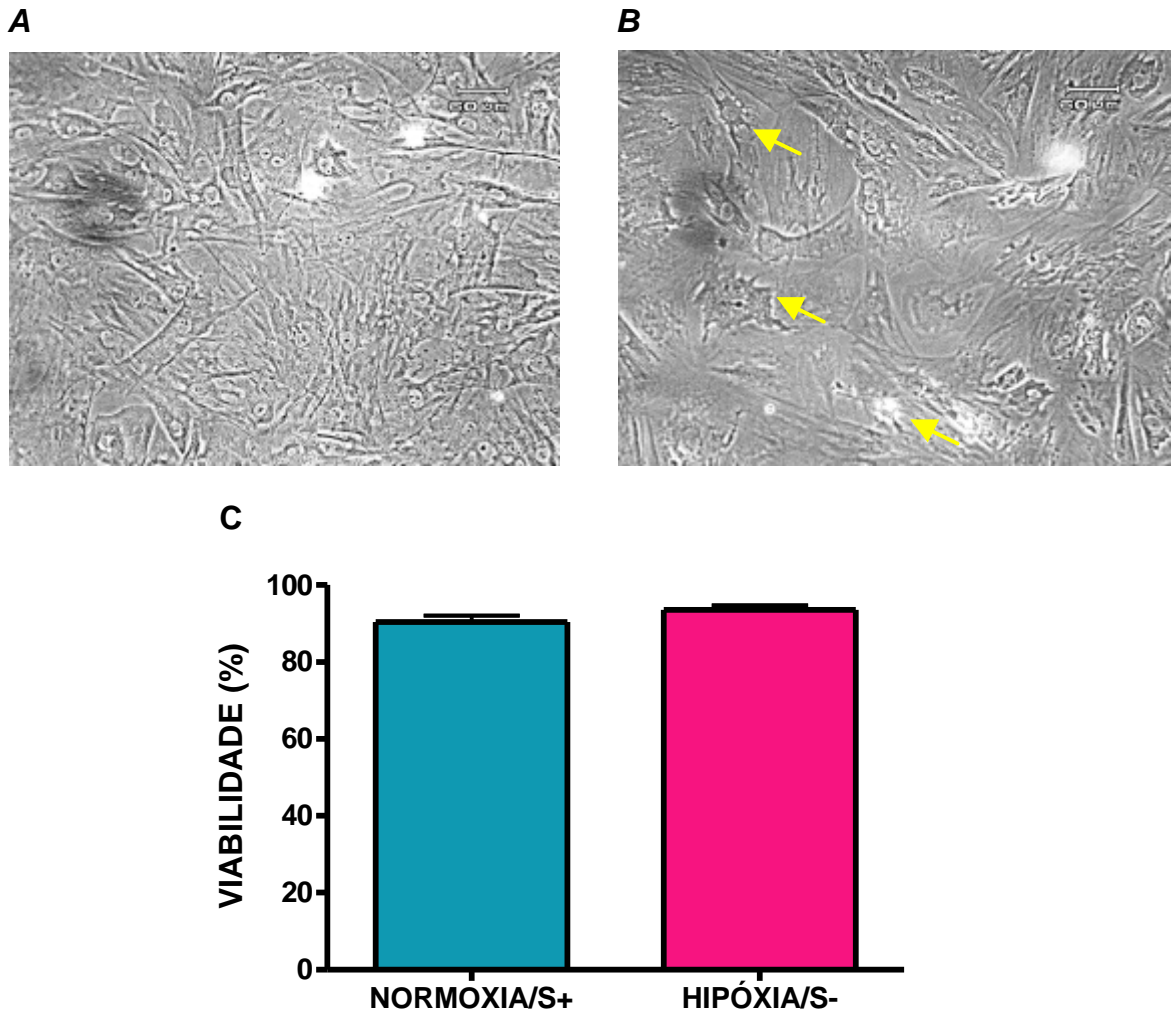


FIGURA 6 – Viabilidade das MSC após privação de soro associada a hipóxia por exclusão do corante azul de Trypan.

A: MSC uma semana após terceira passagem com tripsina já no estado de confluência em meio DMEM com 10% de SFB. **B:** MSC de terceira passagem com 72 horas de privação de soro em hipóxia. Setas indicam células com aumento de granulosidade e retração citoplasmática. **C:** Viabilidade das MSC pela exclusão do corante azul de Trypan após 72 horas em regime de normóxia com 10% de SFB (NORMÓXIA/S +) ou sem soro em condição de hipóxia (HIPÓXIA/S -).

4.4 ESTUDO IN VIVO DO EFEITO DO MEIO CONDICIONADO

4.4.1 Protocolo Experimental I

Neste protocolo experimental, o objetivo do estudo foi avaliar se os fatores solúveis liberados *in vitro*, em condições de normóxia, pelas MSC seriam capazes de promover melhora funcional quando administrados via intramiocárdica em ratos com infarto agudo do miocárdio. Devido ao fato dos parâmetros funcionais dos animais controles estudados no protocolo experimental I (DMEM-I, n=4) não serem diferentes estatisticamente dos parâmetros funcionais dos animais controles estudados no protocolo II (DMEM-II, n=13), optou-se por unir os animais infartados tratados com DMEM em um único grupo experimental (DMEM, n=17).

ECG

Após 3 horas da indução do infarto, os animais foram submetidos à avaliação funcional pelo ECG e ECO com o objetivo de confirmar o infarto e avaliar a homogeneidade do comprometimento cardíaco.

A tabela 1 mostra os parâmetros avaliados pelo ECG nos tempos 3 horas e 21 dias após o infarto nos grupos estudados. O grupo FO apresentou eixo médio de despolarização do ventrículo esquerdo considerado normal, voltado para a esquerda nos tempos de 3 horas e 21 dias após a cirurgia fictícia. Este fato demonstra que a exteriorização do coração e a passagem do fio de sutura somente não provocaram perda de massa contrátil capaz de deslocar o eixo. Coerentemente, não foi observado onda Q nos ECGs dos animais do grupo FO.

	FO (n=9)		DMEM (n=17)		MCN (n=9)		MCN-C (n=6)	
	3h	21 dias	3h	21 dias	3h	21 dias	3h	21 dias
	Esquerda	Direita	Esquerda	Direita	Esquerda	Direita	Esquerda	Direita
ÂQRS	9	0	8	17	4	9	5	6
Onda Q em DI	-	-	+	+	+	+	+	+

TABELA 1 – Estudo eletrocardiográfico (Protocolo experimental I) obtido 3 horas (pré-injeção im) e 21 dias após infarto e injeção intramiocárdica de **DMEM**, meio condicionado obtido em normóxia não concentrado (**MCN**) e concentrado em 25 vezes (**MCN-C**). **FO**: grupo falso-operado. **Â-QRS**: vetor médio de despolarização do ventricular.

O infarto foi confirmado pela presença de onda Q na derivação DI que esteve presente em todos os grupos submetidos à ligadura da coronária. No grupo controle DMEM, no tempo de 3 horas após ligadura, 8 animais apresentaram o vetor médio de despolarização ventricular compreendidos no primeiro quadrante e voltados para a esquerda. Entretanto, 21 dias após o infarto e injeção intramiocárdica todos os animais do grupo DMEM apresentaram desvio do vetor médio de despolarização para a direita, fato que demonstra a perda considerável de massa ventricular esquerda passível de despolarização. No grupo MCN, 4 em 9 animais mantiveram o vetor médio de despolarização ventricular para a esquerda após 3 horas da indução do infarto. Entretanto, após 21 dias todos os animais, semelhante ao controle, apresentaram desvio do vetor médio de despolarização para a direita.

A figura 7A complementa as observações anteriores mostrando os valores do ângulo do vetor médio de despolarização ventricular ($\hat{A}QRS$, graus) para os diferentes grupos experimentais. Observa-se que 3 horas após indução do infarto os grupos infartados DMEM e MCN apresentaram valores médios de $\hat{A}QRS$ maiores que aquele calculado para o grupo submetido a cirurgia fictícia, sendo o grupo MCN-C não diferente do FO. Já no tempo de 21 dias após o infarto e injeção intramiocárdica, independente da injeção recebida ($\hat{A}QRS$, graus: DMEM: 140 ± 8 ; MCN: 161 ± 9 ; MCN-C: 152 ± 13), os animais infartados apresentaram ângulo do vetor médio de despolarização ventricular próximo a 180 graus estando o vetor localizado no segundo quadrante. Os animais do grupo FO mantiveram o ângulo do vetor de despolarização próximo a 60 graus, conservando o eixo à esquerda ($\hat{A}QRS$, graus: FO: 61 ± 5).

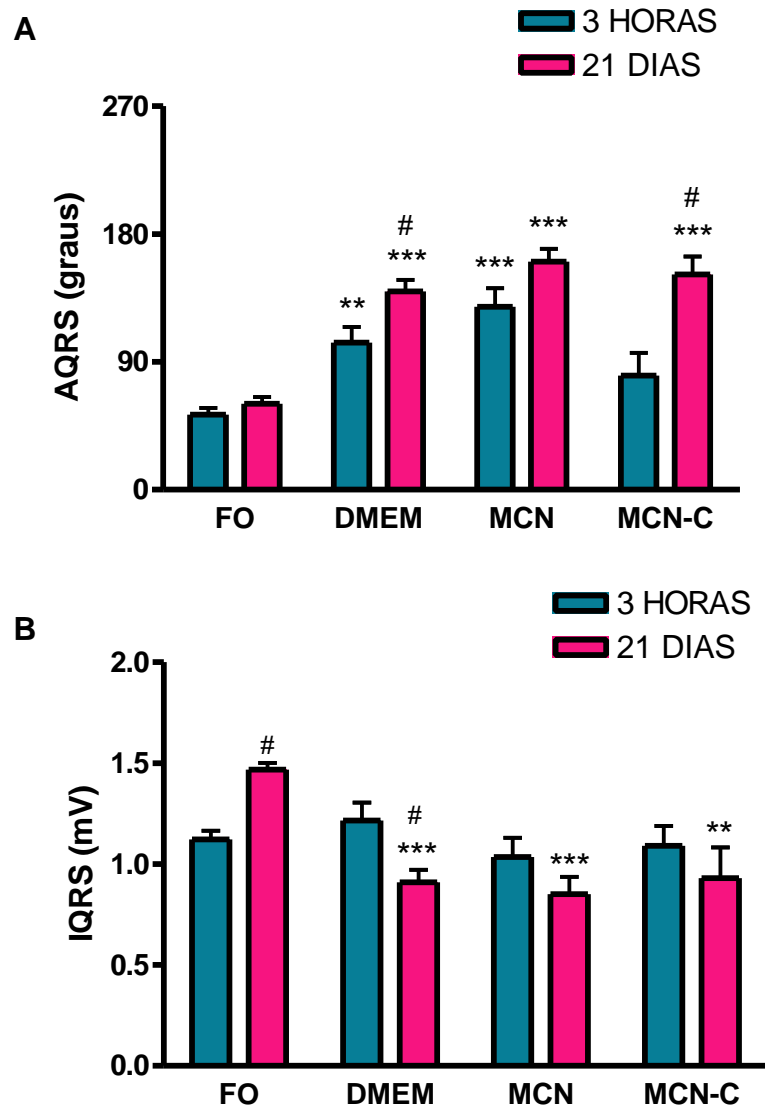


FIGURA 7 – Estudo eletrocardiográfico realizado 3 horas e 21 dias após a injeção intramiocárdica – Protocolo experimental I.

Grupos: **DMEM** (n=18); meio condicionado obtido em normóxia não concentrado (**MCN**, n=9); meio condicionado obtido em normóxia concentrado em 25 vezes (**MCN-C**, n=6). **(A)** Índice QRS e **(B)** Ângulo do vetor médio de despolarização do ventrículo esquerdo. * p<0,05 vs FO; ** p<0,01 vs FO; *** p<0,001 vs FO (n=9); # p<0,05 vs 3 horas.

Comparando-se os tempos de 3 horas e 21 dias em um mesmo grupo experimental, observa-se que a evolução temporal do infarto promove adicional incremento do Δ QRS nos grupos infartados, embora para o grupo MCN essa observação não tenha alcançado significância.

O índice QRS (IQRS, mV), que está relacionado proporcionalmente à massa ventricular com capacidade de despolarização, no tempo de 3 horas não foi diferente entre os grupos experimentais (Fig. 7B). Já no tempo de 21 dias após ligadura, observa-se que todos os grupos infartados, independente do tratamento recebido, apresentaram IQRS de menor magnitude quando comparado ao grupo normal controle FO. Nota-se que no grupo FO, o IQRS foi significativamente maior 21 dias após indução do infarto. Ainda que no tempo de 21 dias não haja diferença estatística entre os grupos infartados, quando os valores de IQRS referentes aos tempos de 3 horas e 21 dias são comparados em um mesmo grupo experimental, observa-se que o grupo DMEM apresentou, ainda que discreta, redução adicional do IQRS enquanto que para os outros grupos infartados o IQRS se manteve similar ao mensurado no tempo de 3 horas.

Logo, a injeção intramiocárdica de MC, obtido em condições de normóxia, restringe o decréscimo no IQRS observado com a evolução temporal do infarto e este efeito não se mostrou mais proeminente devido ao fato do MC ter sido previamente concentrado em 25 vezes.

ECO

A função sistólica foi avaliada pela FEA, que por considerar todo o diâmetro cavitário, em um mesmo corte transversal do coração, permite uma avaliação mais fidedigna da função cardíaca que àquela obtida pelo M-mode, o qual considera

apenas pontualmente uma região da cavidade ao longo do tempo. A fração de encurtamento de área (FEA, %) dos grupos experimentais nos tempos 3 horas e 21 dias após infarto e injeção intramiocárdica é mostrada na Figura 8. A FEA, no tempo de 3 horas após o infarto, foi significativamente menor nos grupos infartados quando comparados ao grupo FO, mostrando que a disfunção já se manifesta em pouco tempo após ligadura. Visto que não houve diferença significativa entre os grupos infartados DMEM, MCN e MCN-C no tempo de 3 horas, pode-se afirmar que o grau de comprometimento cardíaco foi semelhante, o que sugere infartos homogêneos entre os grupos. Ao final de 21 dias após cirurgia, observa-se que o grupo FO manteve os valores de FEA, enquanto o grupo infartado DMEM apresentou redução da já comprometida FEA. Essa redução adicional da FEA não foi observada nos grupos que receberam MCN ou MCN-C, sugerindo que, similar ao resultado apresentado para o IQRS, a administração intramiocárdica de MCN ou MCN-C parece limitar a magnitude da disfunção após infarto (Fig. 8).

Teste De Esforço

Uma vez que em níveis fisiológicos basais, os animais tratados com MCN ou MCN-C não apresentaram melhora da função cardíaca, optou-se por adicionar à análise funcional o teste de esforço, com o objetivo de se avaliar a resposta dos diferentes grupos ao estresse fisiológico induzido pelo exercício. A figura 9 mostra o tempo de exercício nos diferentes grupos experimentais.

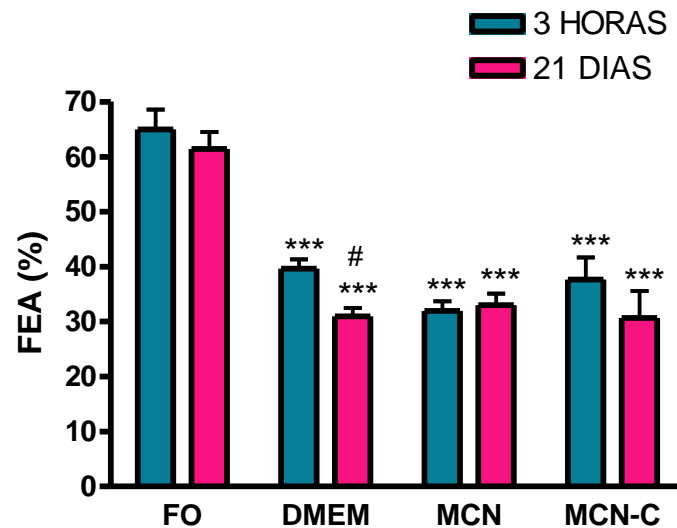


FIGURA 8 – Estudo ecocardiográfico realizado 3 horas e 21 dias após a injeção intramiocárdica – Protocolo experimental I. Fração de encurtamento de área (FEA, %). **DMEM** (n=18); meio condicionado obtido em normóxia não concentrado (**MCN**, n=9); meio condicionado obtido em normóxia concentrado em 25 vezes (**MCN-C**, n=6). * p<0,05 vs FO; ** p<0,01 vs FO; *** p<0,001 vs FO (n=9); # p<0,05 vs 3 horas.

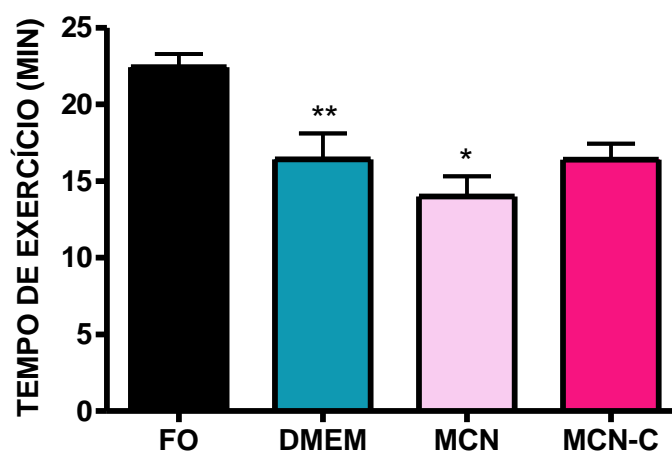


FIGURA 9 – Tempo de exercício em esteira – Protocolo Experimental I
Grupos: falso operado, **FO** (n=9); **DMEM** (n=13), meio condicionado obtido em normóxia, **MCN** (n=3); meio condicionado obtido em normóxia 25 vezes concentrado, **MCN-C** (n=6). *p<0,05 vs FO e ** p<0,01 vs FO.

O grupo controle DMEM apresentou baixa capacidade ao exercício evidenciada pelo menor tempo de corrida comparado ao FO (DMEM: $16,4 \pm 1,7$ min vs $22,4 \pm 0,9$ min; $p < 0,01$). A injeção intramiocárdica de MCN não promoveu melhora na capacidade máxima ao exercício visto que o tempo de permanência em esteira (MCN: $14,0 \pm 1,4$ min) atingido foi significativamente inferior ao FO e não diferente do grupo controle DMEM. O grupo MCN-C (MCN-C: $16,4 \pm 1,0$ min), embora não tenha apresentado diferença estatística em relação ao grupo FO, também não apresentou diferença no tempo de exercício quando comparado ao grupo controle DMEM. Os dados mostram que existe uma tendência do grupo MCN-C apresentar comportamento semelhante ao grupo MCN e, portanto o tratamento com MCN-C é igualmente ineficaz em promover aumento do tempo de exercício.

Parâmetros obtidos do Registro de Pressão Ventricular Esquerda

Considerando que os valores funcionais basais de FEA obtido pelo ECO foi realizado em animais anestesiados, optou-se por obter o registro de pressão ventricular esquerda em animais não anestesiados, com o objetivo de aumentar a sensibilidade de detecção de eventuais melhorias funcionais tênues. Ao final do protocolo de 21 dias, os animais foram submetidos à cateterização do ventrículo esquerdo e o registro de pressão ventricular foi adquirido 24 horas após a cirurgia, em animais não anestesiados.

A tabela 2 mostra os parâmetros obtidos do registro de pressão ventricular esquerda. O grupo infartado DMEM apresentou PDF cerca de 5 vezes maior que o grupo FO. Este parâmetro demonstra que o modelo de infarto adotado foi capaz de promover considerável grau de insuficiência cardíaca.

GRUPOS	PDF (mmHg)	PS (mmHg)	PDVE (mmHg)	FC (bpm)	DP/DT+ (mmHg/s)	DP/DT- (mmHg/s)
FO (n=6)	4±1	133±5	130±7	364±17	8119±353	-6200±263
DMEM (n=14)	20±2 ^{***}	108±2 ^{**}	89±3 ^{***}	317±12	5325±255 ^{**}	-4051±124 ^{***}
MCN (n=8)	25±2 ^{***}	110±5 [*]	85±4 ^{***}	349±16	4955±375 ^{***}	-3734±257 ^{***}
MCN-C (n=5)	19±4 ^{***}	104±4 ^{***}	84±7 ^{***}	341±10	4718±535 ^{***}	-3496±209 ^{***}

TABELA 2 – Parâmetros funcionais obtidos do registro de pressão ventricular esquerda 21 dias após IM – Protocolo experimental I

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<0,01 vs FO e ***p<0,001 vs FO.

A perda de tecido cardíaco e, conseqüentemente, substituição por tecido cicatricial menos complacente também pode ter sido responsável pelos altos valores de PDF. Entretanto, a injeção intramiocárdica de MCN ou MCN-C não foi capaz de reduzir a PDF, sugerindo que o grau de insuficiência cardíaca foi semelhante ao grupo controle DMEM. A perda de tecido muscular cardíaco induzida pelo infarto foi responsável pelos baixos valores de PS e PDVE no grupo infartado DMEM. Mais uma vez, a injeção intramiocárdica de MCN ou MCN-C falhou em promover quaisquer benefícios sobre os parâmetros analisados.

A contratilidade cardíaca fornecida pelo índice $dp/dt+$ foi menor nos animais infartados quando comparados ao FO não existindo diferença entre os grupos DMEM e MCN ou MCN-C. De forma análoga, o índice de relaxamento cardíaco dado pela $dp/dt-$ foi menor nos animais infartados e novamente, o MCN ou MCN-C não foram capazes de promover melhora no relaxamento cardíaco.

Tamanho do Infarto

Nota-se que a ligadura da artéria coronária esquerda resultou em infartos de grande extensão acometendo aproximadamente 40% do ventrículo esquerdo (Fig. 10). Entretanto, não foi observado nenhum efeito da injeção intramiocárdica de MCN ($50\pm 3\%$) ou MCN-C ($45\pm 4\%$) sobre o tamanho do infarto em relação ao grupo controle DMEM ($43\pm 3\%$).

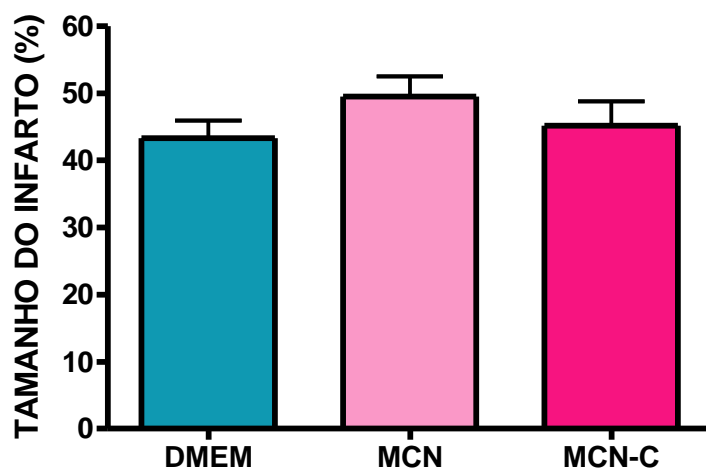


FIGURA 10 – Quantificação do tamanho do infarto (%) obtido através do percentual de perímetro infartado visualizado em coloração histológica de *Picrosirius Red*. – Protocolo experimental I.
Grupos: DMEM (n=11); MCN (n=8) e MCN-C (n=5).

4.4.2 Protocolo Experimental II

Neste protocolo experimental, o objetivo do estudo foi avaliar se os fatores solúveis liberados pelas MSC *in vitro*, agora em condições de hipóxia, seriam capazes de promover melhora funcional quando administrados por via intramiocárdica em ratos com infarto agudo do miocárdio, visto que a condição de hipóxia é conhecida por induzir aumento na expressão de fatores tróficos liberados por estas células (Kinnaird e cols., 2004a,b; Gnechi e cols., 2006). Em adição, a obtenção de MC em condição de hipóxia (MCH) simula de forma mais fidedigna o microambiente isquêmico do infarto no qual as MSC são normalmente injetadas. Neste estudo, portanto, optou-se por otimizar o protocolo experimental utilizando o meio condicionado obtido em condições de hipóxia já na maior concentração (25 vezes concentrado). As mesmas avaliações funcionais aplicadas ao protocolo experimental I foram utilizadas para o protocolo experimental II.

ECG

Similarmente ao protocolo I, após 3 horas da indução do infarto, os animais foram submetidos à avaliação funcional pelo ECG e ECO com o objetivo de confirmar o infarto e avaliar a homogeneidade do comprometimento cardíaco.

A tabela 3 mostra os parâmetros avaliados pelo ECG nos tempos 3 horas e 21 dias após o infarto nos grupos estudados. O infarto foi confirmado pela presença de onda Q na derivação DI, observação presente e resultante da interrupção de fluxo sanguíneo para o ventrículo esquerdo. No grupo MCH-C, no tempo de 3 horas após ligadura, 4 animais apresentaram o vetor médio de despolarização ventricular compreendidos no primeiro quadrante e voltados para a esquerda.

	DMEM (n=17)		MCH-C (n=14)	
	3h	21 dias	3h	21 dias
	Esquerda	Direita	Esquerda	Direita
ÂQRS	8	17	4	14
Onda Q em DI	+	+	+	+

TABELA 3 – Estudo eletrocardiográfico (Protocolo Experimental II) obtido 3 horas (pré-injeção im) e 21 dias após infarto e injeção intramiocárdica de **DMEM** ou meio condicionado obtido em hipóxia concentrado, **MCH-C**. **Â-QRS**: vetor médio de despolarização ventricular.

Entretanto, 21 dias após o infarto e injeção intramiocárdica todos os animais infartados, independente da injeção intramiocárdica de DMEM ou MCH-C, apresentaram desvio do vetor médio de despolarização para a direita, fato que demonstra a perda considerável de massa ventricular esquerda passível de despolarização.

A figura 11A mostra os valores do ângulo do vetor médio de despolarização ventricular ($\hat{A}QRS$, graus) para os grupos DMEM e MCH-C. Observa-se que no tempo de 3 horas após indução do infarto, o valor de $\hat{A}QRS$ não foi diferente entre os grupos experimentais ($\hat{A}QRS$, graus; DMEM: 104 ± 12 ; MCH-C: 100 ± 2) e este parâmetro continuou não sendo diferente entre os grupos quando avaliado 21 dias após o infarto ($\hat{A}QRS$, graus; DMEM: 140 ± 8 ; MCH-C: 138 ± 7). O $\hat{A}QRS$, quando analisado ao longo do tempo mostrou-se aumentado no tempo de 21 dias para ambos os grupos experimentais, mostrando que a evolução do infarto promoveu desvio adicional do vetor médio de despolarização ventricular para a direita.

Em relação ao índice QRS (Fig. 11B), observa-se que não houve diferença entre os grupos experimentais quando avaliados no tempo de 3 horas (IQRS, mV; DMEM: $1,21 \pm 0,08$ vs MCH-C: $1,10 \pm 0,05$, $p > 0,05$). Já quando avaliados no tempo de 21 dias após o infarto, foi possível observar que os animais que receberam MCH-C apresentaram IQRS superior àquele apresentado pelo grupo DMEM (IQRS, mV; DMEM: $0,91 \pm 0,06$ vs MCH-C: $1,18 \pm 0,05$; $p < 0,05$). Os valores de IQRS referentes aos tempos de 3 horas e 21 dias quando são comparados em um mesmo grupo experimental mostrou que o grupo DMEM apresentou discreta redução ($18 \pm 9\%$) do IQRS, enquanto para o grupo MCH-C esse índice se manteve constante ao longo do tempo.

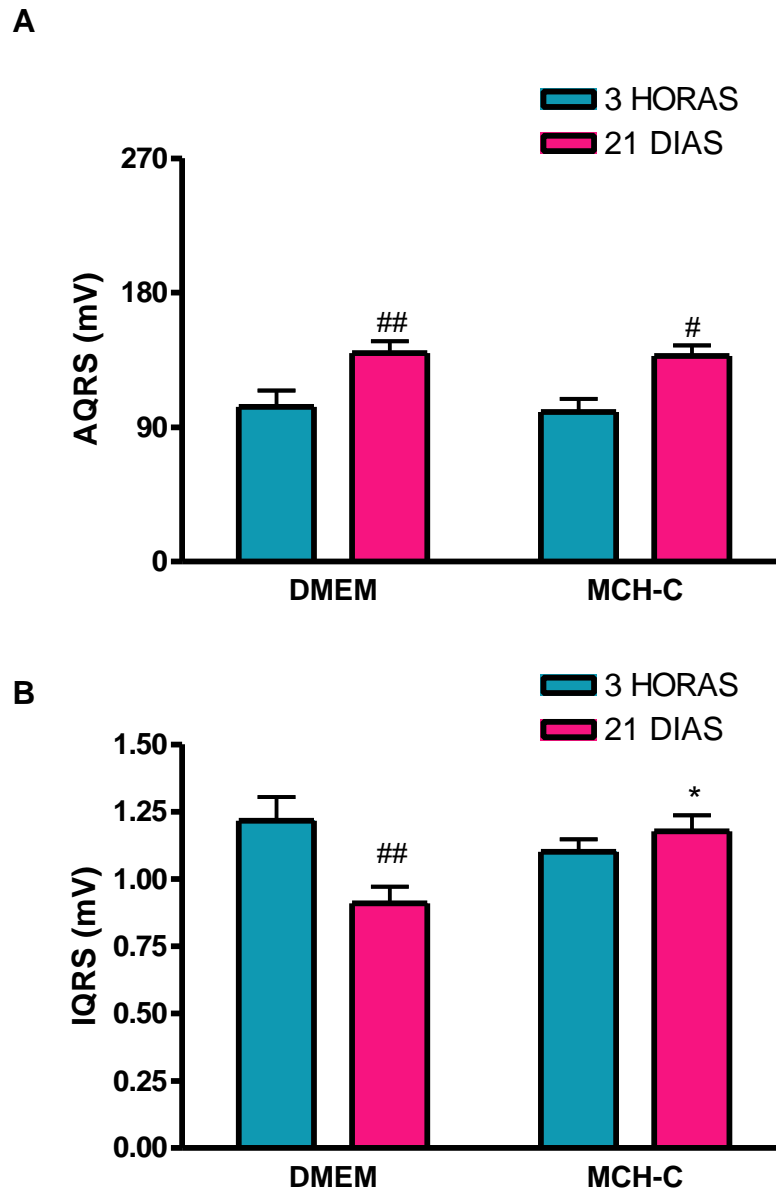


FIGURA 11 – Estudo eletrocardiográfico realizado 3 horas e 21 dias após a injeção intramiocárdica – Protocolo experimental II.

Grupos: DMEM (n=18); meio condicionado obtido em hipóxia e concentrado em 25 vezes, (MCH-C, n=14). **(A)** ÂQRS: Ângulo do vetor médio de despolarização ventricular e **(B)** IQRS: índice QRS. * p<0,05 vs DMEM 21 dias; # p<0,05 vs 3 horas; ## p<0,01 vs 3h.

Logo, a injeção intramiocárdica de MC, obtido em condições de hipóxia, restringe o decréscimo no IQRS observado com a evolução temporal do infarto.

ECO

A fração de encurtamento de área (FEA, %) dos grupos DMEM e MCH-C nos tempos de 3 horas e 21 dias após infarto é mostrada na Figura 12. No tempo de 3 horas após infarto não houve diferença significativa entre os grupos experimentais, sugerindo que o comprometimento cardíaco foi semelhante (FEA, %; DMEM: 40 ± 2 ; MCH-C: 35 ± 3 ; $p > 0,05$). Ainda que ao final de 21 dias após cirurgia, os valores de FEA não sejam diferentes entre os animais que receberam DMEM e aqueles que receberam MCH-C, observa-se que quando comparados ao longo do tempo, o grupo MCH-C manteve os valores de FEA ($31\pm 3\%$), enquanto que o grupo infartado DMEM apresentou discreta redução FEA ($31\pm 2\%$).

Teste de Esforço

O teste de esforço em esteira consistiu em uma tentativa de aumentar a sensibilidade de detecção de melhorias funcionais tênues. Entretanto, com o protocolo experimental utilizado, não se observou diferença em relação ao tempo de exercício (Fig. 13) entre os grupos DMEM e MCH-C (DMEM: 16 ± 2 min; MCH-C: 15 ± 2 min; $p > 0,05$). Logo, o tratamento com MCH-C falhou em promover aumento do tempo de exercício quando comparado ao grupo DMEM.

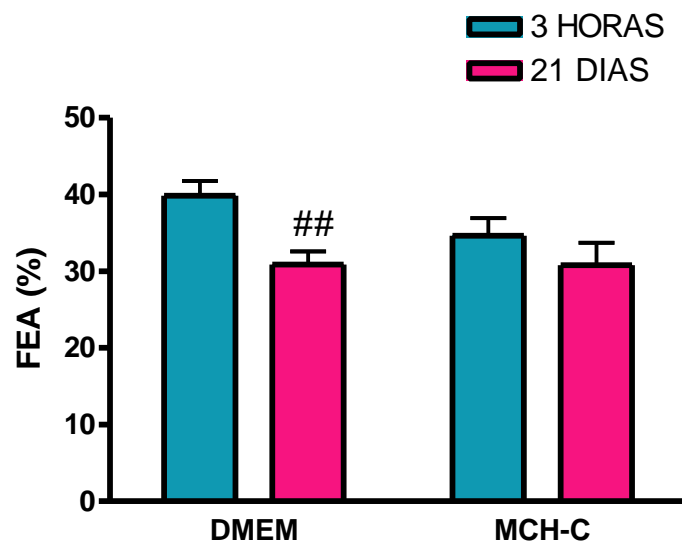


FIGURA 12 – Estudo ecocardiográfico realizado 3 horas após infarto e 21 dias após a injeção intramiocárdica – Protocolo experimental II. Fração de encurtamento de área (FEA, %): **DMEM** (n=16); meio condicionado obtido em hipóxia concentrado 25 vezes, **MCH-C**, n=15). ## p<0,01 vs 3 horas.

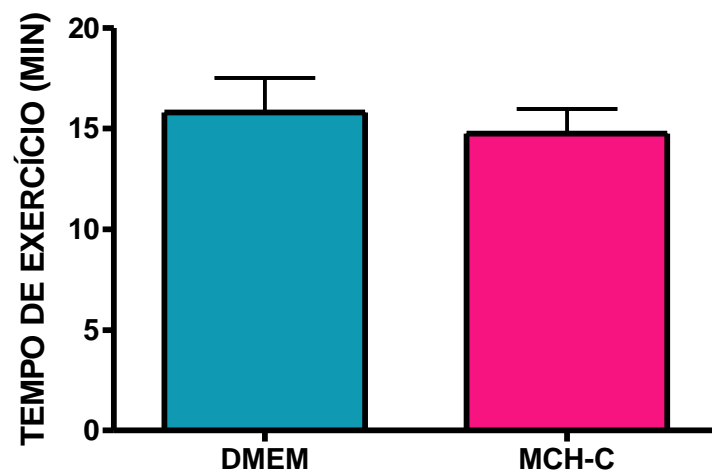


FIGURA 13 – Tempo de exercício em esteira – Protocolo Experimental II
Grupos: DMEM, (n=12); meio condicionado obtido em hipóxia concentrado 25 vezes, MCH-C, (n=15).

Parâmetros obtidos do Registro de Pressão Ventricular Esquerda

A tabela 4 mostra os parâmetros obtidos do registro de pressão ventricular esquerda em ratos não anestesiados do grupo controle DMEM e grupo MCH-C. Tem-se que o grupo MCH-C apresentou pressão diastólica final (PDF) cerca de 35% menor que o grupo controle DMEM ($p < 0,01$). Entretanto, não foram observadas diferenças significativas entre os valores de pressão sistólica e pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo, embora tenha havido tendência a um valor maior de PDVE no grupo MCH-C. Em relação à contratilidade cardíaca, observou-se que o grupo MCH-C apresentou contratilidade aumentada, em aproximadamente 15%, quando comparada aos valores do grupo DMEM. Fato similar foi observado para o relaxamento cardíaco o qual se mostrou com magnitude maior (aumento de aproximadamente 12%) no grupo MCH-C. A frequência cardíaca foi também maior no grupo MCH-C que no grupo DMEM.

Logo, a injeção intramiocárdica de MC obtido em condições de hipóxia foi capaz de atenuar a redução, ao longo do tempo, do IQRS e da FEA obtidas nos exames de ECG e ECO. Em adição, a contratilidade e o relaxamento cardíaco obtidos através dos índices derivados da pressão ventricular esquerda mostraram-se aumentados no grupo MCH-C, ainda que discretamente, enquanto que a PDF apresentou-se significativamente reduzida no grupo MCH-C.

Tamanho do Infarto

A figura 14 mostra os valores de tamanho de infarto para os grupos estudados no protocolo II. Apesar da melhora funcional observada nos animais tratados com MCH-C, o tamanho do infarto não foi diferente entre os animais tratados com MCH-C ($40 \pm 4\%$) e o grupo controle DMEM ($40 \pm 4\%$).

GRUPOS	PDF (mmHg)	PS (mmHg)	PDVE (mmHg)	FC (bpm)	DP/DT+ (mmHg/s)	DP/DT- (mmHg/s)
DMEM (n=14)	20±2 ^{***}	108±2 ^{**}	89±3 ^{***}	317±12	5325±255 ^{**}	-4051±124 ^{***}
MCH-C (n=13)	13±2 ^{**}	110±3	97±4	352±10 [*]	4718±535 [*]	-3496±209 [*]

TABELA 4 – Parâmetros obtidos a partir da pressão ventricular esquerda – Protocolo II

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<0,01 vs DMEM e *p<0,05 vs DMEM.

4.4.3 Protocolo Experimental III

Neste protocolo experimental, o objetivo do estudo foi avaliar se os fatores solúveis liberados pelas MSC *in vitro*, em condições de hipóxia, também seriam capazes de promover melhora funcional quando administrados por via intramiocárdica em ratos com infarto crônico cicatrizado do miocárdio. As mesmas avaliações funcionais aplicadas aos protocolos experimentais I e II foram utilizadas para o protocolo experimental III.

ECG

Após 4 semanas da indução do infarto, os animais foram submetidos à avaliação funcional pelo ECG e ECO com o objetivo de confirmar o infarto e avaliar a homogeneidade do comprometimento cardíaco.

A avaliação eletrocardiográfica mostra que com 4 semanas após IM, todos os animais de ambos os grupos apresentaram vetor médio de despolarização ventricular localizado entre 90° e 180° (Fig. 15A), característica que se manteve ao longo do tempo e que portanto, não foi diferente entre os grupos no final de 6 semanas após IM.

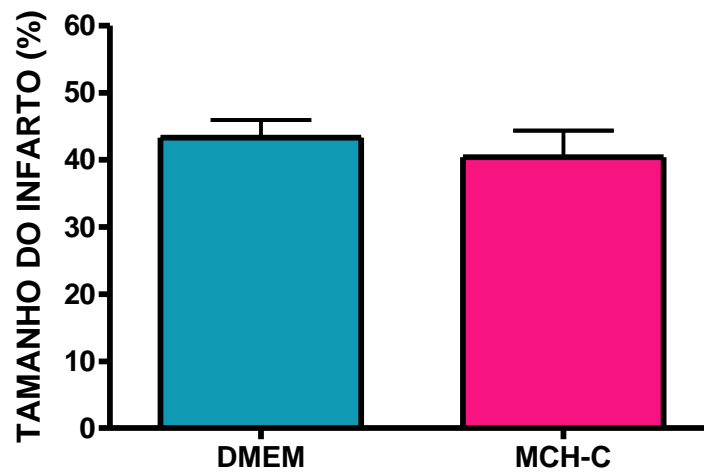


FIGURA 14 – Quantificação do tamanho do infarto (%) obtido através do percentual de perímetro infartado visualizado em coloração histológica de *Picrosirius Red* – Protocolo Experimental II.
Grupos: DMEM (n=11), MCH-C (n=10).

Em relação ao IQRS (Fig.15B), observa-se que no grupo controle (DMEM: $1,08 \pm 0,23$ mV em 4 semanas vs $1,22 \pm 0,23$ mV em 6 semanas após IM; $p > 0,05$), o tempo não induziu atenuação adicional do IQRS como observado nos protocolos I e II. Isto sugere que a redução do IQRS ocorre somente na fase inicial após IM. Não foi observado quaisquer diferenças entre o grupo DMEM e MCH-C em relação aos parâmetros eletrocardiográficos estudados nos tempos de 4 (DMEM: $1,08 \pm 0,23$ mV vs MCH-C: $1,06 \pm 0,09$ mV; $p > 0,05$) e 6 semanas (DMEM: $1,22 \pm 0,23$ mV vs MCH-C: $1,10 \pm 0,12$ mV; $p > 0,05$). Comparações dentro de um mesmo grupo considerando a evolução do tempo também não mostraram diferenças significativas em relação ao valor de IQRS.

ECO

Similar ao observado para o IQRS, a FEA (Fig.16) não foi diferente entre os grupos quando avaliada no tempo de 4 semanas após IM, sugerindo comprometimento cardíaco de mesma magnitude (DMEM: $21 \pm 2\%$ vs $25 \pm 3\%$; $p > 0,05$). Duas semanas após a injeção intramiocárdica, ou seja, 6 semanas após IM, novamente as FEA não foram diferentes entre os grupos (DMEM: $26 \pm 1\%$ vs MCH-C: $25 \pm 2\%$). Comparações dentro de um mesmo grupo considerando a evolução do tempo também não mostraram diferenças significativas em relação ao valor de FEA.

Teste de Esforço

A administração intramiocárdica de MCH-C (min), no IM crônico não foi capaz de modificar o tempo de permanência em exercício (Fig. 17) quando comparado ao grupo controle DMEM (10 ± 1 min vs 13 ± 1 min, respectivamente).

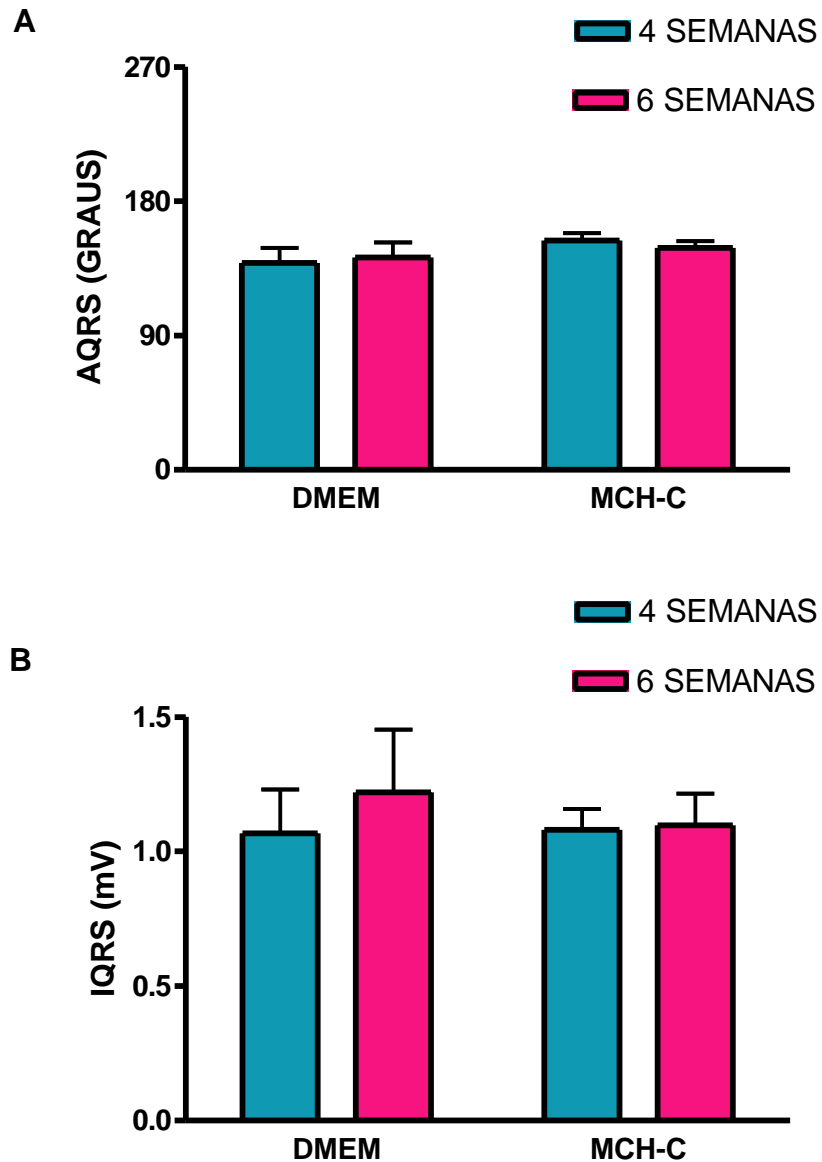


FIGURA 15 – Estudo eletrocardiográfico realizado 4 (pré-administração) e 6 semanas após infarto (pós-administração) – Protocolo experimental III. Grupos: DMEM (n=3); meio condicionado obtido em hipóxia e concentrado em 25 vezes, MCH-C, (n=6). **(A)** ÂQRS: Ângulo do vetor médio de despolarização ventricular e **(B)** IQRS: índice QRS.

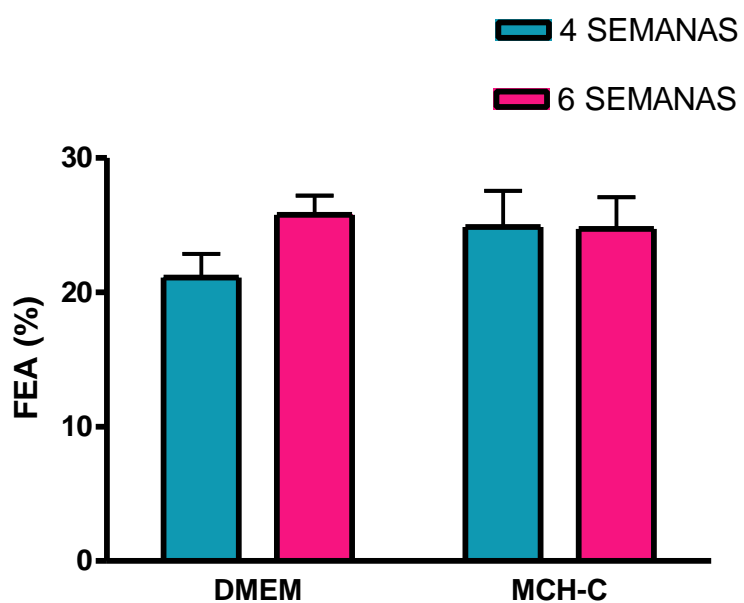


FIGURA 16 – Estudo ecocardiográfico realizado 4 (pré-administração) e 6 semanas após infarto (pós-administração) – Protocolo experimental III. Fração de encurtamento de área (FEA, %): **DMEM**: n=3; **MCH-C**: n=6.

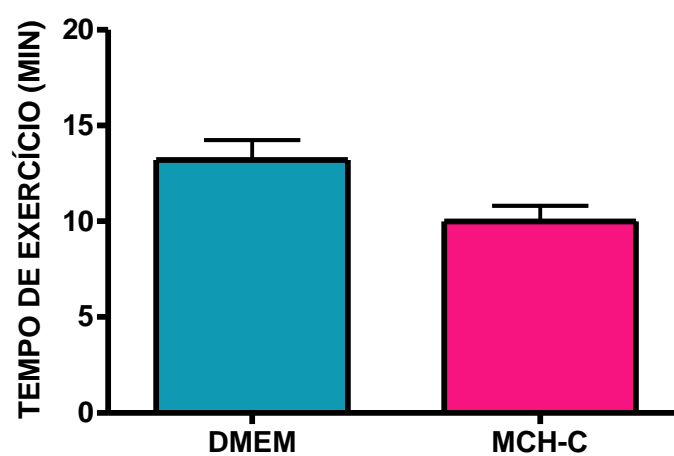


FIGURA 17 – Tempo de exercício em esteira (minutos) 6 semanas após IM – Protocolo Experimental III
Grupos: DMEM (n=3); meio condicionado obtido em hipóxia concentrado 25 vezes, MCH-C (n=6).

Parâmetros obtidos do Registro de Pressão Ventricular Esquerda

A tabela 5 mostra os parâmetros obtidos do registro de pressão ventricular esquerda em ratos não anestesiados do grupo controle DMEM e grupo MCH-C no final das 6 semanas do protocolo experimental. Nota-se que, diferente do observado para a injeção intramiocárdica em modelo de infarto agudo, a injeção de MCH-C em modelo de infarto cicatrizado falhou em promover melhora da contratilidade e relaxamento cardíaco, bem como não foi capaz de modificar os valores de PDF, PSF e PDVE.

Logo, a injeção intramiocárdica de MC obtido em condições de hipóxia quando administrada em modelo de infarto crônico não modificou os parâmetros basais eletro e ecocardiográficos, assim como os parâmetros obtidos a partir da pressão ventricular esquerda. Em adição, mesmo em condição de estresse fisiológico induzido pelo exercício físico, os grupos DMEM e MCH-C não se mostraram diferentes estatisticamente.

Tamanho do Infarto

A figura 18 mostra os valores percentuais de tamanho do infarto para os grupos estudados no protocolo III. Mais uma vez, o grupo tratado com MCH-C apresentou tamanho de infarto ($47\pm 2\%$) similar ao grupo tratado controle ($51\pm 3\%$).

GRUPOS	PDF (mmHg)	PS (mmHg)	PDVE (mmHg)	FC (bpm)	DP/DT+ (mmHg/s)	DP/DT- (mmHg/s)
DMEM (n=3)	20±4	107±4	87±7	335±10	5896±584	-4755±298
MCH-C (n=6)	23±3	106±2	82±10	370±19	5786±232	-4339±149

TABELA 5 – Parâmetros obtidos do registro de pressão ventricular esquerda - Protocolo Experimental III

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.

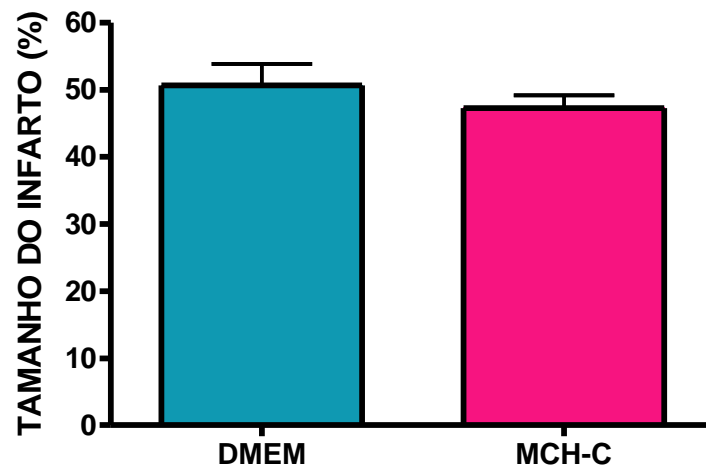


FIGURA 18 – Quantificação do tamanho do infarto (%) obtido através do percentual de perímetro infartado visualizado em coloração histológica de *Picrosirius Red* – Protocolo Experimental III.
Grupos: DMEM (n=3), MCH-C (n=6).

4.5 ESTUDO IN VITRO DO EFEITO DO MEIO CONDICIONADO

Os estudos *in vitro* foram realizados com o objetivo de avaliar se a discreta melhora funcional observada após injeção intramiocárdica de MC poderia estar relacionada a um eventual efeito anti-apoptótico. Para tanto, procurou-se induzir morte por apoptose em cardiomiócitos de ratos neonatos utilizando como modelo a privação de soro associada ou não à hipóxia.

4.5.1 Quantificação da apoptose por marcação com EtBr e citometria de fluxo

Após 48 a 72 horas do plaqueamento, os cardiomiócitos foram submetidos às condições experimentais descritas abaixo por 24 horas. Em um primeiro experimento feito em duplicata, a condição controle foi feita mantendo-se os cardiomiócitos em DMEM com 10% de SFB. O modelo de indução de morte consistiu na privação de soro e o efeito do MCN (não concentrado) foi testado utilizando a diluição na proporção volumétrica de 1:1 com meio DMEM sem soro. Essa condição experimental foi denominada MCN-d por utilizar o MCN na forma diluída. Após 24 horas nas condições experimentais, o percentual de cardiomiócitos em apoptose foi obtido por análise em citômetro de fluxo utilizando a técnica de marcação de EtBr em cardiomiócitos permeabilizados. A figura 19 mostra as condições experimentais, SORO +, SORO- e MCN-d, divididas em colunas A, B e C, respectivamente. Cada coluna apresenta os gráficos FL3-Area vs FL3-Height com as regiões, R1 e R2, e os respectivos histogramas de intensidade de marcação com EtBr gerados a partir de R2. Na condição controle observa-se que existe um número reduzido de eventos hipodiplóides representativos de células apoptóticas (Fig. 19A, painel superior), regiões de grande densidade de eventos 2n e pouca densidade de eventos 4n.

O histograma obtido a partir dos eventos contidos em R2 (Fig. 19A, painel inferior) mostra um primeiro pico com grande quantidade de eventos e marcação de EtBr correspondente aos núcleos 2n e um segundo pico de menor amplitude e maior intensidade de marcação com EtBr representativo dos núcleos 4n. O intervalo M1 fornece o percentual de células apoptóticas que apresentam baixa intensidade de marcação com EtBr. Quando os cardiomiócitos são submetidos à privação de soro, observa-se um aumento na densidade de eventos apoptóticos (Fig. 19B, painel superior), melhor visualizado no respectivo histograma (Fig. 19B, painel inferior) que mostra, por sua vez, um maior número de eventos contidos no intervalo M1. Quando os cardiomiócitos foram submetidos à privação de soro na presença de MCN-d, a quantidade de eventos apoptóticos não foi diferente da condição de privação de soro (Fig. 19C, painéis superior e inferior).

Um segundo experimento, utilizando a mesma metodologia, foi realizado com o objetivo de investigar se o MC em maior concentração seria capaz de prevenir a apoptose induzida pela privação de soro. Para tanto, o experimento foi realizado utilizando-se MC obtido em normóxia, previamente concentrado em 5 vezes e diluído na proporção volumétrica 1:1 em DMEM sem soro. Esta condição experimental foi denominada MCN-c por utilizar o MCN concentrado.

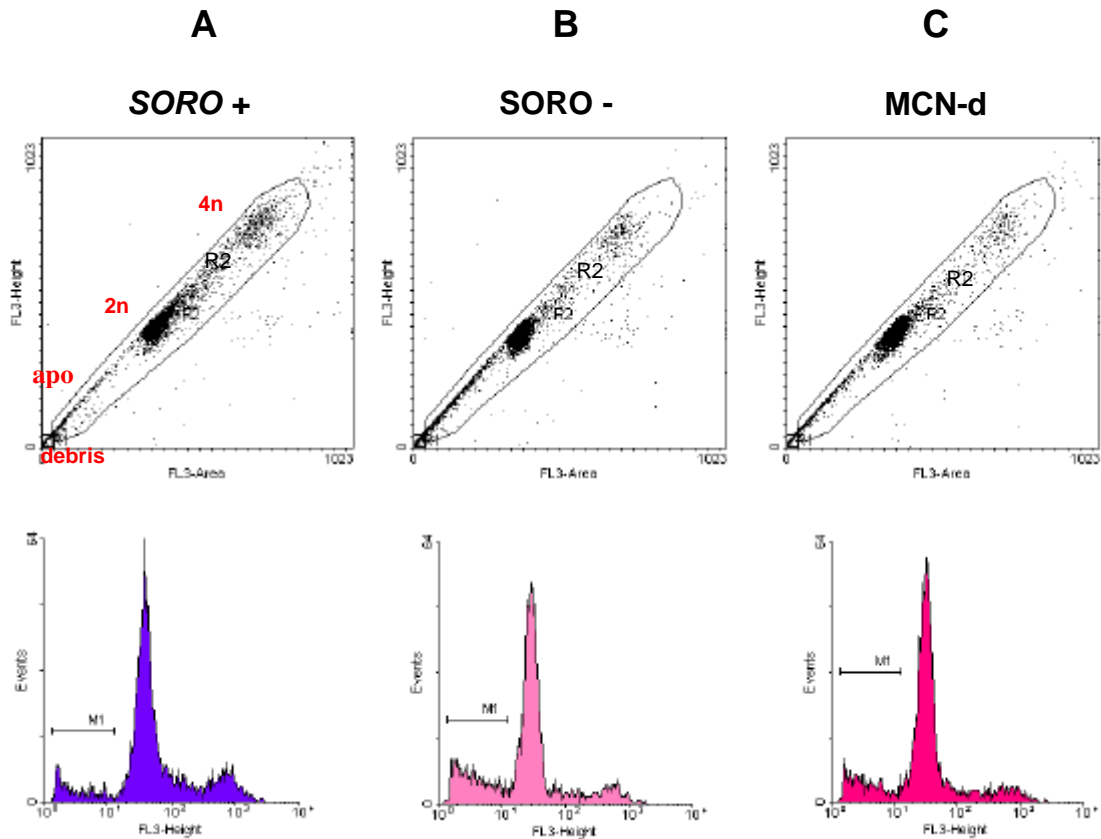


FIGURA 19 – Quantificação da apoptose, por citometria de fluxo, em cardiomiócitos permeabilizados e marcados com EtBr – MCN-d.

Os cardiomiócitos permaneceram por 24 horas nas seguintes condições experimentais representadas em colunas (**A**: SORO +, **B**: SORO – e **C**: MCN-d). Cada coluna apresenta o gráfico FL3-Area x FL3-intensidade e o respectivo histograma de intensidade de fluorescência obtido a partir da região R2. R1 representa a região de debris desconsiderados nos histogramas. **SORO +**: condição controle no qual os cardiomiócitos permaneceram em DMEM com 10% de SFB. **SORO -**: condição de indução de apoptose na qual os cardiomiócitos permaneceram em DMEM sem soro. **MCN-d**: condição na qual os cardiomiócitos foram mantidos em MC diluído na proporção 1:1 (v/v) em DMEM sem soro. M1 representa o intervalo no qual está contida a população apoptótica.

A figura 20A (painel superior) mostra que o número de eventos apoptóticos na condição controle foi pequena e semelhante àquela observada no primeiro experimento (Fig. 20A), sendo pequeno o número de eventos contidos no intervalo M1. A privação de soro, novamente, induziu aumento do número de eventos apoptóticos (Fig. 20B, painéis superior e inferior) e a presença de MCN-c foi capaz de atenuar o percentual de apoptose, como evidenciado pelo menor número de eventos contidos em M1 (Fig. 20C).

Os valores percentuais de células apoptóticas obtidas a partir de M1 para o primeiro experimento com MCN diluído são apresentados na figura 21A a qual mostra os valores percentuais de apoptose na condição controle (SORO+: $6,3 \pm 1,4\%$) e nas demais condições experimentais. Os dados mostram que o modelo de indução de apoptose foi efetivo (SORO-: $19,7 \pm 1,6\%$). Entretanto, o MC diluído preveniu a apoptose induzida pela privação de soro (MCN-d: $15 \pm 0,9\%$).

Já quando em maior concentração (Fig. 21B), o MCN-c reduziu significativamente o percentual de células em apoptose (MCN-c: $13 \pm 2\%$) provocado pela privação de soro (SORO-: $23 \pm 1,2\%$), embora não tenha promovido proteção total em nível comparável à condição controle (SORO+: $6 \pm 0,5\%$).

Portanto, o efeito cardioprotetor do MC parece estar relacionado à concentração dos fatores secretados.

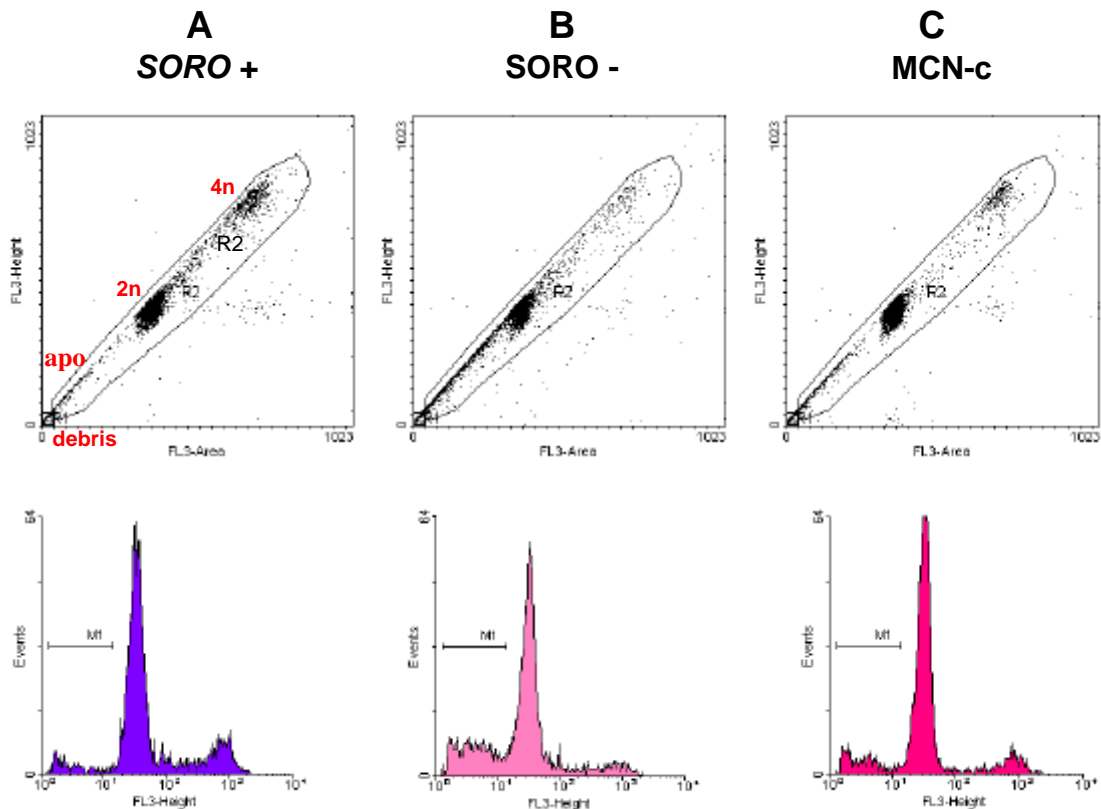


FIGURA 20 - Histogramas obtidos da quantificação de apoptose em cardiomiócitos permeabilizados e marcados com EtBr.

Quantificação da apoptose, por citometria de fluxo, em cardiomiócitos permeabilizados e marcados com EtBr. Os cardiomiócitos permaneceram por 24 horas nas seguintes condições experimentais representadas em colunas (**A**: SORO +, **B**: SORO- e **C**: MCN-c). Cada coluna apresenta o gráfico FL3-Area x FL3-intensidade e o respectivo histograma de intensidade de fluorescência obtido a partir da região R2. R1 representa a região de debris desconsiderados nos histogramas. **SORO +**: condição controle no qual os cardiomiócitos permaneceram em DMEM com 10% de SFB. **SORO -**: condição de indução de apoptose na qual os cardiomiócitos permaneceram em DMEM sem soro. **MCN-c**: condição na qual os cardiomiócitos foram mantidos em MC previamente concentrado em 5 vezes e diluído na proporção 1:1 (v/v) em DMEM sem soro. M1 representa o intervalo no qual está contida a população apoptótica.

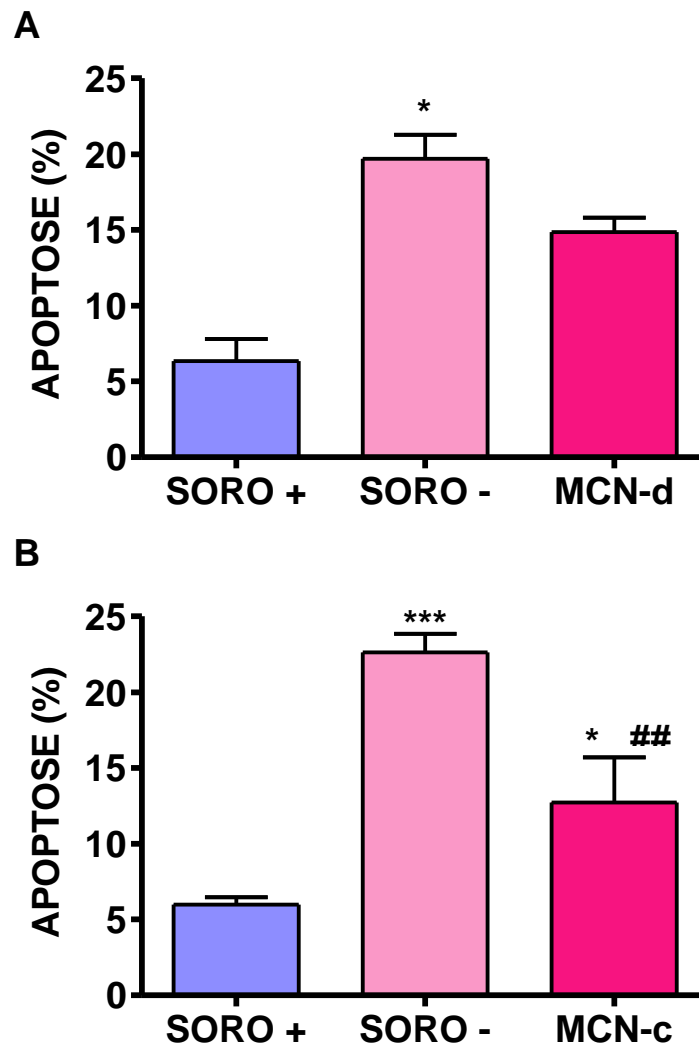


FIGURA 21 – Quantificação da apoptose (%), por citometria de fluxo, em cardiomiócitos permeabilizados e marcados com EtBr.

A: Experimento feito em duplicata com MC diluído (MCN-d) na proporção 1:1 (v/v) em DMEM sem soro. **B:** Experimento feito em triplicata com MC previamente concentrado em 5 vezes (MCN-c) e diluído no momento do experimento na proporção 1:1 (v/v) em DMEM sem soro. * $p < 0,05$ vs SORO +; *** $p < 0,001$ vs SORO +; ## $p < 0,01$ vs SORO -.

4.5.2 Quantificação da apoptose por marcação com anexina-V e PI e citometria de fluxo

A anexina-V é uma proteína que apresenta a propriedade de se ligar de forma Ca^{2+} -dependente aos resíduos de fosfatidilserina que em células vivas normalmente estão ausentes na superfície de membrana voltada para o meio extracelular. Durante a apoptose, alterações precoces começam a ocorrer na membrana celular de forma que os resíduos de fosfatidilserina voltam-se agora para o meio extracelular tornando-se passíveis de interagir com a anexina-V (Vermes e cols., 1995). O iodeto de propídeo (PI), por sua vez, é um intercalante inespecífico de DNA que não é capaz de atravessar a membrana de células viáveis. Utilizando a marcação simultânea com anexina-V e PI é possível diferenciar a população de células viáveis (anexina-V e PI negativas), população de células em apoptose precoce (anexina-V positivas e PI negativas), população de células em apoptose tardia ou necrose (anexina-V e PI positivas).

Neste grupo de experimentos, com o objetivo de melhor simular o microambiente do infarto, optou-se pelo modelo de morte celular em cardiomiócitos de ratos neonatos induzido por privação de soro associada à hipoxia durante um período de 24 horas, em estufa com atmosfera úmida contendo 1% de O_2 e 5% de CO_2 . O efeito citoprotetor do MC foi avaliado mantendo-se os cardiomiócitos na condição de indução de morte mas na presença de diferentes diluições do MC obtido previamente em condições de normóxia ou hipóxia.

4.5.2.1 Estudo do MCN obtido em normóxia – MCN

Percentual de células vivas (AnexinaV- / PI -)

O efeito citoprotetor do MCN foi avaliado utilizando-se 3 diluições diferentes feitas a partir do MCN-C (25 vezes concentrado). A figura 22 mostra o percentual de células vivas, quantificadas por citometria de fluxo, como a população negativa para a marcação com Anexina-V e PI, nas diferentes diluições do MCN. Observa-se que o percentual de células vivas é significativamente maior na condição de normóxia com soro quando comparado a condição de hipóxia sem soro ($87\pm 2\%$ vs $72\pm 4\%$ na condição de hipóxia; $p < 0,05$). Entretanto, o MCN mesmo em sua maior concentração, não foi capaz de manter a viabilidade celular que se apresentou baixa e não diferente da condição de hipóxia (MCN1x: $81\pm 6\%$; MCN5x: $83\pm 3\%$; MCN25x: $76\pm 12\%$).

Percentual de células em apoptose precoce (AnexinaV+ / PI -)

A figura 23 mostra o percentual de células em apoptose precoce quantificadas por citometria de fluxo como a população positiva para marcação com Anexina-V e negativa para PI. Observa-se que na condição controle ideal de normóxia e soro, existe um percentual basal de morte celular por apoptose precoce. Porém, este percentual de morte é significativamente menor na condição de normóxia que na condição de hipóxia sem soro ($5\pm 1\%$ vs $17\pm 4\%$ na condição de hipóxia; $p < 0,05$). Observa-se que o MCN, independente da concentração utilizada, não foi capaz de limitar a ocorrência de apoptose em cardiomiócitos submetidos a hipóxia e privação de soro (MCN1X: $13\pm 6\%$; MCN5X: $12\pm 3\%$; MCN25x: $14\pm 7\%$).

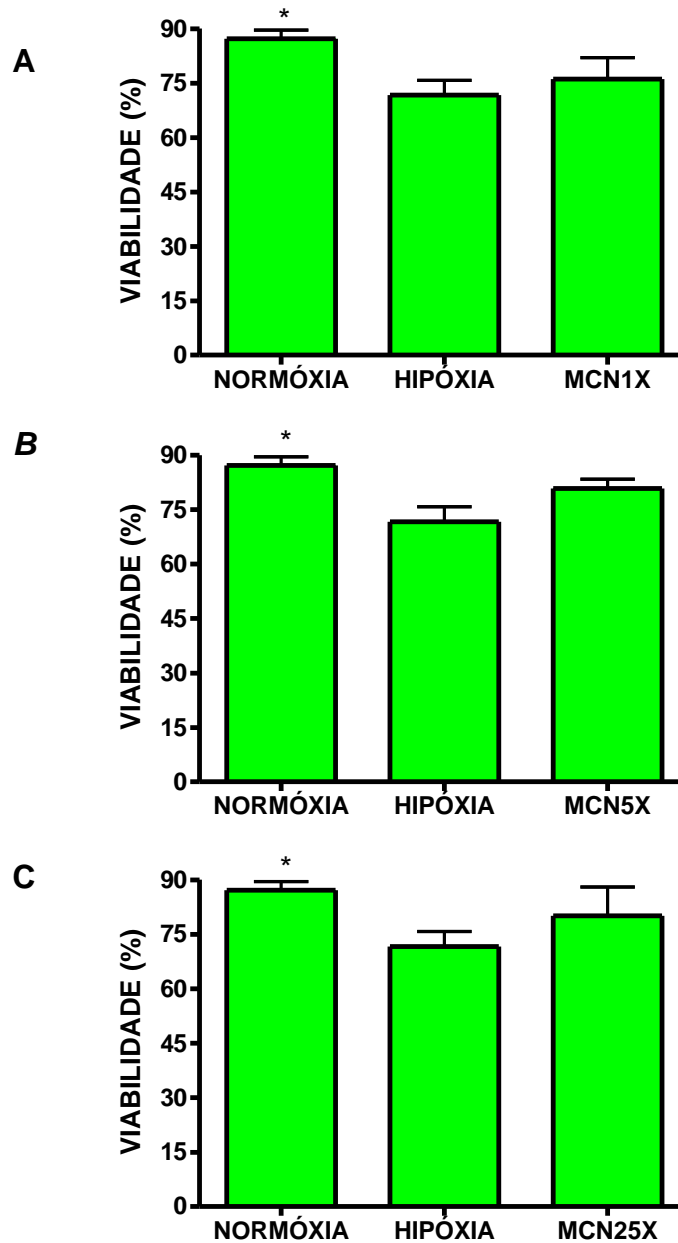


FIGURA 22 – Viabilidade celular nas diferentes condições experimentais, quantificadas por citometria de fluxo como a população negativa para marcação com Anexina-V e PI - Estudo do MCN

(A) MCN1X: MC obtido em normóxia e diluído a partir da solução 25 vezes concentrada até a concentração final de uma vez. **(B)** MCN5X: MC obtido em normóxia e diluído a partir da solução 25 vezes concentrada até a concentração final de 5 vezes concentrado. **(c)** MCN25X: MC obtido em normóxia e concentrado em 25 vezes. * $p < 0,05$ versus hipóxia.

Percentual de células em apoptose tardia e necrose (AnexinaV+ / PI +)

A figura 24 mostra o percentual de células em apoptose tardia ou necrose quantificadas por citometria de fluxo como a população positiva para marcação com Anexina-V e PI. Observa-se que na condição controle ideal de normóxia com soro, existe também um percentual de células que se encontram em fase avançada de apoptose ou que morreram por necrose. Este percentual de morte é significativamente menor na condição de normóxia que na condição de hipóxia sem soro ($4\pm 1\%$ vs $9\pm 2\%$ na condição de hipóxia; $p < 0,05$). Observa-se que o MCN na condição mais diluída (MCN1X: $5\pm 1\%$) tende a reduzir o número de células em apoptose tardia, embora não alcance significância. Já o MCN concentrado em cinco vezes alcançou significância estatística, o que permite afirmar que o MCN concentrado em 5 vezes foi capaz de limitar o número de células em apoptose tardia ou necrose ($4\pm 1\%$ vs $9\pm 2\%$ na condição de hipóxia; $p < 0,05$).

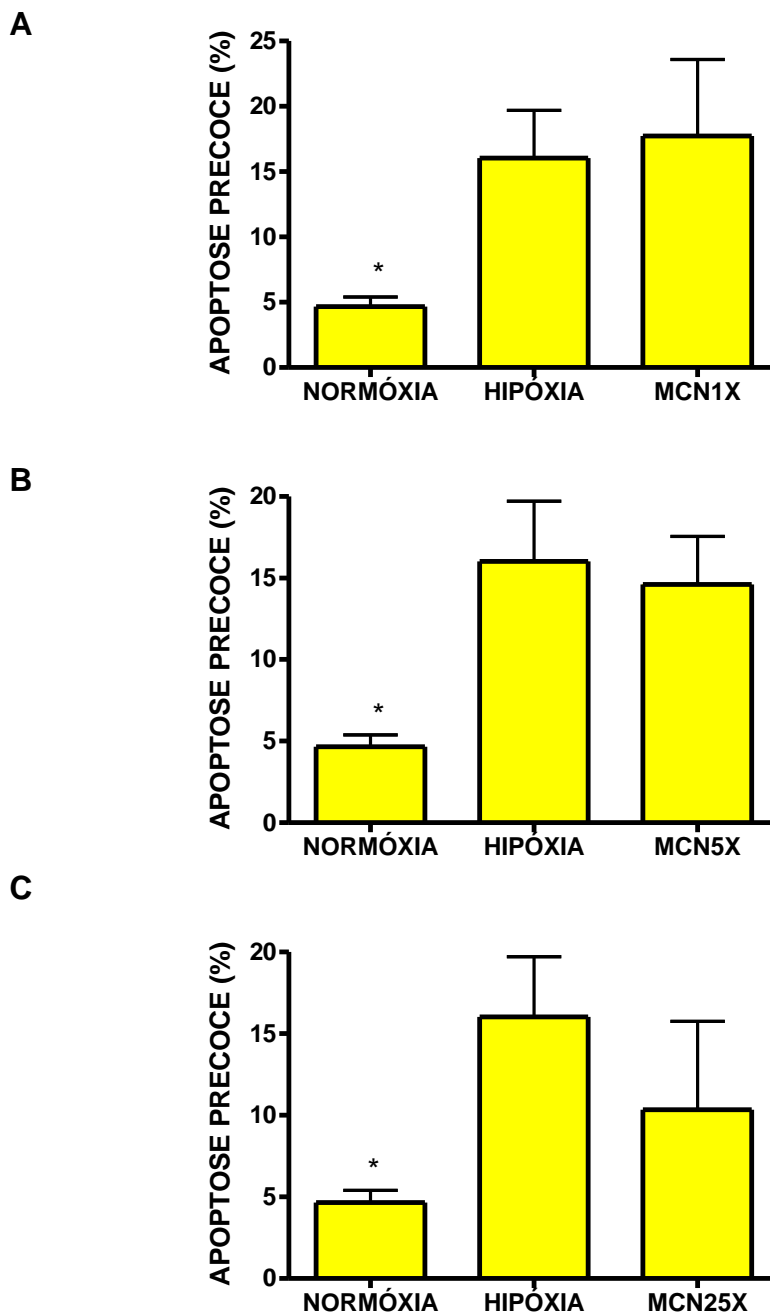


FIGURA 23 – Percentual de células em apoptose precoce quantificadas por citometria de fluxo e marcação por anexina-V e PI - Estudo do MCN

(A) MCN1X: MC obtido em normóxia e diluído a partir da solução 25 vezes concentrada até a concentração final de uma vez. **(B)** MCN5X: MC obtido em normóxia e diluído a partir da solução 25 vezes concentrada até a concentração final de 5 vezes concentrado. **(c)** MCN25X: MC obtido em normóxia e concentrado em 25 vezes. * $p < 0,05$ versus hipóxia.

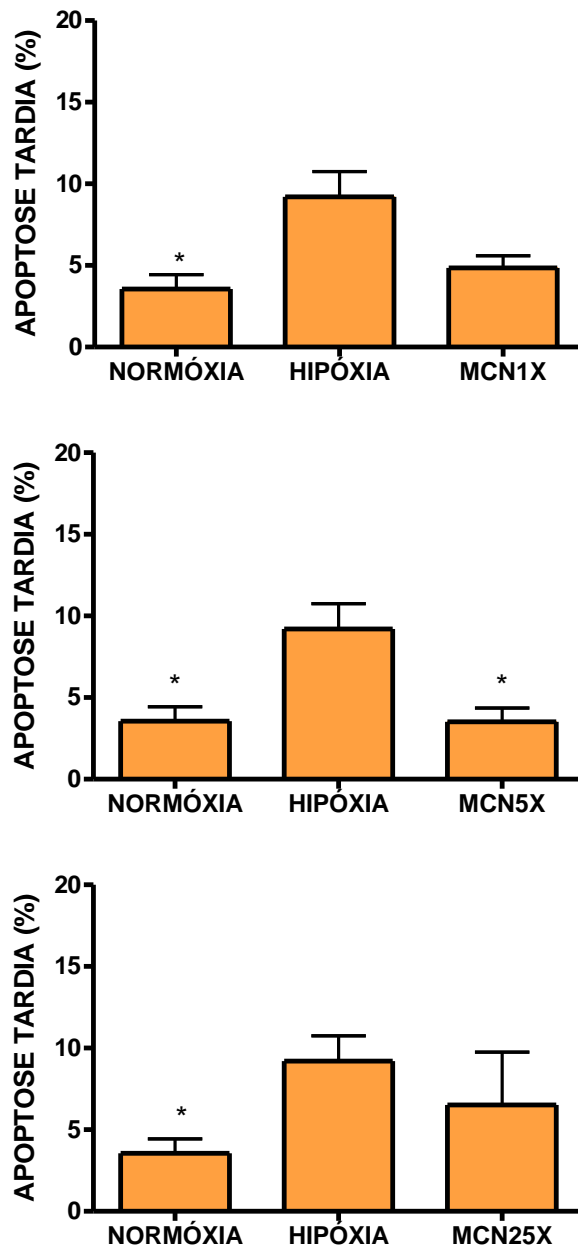


FIGURA 24 – Percentual de células em apoptose tardia quantificadas por citometria de fluxo e marcação por anexina-V e PI - Estudo do MCN
(A) MCN1X: MC obtido em normóxia e diluído a partir da solução 25 vezes concentrada até a concentração final de uma vez. **(B)** MCN5X: MC obtido em normóxia e diluído a partir da solução 25 vezes concentrada até a concentração final de 5 vezes concentrado. **(c)** MCN25X: MC obtido em normóxia e concentrado em 25 vezes. * $p < 0,05$ versus hipóxia.

4.5.2.1 Estudo do MC obtido em hipóxia – MCH

Percentual de células vivas (AnexinaV- / PI -)

O efeito citoprotetor do MCH foi avaliado utilizando-se, assim como para o MCN, 3 diluições diferentes feitas a partir do MCH-C (25 vezes concentrado). A figura 25 mostra o percentual de células vivas (Anexina-V e PI negativo), nas diferentes diluições do MCH e nas condições de normóxia e hipóxia. Embora exista uma tendência do MCH em preservar a viabilidade celular em condição de hipóxia, o percentual de células vivas nas diferentes concentrações não foi diferente quando comparado à condição de hipóxia sem soro (MCH1X: $84\pm 2\%$; MCH5x: $84\pm 4\%$; MCH25x: $85\pm 3\%$ versus $72\pm 4\%$ da condição hipóxia).

Percentual de células em apoptose precoce (AnexinaV+ / PI -)

A figura 26 mostra o percentual de células em apoptose precoce quantificadas por citometria de fluxo. Similar ao observado para o MCN, independente da concentração de MCH utilizada, o percentual de cardiomiócitos em apoptose precoce não foi diferente da condição de indução de morte (MCH1X: $8\pm 0,1\%$; MCH5X: $9\pm 1\%$; MCH25X: $8\pm 1\%$ versus $17\pm 4\%$), embora exista uma tendência.

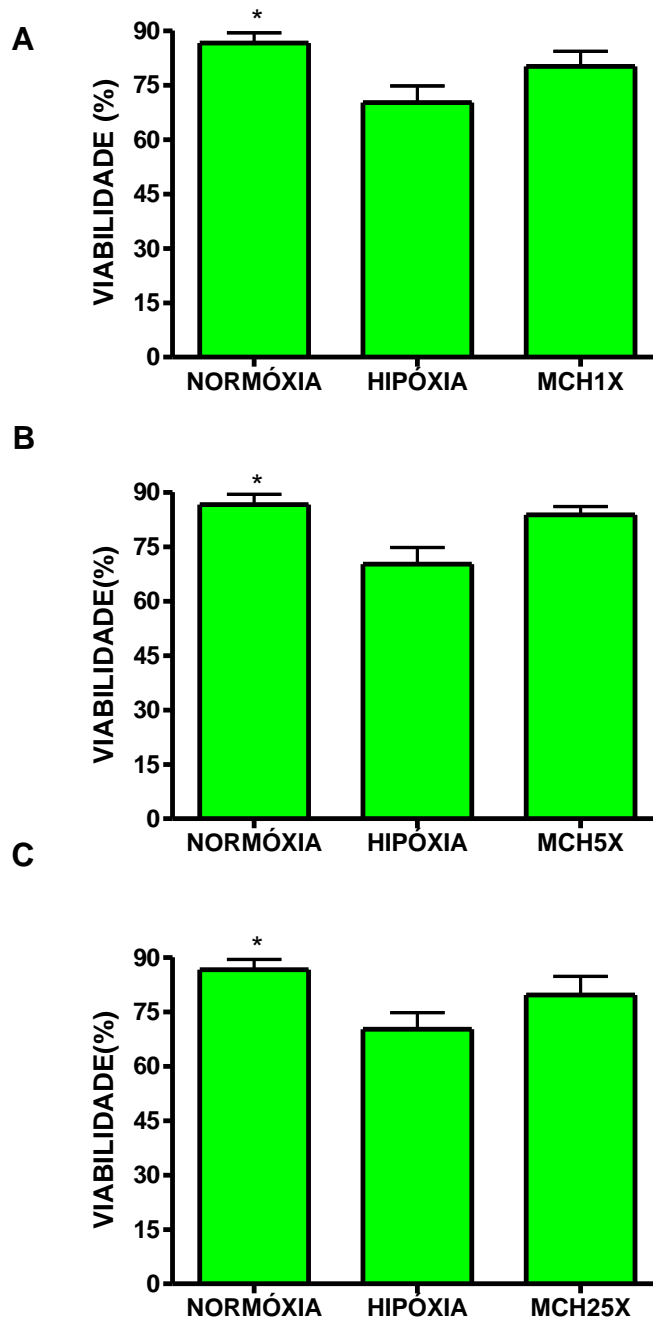


FIGURA 25 – Viabilidade celular nas diferentes condições experimentais, quantificadas por citometria de fluxo como a população negativa para marcação com Anexina-V e PI. - Estudo do MCH

(A) MCH1X: MC obtido em hipóxia e diluído a partir da solução 25 vezes concentrada até a concentração final de uma vez. **(B)** MCH5X: MC obtido em hipóxia e diluído a partir da solução 25 vezes concentrada até a concentração final de 5 vezes concentrado. **(c)** MCH25X: MC obtido em hipóxia e concentrado em 25 vezes. * $p < 0,05$ versus hipóxia.

Percentual de células em apoptose tardia e necrose (AnexinaV+ / PI +)

A figura 27 mostra o percentual de células em apoptose tardia ou necrose quantificadas por citometria de fluxo. O percentual de morte é significativamente menor na condição de normóxia que na condição de hipóxia sem soro ($4\pm 1\%$ vs $9\pm 2\%$ na condição de hipóxia; $p < 0,05$). Observa-se que o MCH na condição mais diluída (MCH1X: $4\pm 0,88\%$) tende a reduzir o número de células em apoptose tardia, embora não alcance significância. Já o MCH concentrado em cinco e 25 vezes alcançou significância estatística o que permite afirmar que o MCH concentrado em 5 e 25 vezes foi capaz de limitar o número de células em apoptose tardia ou necrose (MCH5X: $5\pm 1\%$; MCH25X: $4\pm 1\%$ vs $9\pm 2\%$ na condição de hipóxia; $p < 0,05$).

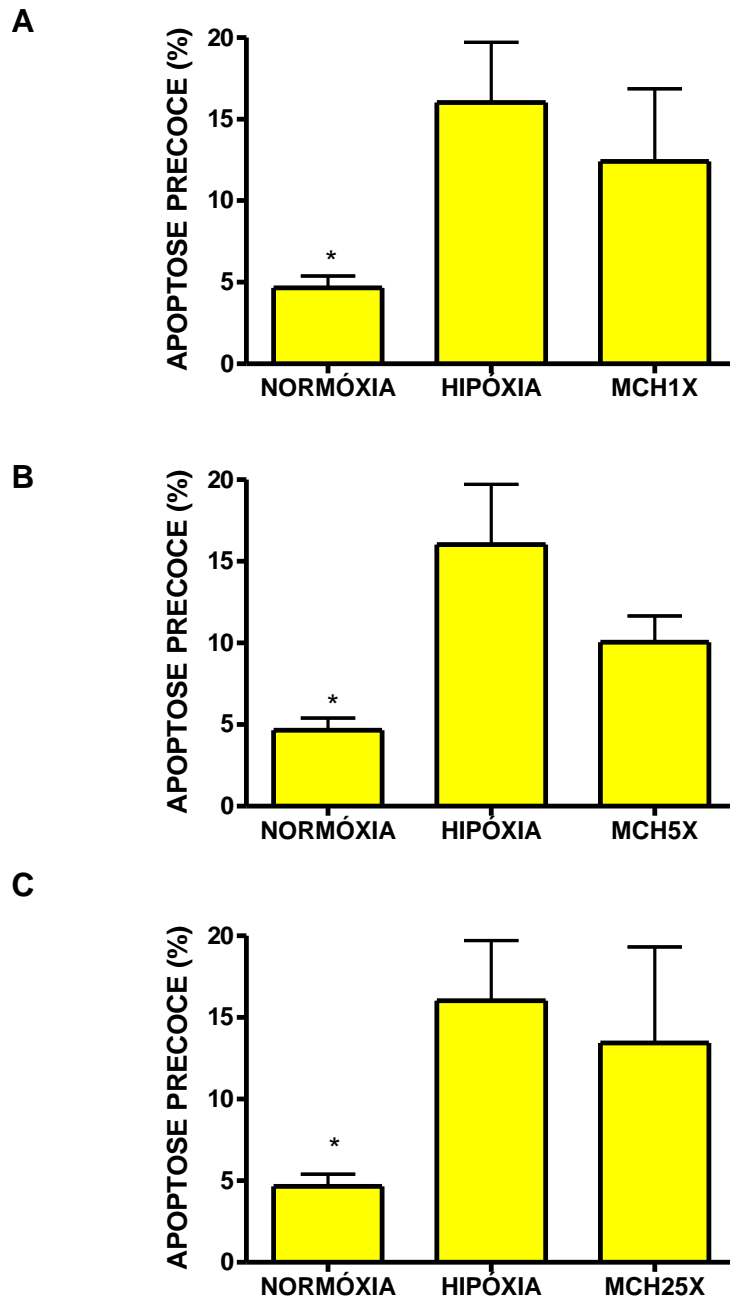


FIGURA 26 – Percentual de células em apoptose precoce quantificadas por citometria de fluxo e marcação por anexina-V e PI - Estudo do MCH

(A) MCH1X: MC obtido em hipóxia e diluído a partir da solução 25 vezes concentrada até a concentração final de uma vez. **(B)** MCH5X: MC obtido em hipóxia e diluído a partir da solução 25 vezes concentrada até a concentração final de 5 vezes concentrado. **(c)** MCH25X: MC obtido em hipóxia e concentrado em 25 vezes. * $p < 0,05$ versus hipóxia.

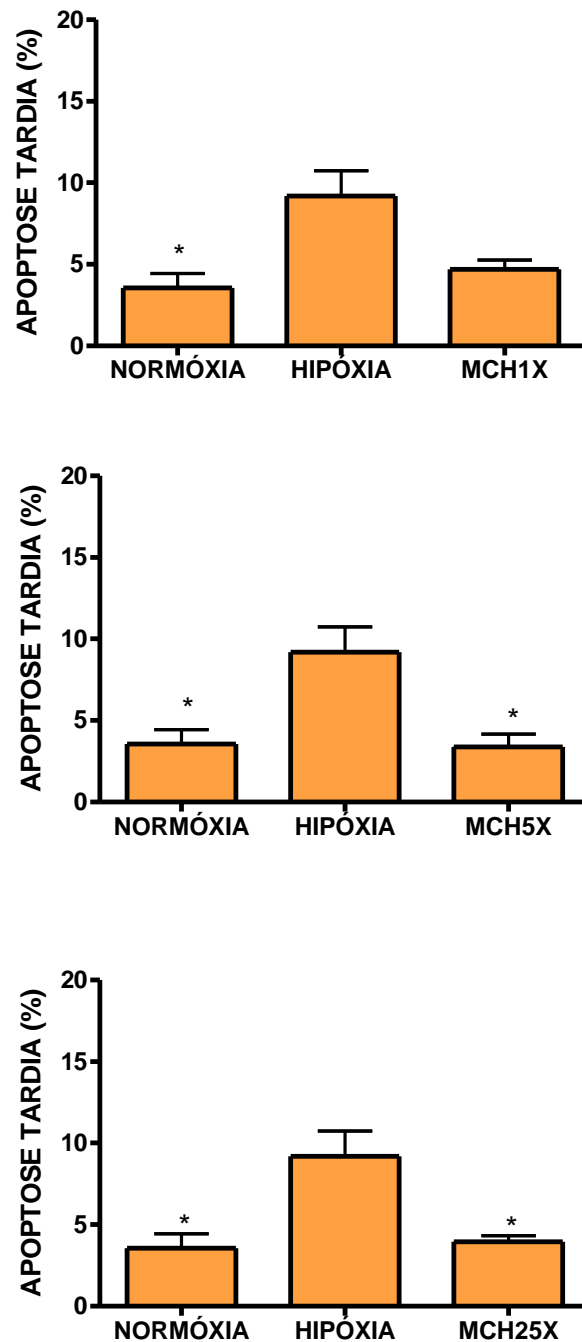


FIGURA 27 – Percentual de células em apoptose tardia quantificadas por citometria de fluxo e marcação por anexina-V e PI - Estudo do MCH
 Percentual de células em apoptose tardia ou necrose, nas diferentes condições experimentais, quantificadas por citometria de fluxo como a população positiva para marcação com Anexina-V e PI. **(A)** MCH1X: MC obtido em hipóxia e diluído a partir da solução 25 vezes concentrada até a concentração final de uma vez. **(B)** MCH5X: MC obtido em hipóxia e diluído a partir da solução 25 vezes concentrada até a concentração final de 5 vezes concentrado. **(c)** MCN25X: MC obtido em hipóxia e concentrado em 25 vezes. * $p < 0,05$ versus hipóxia.

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O presente estudo teve por objetivo investigar se os fatores secretados *in vitro* pelas MSC seriam capaz de promover melhora funcional quando injetados por via intramiocárdica em modelo de infarto do miocárdio em ratos. Investigações focadas nos fatores secretados pelas MSC, além da célula em si, tornaram-se pertinentes quando estudos utilizando injeção intramiocárdica de células da medula óssea em modelo murino de infarto mostraram que a esperada diferenciação das células da medula em cardiomiócitos parecia não ocorrer, ou acontecer em frequência diminuta (Murry e cols., 2004; Nygren e cols., 2004). Murry e cols. (2004) fizeram um estudo detalhado utilizando técnicas genéticas com genes repórteres para estudar a ocorrência de diferenciação das células Lin⁻/c-kit⁺ (população de células progenitoras livre de marcadores de linhagem hematopoiética) administradas por via intramiocárdica em modelo de infarto em camundongos. Neste estudo, a população Lin⁻/c-kit⁺ foi obtida de camundongos transgênicos, cuja expressão de proteínas cardíacas específicas seria reportada pela co-expressão da proteína nuclear β-galactosidade. Após 1 a 4 semanas da injeção intramiocárdica nenhuma evidência de diferenciação foi observada, mesmo quando outra população da medula, Lin⁻/c-kit⁺/Sca-1⁺, dita enriquecida em células progenitoras multipotentes, foi utilizada.

Em adição, outros estudos sugerem que a diferenciação de células derivadas da medula óssea em cardiomiócitos e outros tipos celulares parece não ocorrer e que o processo de fusão celular das células injetadas com o tecido receptor, quando não comprovado por análise genética detalhada, poderia ser a explicação para a aparente diferenciação (Terada e cols., 2002; Nygren e cols., 2004;). A fusão celular e o híbrido resultante poderiam contribuir para o quadro de melhora funcional após a

terapia celular com células da medula óssea, seja por reprogramação da célula do receptor a um estado de pluripotência ou multipotência ou mesmo por influenciar de forma positiva a sobrevivência e função das células do tecido receptor (Ying e cols., 2002; Vassilopoulos e cols., 2003; Alvarez-Dolado e cols., 2003). Entretanto, vale ressaltar que este evento ocorre em uma frequência muito baixa, fato que mais uma vez, é insuficiente para sozinho explicar a melhora funcional observada após terapia celular com células da medula óssea.

A maioria dos estudos em animais experimentais mostra melhora funcional cardíaca após terapia com células derivadas da medula óssea (Orlic e cols., 2001a; Boomsma e cols., 2007; Hu e cols., 2007), fato que têm incentivado a realização de estudos clínicos ainda que o mecanismo de melhora não tenha sido esclarecido. Especificamente em relação à terapia celular utilizando a população multipotente mesenquimal estromal de medula óssea (MSC), os resultados na literatura mostram melhora da função cardíaca (Shake e cols., 2002; Boomsma e cols., 2007; Hu e cols., 2007) embora os mecanismos responsáveis por essa melhora ainda não tenham sido elucidados. 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 MSC 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 observada após terapia celular com MSC. Estudos mais recentes propõem que o efeito benéfico da terapia celular utilizando MSC 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., 2006) capazes de proteger o tecido do dano isquêmico, não sendo a incorporação destas células ao tecido um pré-requisito para o efeito final da melhora na função. A contribuição do mecanismo parácrino para a melhora funcional após infarto e terapia celular foi sugerida por Mangi e cols. (2003) que mostraram melhora da função cardíaca 72 horas após a injeção de MSC. Devido ao fato da melhora funcional ter sido observada em um curto intervalo de tempo, foi sugerido por esses autores que fatores citoprotetores liberados pelas células seriam os responsáveis por atenuar a perda de miócitos e portanto promover melhora da função. Esse mesmo grupo mostrou, posteriormente, que somente a injeção do meio condicionado livre das MSC era suficiente para promover similar melhora de função.

Assim, considerando os estudos que sugeriam envolvimento da via parácrina na melhora funcional após terapia celular, a importância desta via foi investigada no presente estudo utilizando MC obtido de cultura de MSC de terceira passagem derivadas da medula óssea. O isolamento dessas células pela propriedade de aderência ao frasco de cultura e a expansão das MSC até a terceira passagem consiste em uma forma simples de excluir da cultura a população de células hematopoiéticas diferenciadas. A *Sociedade Internacional de Terapia Celular* (ISTC), se pronunciou recentemente incentivando os pesquisadores a estabelecerem critérios mínimos para definição das MSC (Dominici e cols., 2006). Os critérios mínimos sugeridos são capacidade de aderência ao frasco de cultura, expressão de alguns antígenos de superfície específicos e capacidade de diferenciação *in vitro*, embora estes critérios estejam mais bem definidos para MSC humanas. Em nosso laboratório, a caracterização dessas células por imunofenotipagem e citometria de fluxo tem mostrado que após terceira passagem essas células são positivas para

CD90 (marcador de célula-tronco) e negativas para CD45 (marcador de leucócitos), CD34 (marcador de progenitoras primitivas hematopoiéticas e endoteliais) e CD11b (marcador de monócitos e macrófagos) (Carvalho e cols., 2008). Em adição, protocolos de diferenciação com meios definidos têm sido utilizados com o objetivo de atender ao terceiro critério sugerido pela ISTC. Logo, o MC foi coletado de cultura de MSC já bem estabelecida no laboratório e que recentemente vem sendo caracterizada seguindo as recomendações da ISTC.

A primeira evidência de efeito biológico do MC foi visto em um estudo realizado no laboratório de Neuroquímica desse mesmo Instituto no qual o MC foi capaz de impedir a morte de neurônios simpáticos de embrião de pinto quando colocados em cultura na ausência de fator trófico. O efeito de sobrevivência e neuritogênese foi semelhante ao obtido com a adição do fator de crescimento neuronal à cultura, NGF (dados não publicados). Apesar do efeito citoprotetor ter sido observado em uma população celular diferente e respeitado o fato de que o mesmo efeito poderia não ser semelhante sobre células do coração, ainda assim esta observação *in vitro*, incentivou o estudo *in vivo* utilizando a injeção intramiocárdica de MC em modelo de infarto agudo do miocárdio. Além disso, como já mencionado anteriormente, estudos já sugeriam que fatores solúveis liberados pelas MSC poderiam ter efeito protetor contra o dano isquêmico (Kinnaird e cols., 2004a,b) e por isso o presente estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar se fatores liberados *in vitro* pelas MSC teriam efeito cardioprotetor *in vivo* utilizando modelo de infarto agudo do miocárdio, o que poderia sugerir envolvimento da via parácrina na melhora funcional após terapia celular utilizando MSC.

O MC foi obtido, em um primeiro momento, submetendo as MSC à condição sem soro em normóxia por 72 horas. A retirada do soro do meio de cultura exclui a

possibilidade dos efeitos observados serem oriundos de fatores de crescimento séricos e evita respostas imunológicas indesejáveis quando feita administração *in vivo*.

O tempo de condicionamento de 72 horas escolhido foi baseado em dados da literatura que mostram efeito protetor contra o dano isquêmico quando MC, obtido igualmente com 72 horas de condicionamento, foi injetado no local da lesão (Kinnaird e cols., 2004a,b). Em adição, nos experimentos realizados com neurônios simpáticos, observou-se que o tempo de condicionamento foi fundamental para o efeito de sobrevivência observado visto, que meios condicionados por 24 e 48 horas foram incapazes ou menos efetivos, respectivamente, em impedir o processo de morte neuronal induzida pela ausência de fator trófico. É provável que tempos maiores de condicionamento sejam importantes para promover maior concentração dos fatores citoprotetores no meio de cultura. Além disso, muitos fatores são temporalmente expressos em função da expressão prévia de outros. A relação entre o número de células e volume de meio condicionado obtido também provavelmente influencia a capacidade citoprotetora do meio condicionado.

No presente estudo, a injeção intramiocárdica única de meio condicionado obtido em condições de normóxia foi capaz de preservar os valores de FEA e IQRS no grupo MCN e MCN-C, o que poderia sugerir um efeito atenuante do MC sobre a disfunção cardíaca que tende a ser maior no tempo final de 21 dias no grupo que recebeu apenas meio de cultura não condicionado. Entretanto, os valores de FEA e IQRS dos grupos MCN e MCN-C não foram diferentes daqueles apresentados pelo grupo DMEM no tempo de 21 dias. Em adição, nenhum dos parâmetros obtidos a partir da pressão ventricular esquerda e a capacidade máxima ao exercício foram diferentes nos animais tratados com MCN e MCN-C, quando comparados ao grupo

DMEM. Logo, conclui-se que o MC obtido em condição de normóxia não foi capaz de promover melhora da função cardíaca, quando comparado ao grupo infartado controle, mesmo quando em maior concentração. Embora alguns estudos mostrem que o meio condicionado de MSC obtido em condição de normóxia foi eficaz em proteger diferentes tipos de tecido frente a diferentes formas de lesão, vale ressaltar aqui as diferenças na metodologia e modelo de injúria tecidual, as quais poderiam estar contribuindo para a diferença nos resultados. Kinnaird e cols., (2004b) mostraram que o MC de MSC, condicionado por 72 horas em normóxia, foi capaz de promover melhora na perfusão tecidual e no padrão de marcha em modelo de isquemia de pata em camundongos, mesmo utilizando o MC apenas 2 vezes concentrado. Entretanto, vale ressaltar que, no estudo realizado por estes autores, devido a maior acessibilidade ao sítio da lesão, injeções repetidas de meio condicionado foram realizadas no local e ao redor da lesão, fato que pode ter contribuído para a melhora funcional observada ao final do protocolo. Parekkadan e cols. (2007), mostraram que o MC de MSC obtido em condição de normóxia e utilizando tempo de condicionamento de somente 24 horas promoveu aumento da sobrevivência em ratos com falência hepática fulminante. Neste estudo, o efeito de sobrevivência foi relacionado à atenuação da resposta inflamatória, via efeito imunomodulador e redução no número de hepatócitos em apoptose. Ainda neste mesmo estudo, a sobrevivência foi relacionada positivamente com o número de células utilizadas para condicionamento do meio. Em contraste com os resultados positivos que relatam efeito do meio condicionado obtido em condição de normóxia, Gnechi e cols. (2005) mostraram que o meio condicionado obtido em condição de normóxia não foi capaz de reduzir a apoptose em cardiomiócitos *in vitro* submetidos à hipóxia e privação de soro. Entretanto vale ressaltar que se trata de um outro tipo

celular (cardiomiócitos) a ser resgatado, onde as exigências metabólicas e sinais de sobrevivência podem diferir consideravelmente daquelas do músculo esquelético e do tecido hepático. Em adição, o tempo de condicionamento utilizado neste estudo foi de somente 12 horas o que poderia também explicar a ausência de efeito do meio condicionado obtido em normóxia.

No presente estudo, apesar dos resultados *in vivo* não mostrarem diferença do grupo MCN e MCN-C em relação ao grupo controle DMEM, os experimentos *in vitro* mostraram que o meio condicionado mesmo obtido em normóxia, foi capaz de reduzir o número de células em apoptose tardia e necrose, fato que mostra que essas células mesmo em condições de normóxia, secretam fatores citoprotetores. Logo, fatores como tempo de condicionamento e número de células parecem ser importantes para a observação do efeito citoprotetor. Devido ao fato de não termos utilizado tempos e densidade celular diferentes para condicionamento do meio, não se pode descartar a possibilidade de que maiores densidades celulares e/ou combinação com tempos ótimos de condicionamento promoveriam melhora funcional cardíaca *in vivo*, e assim sugerir a via parácrina, mesmo com MSC em condições de normóxia, como mecanismo relacionado à melhora funcional.

Apesar do meio condicionado obtido em condição de normóxia não ter promovido melhora funcional *in vivo*, o envolvimento do mecanismo parácrino ainda assim não poderia ser descartado, visto que o microambiente de normóxia *in vitro* para obtenção do MC poderia não simular de forma adequada aquele encontrado no tecido cardíaco isquêmico no qual as MSC são normalmente injetadas. Assim, para melhor mimetizar o microambiente isquêmico, e melhor testar a hipótese do envolvimento do mecanismo parácrino, o protocolo experimental II *in vivo* foi realizado utilizando-se meio condicionado obtido em condição de hipóxia. É sabido

que a condição de hipóxia é capaz de induzir supra-regulação de vários fatores relacionados à angiogênese e sobrevivência, e mesmo levar a expressão de fatores não normalmente expressos em condição de normóxia que eventualmente teriam efeito citoprotetor (Kinnaird e cols., 2004b; Gneccchi e cols., 2005).

Os resultados mostram que a injeção intramiocárdica única de MC obtido em condição de hipóxia (MCH-C) foi capaz de promover melhora na contratilidade e relaxamento cardíaco quando comparado ao grupo controle DMEM. A PDF mostrou-se significativamente reduzida nos animais tratados com MCH-C. A FEA, embora não diferente dos valores apresentados pelo grupo DMEM no tempo de 21 dias, foi mantida constante quando comparada no mesmo grupo com o tempo de 3 horas o que pode sugerir que o MCH-C tenha atuado no sentido de atenuar a disfunção que normalmente se acentua no final de 21 dias. O IQRS, sofreu atenuação adicional com 21 dias no grupo DMEM enquanto o seu valor foi conservado no grupo tratado com MCH-C. Além disso, o IQRS apresentou valores de maior magnitude para o grupo MCH-C quando comparado ao grupo DMEM no tempo de 21 dias, o que sugere que o MCH-C foi capaz de preservar massa ventricular passível de despolarização. Esses resultados destoam daqueles apresentados por Gneccchi e cols., (2006) que mostraram que a injeção única de MC obtido em condição de hipóxia, só foi capaz de promover melhora na função cardíaca quando o MC utilizado foi obtido de MSC modificadas geneticamente para supra-expressarem Akt. A Akt é uma proteína envolvida com a fosforilação e ativação de proteínas anti-apoptóticas e sua expressão aumentada poderia garantir melhor sobrevivência da MSC durante a condição de obtenção do MC em hipóxia. Além disso, e talvez o fato mais relevante, seja que a supra-expressão de Akt estaria relacionada com supra-regulação de genes que codificariam a expressão de fatores tais como b-FGF, VEGF

e HGF já conhecidamente liberados pelas MSC e descritos como fatores angiogênicos e anti-apoptóticos. Mais uma vez, talvez o tempo de condicionamento de 12 horas, utilizado por esses autores, não tenha sido suficiente para mostrar melhora funcional após injeção intramiocárdica de MC obtido de MSC não modificadas geneticamente. Ou talvez, a tendência à melhora funcional observada após injeção intramiocárdica de MC de MSC não modificadas, pudesse ser mais proeminente se os autores tivessem utilizado tempos superiores à 72 horas para avaliar a função cardíaca. Além disso, vale ressaltar que os resultados obtidos no presente estudo utilizando MCH-C de MSC não modificadas não podem ser diretamente comparados com os de Gnechi e cols. (2006) uma vez que o tempo de avaliação funcional pós lesão bem como a técnica de avaliação (coração isolado naquele enquanto que no presente estudo foi feito registro de PVE em ratos acordados e avaliação por ECO) foram extremamente distintas nesses dois estudos. Além disso, melhora funcional utilizando MSCs não modificadas geneticamente é reportada em diversos trabalhos na literatura o que mostra que os fatores secretados por essas células são eficazes, portanto a modificação genética parece ser um requisito de otimização e não um pré-requisito necessário para que a via parácrina se mostre efetiva.

A melhora na contratilidade (aumento de 15%) e relaxamento cardíacos (melhora de 12%) observada no grupo MCH-C em relação ao grupo DMEM, embora significativa, se mostrou discreta. Se o percentual de melhora observado no presente estudo for comparado aos valores reportados na literatura em resposta à terapia com MSC, nota-se que a injeção de células promove, em geral, melhora de maior magnitude. Hu e cols., (2007) mostraram que a injeção de 2×10^6 células injetadas em ratos 1 hora após IM foi capaz de promover aumento de aproximadamente 30%

na fração de encurtamento, quando os animais foram avaliados 4 semanas após o transplante. Hou e cols., (2007), utilizando a mesma quantidade de MSC, porém de origem humana e injetadas 2 semanas após IM, mostraram um aumento discreto de apenas 5% na fração de encurtamento. Boomsma e cols. (2007) mesmo utilizando uma menor quantidade de MSC (5×10^5 células) injetadas 1 hora após IM, por via intravenosa e avaliando a função cardíaca por cateterismo de ventrículo esquerdo, mostraram que a contratilidade e relaxamento cardíacos se apresentaram 40% e 60%, respectivamente, maiores no grupo tratado com MSC que no grupo infartado controle. No presente estudo, 100 μ L de MC referente ao condicionamento de 2×10^5 células quando injetados por via intramiocárdica, promoveu uma discreta melhora funcional. Esses resultados podem ser explicados pelo fato de uma única injeção intramiocárdica não simular de forma ideal a provável secreção contínua de fatores que estaria ocorrendo nos experimentos onde as células são injetadas. É possível que essa secreção contínua, ocorrendo durante uma janela temporal ideal, seja mais eficaz em promover cardioproteção, e por isso a função cardíaca estaria melhor preservada nos animais tratados com MSC (Hu e cols., 2007) que nos animais tratados com MC somente.

Considerando a possibilidade da existência de um tempo ótimo para que a cardioproteção fosse alcançada, o presente estudo avaliou se a injeção de MCH-C seria capaz de promover melhora da função em modelo de infarto cicatrizado em ratos. Um estudo em nosso laboratório desenvolvido por Olivares e cols. (2003) havia mostrado que a injeção intramiocárdica de MSC ($1-3 \times 10^5$) promovia aumento de aproximadamente 45% na fração de encurtamento nos ratos infartados tratados quando comparados ao grupo controle. Entretanto, os resultados do presente estudo mostram que a injeção intramiocárdica de MCH-C, quando feita 4 semanas após o

infarto, falhou em promover melhora da função cardíaca. Este resultado pode ser explicado pelo fato das substâncias secretadas por essas células incluindo os fatores anti-apoptóticos (Gnecchi e cols., 2005; Xu e cols., 2006) estarem sendo administradas tardiamente. Sabe-se que o pico de apoptose após IM ocorre por volta de 18 horas após o infarto (Bialik e cols., 1997). Logo, a injeção intramiocárdica de MCH-C quando realizada em infarto crônico já estaria excedendo o momento ótimo para que o efeito cardioprotetor via ação anti-apoptótica fosse manifestado.

Essa diferença nos resultados observados quando MCH-C foi administrado agudamente e cronicamente, em adição aos dados na literatura que relatam a ação cardioprotetora via ação anti-apoptótica, incentivaram a realização dos experimentos *in vitro*, que buscaram responder se a via parácrina estaria promovendo melhora da função cardíaca por efeito anti-apoptótico. Os ensaios preliminares realizados *in vitro* utilizando a técnica de marcação com EtBr em cardiomiócitos permeabilizados e quantificação da população hipodiplóide por citometria de fluxo já apontaram para um efeito anti-apoptótico do MC obtido em condições de normóxia. Em seguida, optou-se por dar seguimento aos experimentos *in vitro* utilizando a técnica de marcação com anexina-V e PI, que permite a discriminação entre a população viável, em apoptose precoce e em apoptose tardia ou necrose. Os resultados mostraram que o MC obtido em condições de normóxia (MCN5X) e hipóxia (MCH5X e MCH25X) reduziram o percentual de células em apoptose tardia e necrose, quando comparado a condição de hipóxia controle na presença de DMEM sem soro, e igualmente submetido à ultrafiltração. Nas condições em que o MCH-C esteve presente, foi possível observar batimentos espontâneos em 100% dos experimentos independentes realizados, enquanto que para o MCN, somente em 1 experimento, (dentre o total de 3 experimentos independentes) os batimentos espontâneos foram

observados. Este resultado sugere que os fatores liberados *in vitro* pelas MSC conferem aos cardiomiócitos maior resistência à hipóxia. Ainda que a metodologia utilizada no presente estudo não envolva a caracterização das substâncias mediadoras bem como as vias moleculares envolvidas com o efeito antiapoptótico, estudos sugerem que moléculas liberadas *in vitro* pelas MSC, tais como VEGF, FGF, IGF e SDF-1 participam na supra-regulação de proteínas anti-apoptóticas como Akt e Bcl-2 em cardiomiócitos submetidos à hipóxia (Wang e cols., 1998; Matsui e cols., 1999; Xu e cols., 2006). Entretanto, não se pode descartar a possibilidade do envolvimento de substâncias ainda não caracterizadas e vias ainda não descritas no efeito anti-apoptótico observado.

No presente estudo não foi observado efeito do MCN ou MCH sobre o percentual de células vivas e células em apoptose precoce, embora uma tendência em relação ao percentual de células vivas possa ser sugerida. Talvez o procedimento de tripsinização dos cardiomiócitos logo após o período de hipóxia esteja por si só influenciando o percentual de células em apoptose precoce, fato que poderia mascarar um eventual efeito anti-apoptótico do MC sobre este evento precoce de morte celular. Para testar esta hipótese seria necessário que para a remoção da cultura de cardiomiócito da placa de cultura, após submetê-la as condições experimentais, outras enzimas em diferentes concentrações fossem testadas com o intuito de otimizar a técnica.

Logo, os resultados *in vitro* mostram um efeito atenuador do MC sobre a apoptose tardia e morte por necrose, fato que pode sugerir que a melhora funcional após injeção intramiocárdica de MC esteja relacionada a um efeito anti-apoptótico mediado pela secreção de fatores oriundos das MSC. Entretanto, não se pode descartar a possibilidade da melhora funcional observada após injeção de MCH-C

ser decorrente também de um efeito parácrino angiogênico, visto que muitos dos fatores secretados são conhecidos por participarem do processo de angiogênese. Por outro lado, a melhora funcional após IM e terapia com MSC parece ocorrer de forma bastante rápida demandando tempo consideravelmente menor que aquele necessário para o processo de angiogênese (Mangi e cols., 2003; Gnecci e cols., 2006). Outra possibilidade seria um efeito do MC em promover proliferação e/ou ativação de células-tronco cardíacas residentes, estimulando dessa forma um reparo endógeno. Entretanto, a metodologia utilizada no presente estudo não permite afirmar nem excluir essa possibilidade.

No presente estudo, não foi realizada dosagem de fatores tróficos do MC obtido das MSC. Entretanto, alguns fatores angiogênicos e anti-apoptóticos já conhecidos têm sido dosados no MC de MSC. Kinnaird e cols. (2004b), após terem observado que o MC de MSC apresentava efeito arteriogênico *in vitro* e *in vivo*, prosseguiram com o estudo quantitativo, investigando se os possíveis fatores arteriogênicos conhecidos estavam presentes no MC. Neste estudo, a dosagem de fatores foi feita por Elisa em MC obtido em condições de normóxia e hipóxia. Vários fatores envolvidos com o processo de angiogênese foram dosados dentre os quais o VEGF, FGF e IL-6 foram os fatores encontrados em maior concentração. A hipóxia levou à super-expressão e conseqüente aumento nas concentrações de FGF-2, FGF-7, IL-1, IL-6, PDGF, TGF- β , TNF- α e VEGF. Fatores anti-apoptóticos tais como IGF-1 e SDF-1 também foram encontrados no MC obtido de MSC (Xu e cols., 2006). Parakkadan e cols., motivados pelos resultados de regeneração hepática em modelo de insuficiência hepática em ratos, após administração intravenosa de MC de MSC realizaram análise proteômica do MC, utilizando a técnica de microarranjo de anticorpos. Estes autores quantificaram 174 proteínas presentes no meio sendo 37%

fatores de crescimento (IGFs, TGF- β , TNF- β , FGF foram os fatores em maior concentração), 30% quimiocinas, 19% citocinas, 13% proteínas de ligação e de reparo de matriz extracelular, e 1% de antagonistas de citocinas. Entretanto a contribuição relativa de cada substância para o efeito angiogênico e/ou anti-apoptótico final ainda não foi elucidado, e é provável que vários fatores ao invés de um único estejam envolvidos na cardioproteção via parácrina.

Em relação ao tamanho do infarto, os resultados do presente estudo mostram que a injeção de meio condicionado, seja obtido em normóxia seja em hipóxia, ano foi capaz de alterar o tamanho do infarto quando injetados 3 a 5 horas após o IM (protocolos I e II). O mesmo foi observado quando o MC foi injetado em modelo de infarto cicatrizado. Esse fato não invalida a hipótese da via parácrina estar envolvida na melhora funcional observada após injeção de MCH-C em modelo de infarto agudo, visto que a melhora da função cardíaca após terapia celular com MSC já foi observada, mesmo sem alterações no tamanho do infarto (Boomsma e cols., 2007).

O propósito do presente estudo foi avaliar se a via parácrina poderia estar envolvida na melhora funcional observada após terapia com MSC, utilizando para tanto a injeção intramiocárdica do MC obtido em normóxia e hipóxia. Uma vez que os fatores e vias intracelulares envolvidas com a cardioproteção tenham sua importância comprovada, o conhecimento sobre a via parácrina poderá ser utilizado não apenas para explicar a melhora da função, mas também como possível ferramenta terapêutica. Neste contexto, Mirotsoy e cols. (2007) identificaram a proteína Sfrp2 (do inglês *secreted frizzled related protein 2*) como sendo a proteína fundamental para que o efeito parácrino via MC fosse obtido de MSCs que supra-expressam Akt. Do ponto de vista terapêutico, a terapia baseada em proteínas poderia inclusive ser mais vantajosa que a terapia celular em termos práticos, éticos

e econômicos. Entretanto, ainda são necessários mais estudos que comprovem a importância da via parácrina e que investiguem os mecanismos moleculares envolvidos na cardioproteção para que esta conduta se torne uma realidade clínica.

Em conclusão, o presente estudo mostra que fatores secretados *in vitro* pelas MSC apresentam efeito cardioprotetor *in vivo* que pode estar relacionado à liberação de fatores anti-apoptóticos por essas células. Os resultados aqui apresentados sugerem que a via parácrina está envolvida na melhora funcional cardíaca observada após terapia com MSC.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBATE A, BIONDI-ZOCCAI GGL, BALDI A. Pathophysiologic role of myocardial apoptosis in post-infarction left ventricular remodeling. *J Cell Physiol* 193, 145-153; 2002.

ALVAREZ-DOLADO M, PARDAL R, GARCIA-VERDUGO JM, FIRE JR, LEE HO, PFEFFER K, LOIS C, MORRISON SJ, ALVAREZ-BUYLLA A. Fusion of bone-marrow derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 425, 968-973; 2003.

AMADO LC, SALIARIS AP, SCHULERI KH, St. JOHN M, XIE J-S, CATTANEO S, DURAND DJ, FITTON T, KUANG JG, STEWART G, LEHRKE S, BAUMGARTNER WW, MARTIN BJ, HELDMAN AW, HARE JM. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *PNAS* 102,11474-11479; 2005.

ANTMAN E, BASSAND JP, KLEIN W, OHMAN M, LOPEZ SENDON JL, RYDEN L, SIMOONS M, TENDERAET M. Myocardial infarction redefined – A consensus document of the Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 36, 959-969; 2000.

ANVERSA P, CHENG W, Y LIU Y, LERI A, REDAELLI G, KAJSTURA J. Apoptosis and myocardial infarction. *Basic Research in Cardiology* 93, 8-12; 1998b.

ANVERSA P, KAJSTURA J. Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart. *Circ Res* 83,1-14; 1998a.

ANVERSA P, NADAL-GINARD B. Myocyte renewal and ventricular remodeling. *Nature* 415, 240-243; 2002.

BELTRAMI AP, BARLUCCHI L, TORELLA D, BAKER M, LIMANA F, CHIMENTI S, KASAHARA H, ROTA M, MUSSO E, URBANEK K, LERI A, KAJSTURA J, NADAL-GINARD, ANVERSA P. Adult Cardiac Stem Cells Are Multipotent and Support Myocardial Regeneration. *Cell* 114, 763–776; 2003.

BELTRAMI AP, URBANEK K, KAJSTURA J, YAN S-M, FINATO N, BUSSANI R, NADAL-GINARD B, SILVESTRI F, LERI A, BELTRAMI CA, ANVERSA P. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *The New England Journal of Medicine* 344, 1750-1757; 2001.

BIALIK S, GEENEN DL, SASSON IE, CHENG R, HORNER JW, EVANS SM, LORD EM, KOCH CJ, KITSIS RN. Myocyte apoptosis during acute myocardial infarction in the mouse localizes to hypoxic regions but occurs independently of p53. *J. Clin. Invest.* 100,1363–1372; 1997.

BIANCO P, RIMINUCCI M, GRONTHOS S, ROBEY PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology and potential applications. *Stem cells* 19, 180-192; 2001.

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.

BUJA LM. Myocardial ischemia and reperfusion injury. *Cardiovascular Pathology* 14, 170-175; 2005.

CARVALHO AB, QUINTANILHA LF, DIAS JV, PAREDES BD, MANNHEIMER EG, CARVALHO FG, ASENSI KD, GUTFILEN B, FONSECA LM, RESENDE CM, REZENDE GF, TAKIYA CM, DE CARVALHO AC, GOLDENBERG RC. Bone Marrow Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Do Not Reduce Fibrosis or Improve Function in a Rat Model of Severe Chronic Liver Injury. *Stem Cells*, *in press*.

CHAO W, SHEN Y, ZHU X, ZHAO H, NOVIKOV M, SCHMIDT U, ROSENZWEIG A. Lipopolysaccharide Improves Cardiomyocyte Survival and Function after Serum Deprivation. *The journal of biological chemistry* 280, 21997–22005; 2005.

COUSIN B, ANDRÉ M, ARNAUD E, PÉNICAUD L, CASTEILLA L. Reconstitution of lethally irradiated mice by cells isolated from adipose tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 301, 1016–1022; 2003.

DAWN B, STEIN AB, URBANEK K, ROTA M, WHANG B, RASTALDO R, TORELLA D, TANG XL, REZAZADEH A, KAJSTURA J, LERI A, HUNT G, VARMA J, PRABHU SD, ANVERSA P, BOLLI R. Cardiac stem cells delivered intravascularly traverse the vessel barrier, regenerate infarcted myocardium, and improve cardiac function. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 3766 –3771; 2005.

DOETSCH F, CAILLE I, LIM DA, GARCÍ'A-VERDUGO JM, ALVAREZ-BUYLLA A. Subventricular Zone Astrocytes Are Neural Stem Cells in the Adult Mammalian Brain. *Cell* 97, 703–716; 1999.

DOMINICI M, LE BLANC K, MUELLER I, SLAPER-CORTENBACH I, MARINI FC, KRAUSE DS, DEANS RJ, KEATING A, PROCKOP DJ, HORWITZ EM. Minimal

criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315-317; 2006.

FLETCHER PJ, PFEFFER JM, PFEFFER MA, BRAUNWALD E. Left ventricular diastolic pressure-volume relations in rats with healed myocardial infarction. *Circ Res* 49, 618-626; 1981.

FRANCIS J, WEISS RM, WEI SG, JOHNSON AK, FELDER RB. Progression of heart failure after myocardial infarction in the rat. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 281, R1734-R1745; 2001.

FRIEDENSTEIN AJ, GORSKAJA JF, KULAGINA NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*, 4: 267-274, 1976.

FU S, LIESVELD J. Mobilization of hematopoietic stem cells. *Blood Rev* 14, 205–218; 2000.

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.

GONG J, TRAGANOS F, DARZYNRIEWICZ Z. A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cell applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. *Analytical Biochemistry* 218, 314-319; 1994.

GONZÁLEZ-JUANATEY J R, PIÑEIRO R, IGLESIAS MJ, GUALILLO O, KELLY PA, DIÉGUEZ C, LAGO F. GH prevents apoptosis in cardiomyocytes cultured in vitro through a calcineurin-dependent mechanism. *Journal of Endocrinology* 180, 325–335; 2004.

HAMET P, RICHARD L; DAM T-V, TEIGER E, ORLOV SN, GABOURY L, GOSSARD F, TREMBLAY J. Apoptosis in target organs of hypertension. *Hypertension* 26, 642-648; 1995.

HEIMBURGER RF. Injection into the pericardial sac and ligation of coronary artery in the rat. *Arch. Surg* 52, 677–689; 1946.

HENDERSON KK, WAGNER H, FAVRET F, BRITTON SL, KOCH LG, WAGNER PD, GONZALEZ NC. Determinants of maximal O₂ uptake in rats selectively bred for endurance running capacity. *J Appl Physiol* 93, 1265–1274; 2002.

HERNANDEZ M, LORIGA KC, PEREZ FM, LOPEZ H. Marcadores bioquímicos de infarto miocárdico agudo posoperatorio en la cirugía cardíaca. *Rev Cubana Cir* 42; 2003.

HERZOG EL, CHAI LI, KRAUSE DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 102, 3483-3493; 2003.

HOLMES JW, BORG TK, COVELL JW. Structure and mechanics of healing myocardial infarcts. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 7, 223–253; 2005.

HORWITZ EM, LE BLANC K, DOMINICI M, MUELLER I, SLAPER-CORTENBACH I, MARINI FC, DEANS RJ, KRAUSE DS, KEATING A. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7, 393-395; 2005.

HOU M, YANG, K-M, ZHANG¹ H, ZHU W-Q, DUAN F-J, WANG H, SONG YH, WEI Y-J, HU S-S. Transplantation of mesenchymal stem cells from human bone marrow improves damaged heart function in rats. *International Journal of Cardiology* 115, 220–228; 2007.

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 Cardio-thoracic Surgery* 31, 438—443; 2007.

HUNG S-C, CHEN N-J, HSIEH S-L, LI H, MA, H-L, LO W-H. Isolation and characterization of size-sieved stem cells from human bone marrow. *Stem cells* 20, 249-258; 2002.

JIANG Z-S, PADUA RR, JU H, DOBLE BW, JIN Y, HAO J, CATTINI PA, DIXON IMC, KARDAMI E. Acute protection of ischemic heart by FGF-2: involvement of FGF-2 receptors and protein kinase C. *Am J Physiol Heart CircPhysiol* 282, H1071–H1080; 2002.

JOHNS TNP, OLSON BJ. Experimental myocardial infarction. *Ann. Surg* 140, 675–682; 1954.

JUGDUTT BI, MICHOROWSKI BL. Role of infarct expansion in rupture of the ventricular septum after acute myocardial infarction: a two-dimensional echocardiographic study. *Clin Cardiol* 10, 641-652; 1987.

KAJSTURA J, LERI A, FINATO N, DI LORETO C, BELTRAMI CA, ANVERSA P. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 8801-8805; 1998.

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.

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; 2004b.

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; 2004a.

KOCHER AA, SCHUSTER MD, SZABOLCS MJ, TAKUMA S, BURKHOF D, WANG J, HOMMA S, EDWARDS NM, ITESCU S. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone marrow-derived endothelial precursors prevents post-infarction remodeling and improves cardiac function. *Nature Med* 7, 430-436; 2001.

LIN Z-F, LI X-K, LIN Y, WU F, LIANG L-M, FU X-B. Protective effects of non-mitogenic human acidic fibroblast growth factor on hydrogen peroxide-induced damage to cardiomyocytes in vitro. *World J Gastroenterol* 11, 5492-5497; 2005.

LINZBACH AJ. Heart failure from the point of view of quantitative anatomy. *Am J Cardiol* 5, 370-382; 1960.

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

MANGI AA, NOISEUX N, DELING K, HE H, REZUANI M, INGWALL JS, DZAU J. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling performance of infarcted hearts. *Nature Medicine* 9, 1195-1201; 2003.

MATSUI T, LI L, DEL MONTE F, FUKUI Y, FRANKE TF, HAJJAR RJ, ROSENZWEIG A. Inhibits Apoptosis of Hypoxic Cardiomyocytes In Vitro Adenoviral Gene Transfer of Activated Phosphatidylinositol 3'-Kinase and Akt. *Circulation* 100, 2373-2379; 1999.

MCKAY RG, PFEFFER MA, PASTERNAK RC, MARKIS JE, COME PC, NAKAO S, ALDERMAN JD, FERGUSON JJ, SAFIAN RD, GROSSMAN W. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: a corollary to infarct expansion. *Circulation* 74, 693-702; 1986.

MIN J-Y, YANG Y, CONVERSO KL, LIU L, HUANG Q, MORGAN JP, XIAO Y-F. Transplantation of embryonic stem cells improves cardiac function in postinfarcted rats. *J Appl Physiol* 92, 288–296; 2001.

MIROTSOU M, ZHANG Z, DEB A, ZHANG L, GNECCHI M, NOISEUX N, MU H, PACHORI A, DZAU VJ. Secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) is the key Akt-mesenchymal stem cell-released paracrine factor mediating myocardial survival and repair. *PNAS* 104, 1643–1648; 2007.

MOENS AL, CLAEYS M J, TIMMERMANS JP, VRINTS CJ. Myocardial ischemic/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process. *International Journal of Cardiology* 100, 179-190; 2004.

MOUQUET F, PFISTER O, JAIN M, OIKONOMOPOULOS A, NGOY S, SUMMER R, FINE A, LIAO R. Restoration of cardiac progenitor cells after myocardial infarction by self-proliferation and selective homing of bone marrow–derived stem cells. *Circ Res* 97, 1090-1092; 2005.

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

NADAL-GINARD B, KAJSTURA J, LERI A, ANVERSA P. Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res* 92, 139-150; 2003.

NYGREN JM, JOVINGE S, BREITBACH M, SAWEN P, ROLL W, HESCHELER J, TANEERA J, FLEISCHMANN BK, JACOBSEN SE. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nature Medicine* 10, 494-501; 2004.

OHTSUKA M, TAKANO H, ZOU Y, TOKO H, AKAZAWA H, QIN Y, SUZUKI M, HASEGAWA H, NAKAYA H, KOMURO I. Cytokine therapy prevents left ventricular remodeling and dysfunction after myocardial infarction through neovascularization. *FASEB J* 18, 851–853; 2004.

OLIVARES EL, RIBEIRO VP, DE CASTRO JPSW, RIBEIRO KC, MATTOS EC, GOLDENBERG RCS, MILL JG, DOHMANN HF, DOS SANTOS RR, CAMPOS DE CARVALHO AC, MASUDA MO. Bone marrow stromal cells improve cardiac performance in healed infarcted rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287, H464-H470; 2004.

ORLIC D, KAJSTURA J, CHIMENTI S, JAKONIUK I, ANDERSON SM, 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; 2001a.

ORLIC D, KAJSTURA J, CHIMENTI S, LIMANA F, JAKONIUK I, QUAINI F, NADAL-GINARD B, BODINE DM, LERI A, ANVERSA P. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 98,10344–10349; 2001b.

PALJOJOKI E, SARASTE A, ERIKSSON A, PULKKI K, KALLAJOKI M, VOIPIO-PULKKI LM, TIKKANEN I. Cardiomyocyte apoptosis and ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280, H2726–H2731; 2001.

PAREKKADAN B, POLL DV, SUGANUMA D, CARTER EA, BERTHIAUME F, TILLES AW, YARMUSH ML. Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. *PLoS ONE*, www.plosone.org, 9 edição, e941; 2007.

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, 2294-2302; 2003.

PETERSON JT, LI H, DILLON L, BRYANT JW. Evolution of matrix metalloprotease and tissue inhibitor expression during heart failure progression in the infarcted rat. *Cardiovasc Res* 46, 307-315; 2000.

PFEFFER JM, PFEFFER MA, BRAUNWALD E. Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left ventricle of the rat. *Circ Res* 57, 84-95; 1985.

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

PIERARD LA, ALBERT A, GILIS F, SPRYNGER M, CARLIER J, KULBERTUS HE. Hemodynamic profile of patients with acute myocardial infarction at risk of infarct expansion. *Am J Cardiol* 60, 5-9; 1987.

PITTENGER MF, MACKAY AM, BECK SC, JAISWAL RK, DOUGLAS R, MOSCA JD, MOORMAN MA, SIMONETTI DW, CRAIG S, MARSHAK DR. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science* 284, 143-147;1999.

REEVE JLV, DUFFY AM, O'BRIEN T, SAMALI A. Don't lose heart -therapeutic value of apoptosis prevention in the treatment of cardiovascular disease. *J. Cell. Mol. Med* 9, 609-622; 2005.

RUMYANTSEV PP. DNA synthesis and nuclear division in embryonal and postnatal histogenesis of myocardium. *Arch Anat* 47, 59-65; 1964.

SABBAH HN, SHAROV VG, GOLDSTEIN AY. Cell Death, Tissue Hypoxia and the Progression of Heart Failure. *Heart Failure Reviews* 5,131-138; 2000.

SELYE H, BAJUSZ E, GRASSO S, MENDELL P. Simple technique for the surgical occlusion of coronary vessels in the rat. *Angiology* 11, 398-407; 1960.

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.

SONG L, TUAN RS. Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *The FASEB Journal* 10,1096/fj.03-1100fje. Publicado on line em 14 de Abril de 2004.

STRAUER BE, BREHM M, ZEUS T, KOSTERING M, HERNANDEZ A, SORG RV, KOGLER G, WERNET P. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 106, 1913-1918; 2002.

SUADICANI SO, VINK MJ, SPRAY DC. Slow intercellular Ca²⁺ signaling in wild-type and Cx43-null neonatal mouse cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279, H3076-H3088; 2000.

TAKAHASHI M, LI T-S, SUZUKI R, KOBAYASHI T, ITO H, IKEDA Y, MATSUZAKI M, HAMANO K. Cytokines produced by bone marrow cells can contribute to

functional improvement of the infarcted heart by protecting cardiomyocytes from ischemic injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291, H886–H893; 2006.

TAKETANI I, YUASA F, TSUBOUCHI H, GOHDA E, IWASAKA T, ZHANG SY, NAKANO K, KOIKE Y, WANG J, MUKAIDE H, IWASAKI SM, ADACHI Y, NISHIUE T, MINAMINO K, SUZUKI Y. Hepatocyte growth factor delivered by ultrasound-mediated destruction of microbubbles induces proliferation of cardiomyocytes and amelioration of left ventricular contractile function in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Stem Cells* 23,1589–1597; 2005.

TERADA NAOHIRO, HAMAZAKI T, MASAHIRO O, HOKI M, MASTALERZ DM, NAKANO Y, MEYER EM, MOREL L, PETERSEN BE, SCOTT EW. Bone Marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416, 542-545; 2002.

UEMURA R, XU M, AHMAD N, ASHRAF M. Bone Marrow Stem Cells Prevent Left Ventricular Remodeling of Ischemic Heart Through Paracrine Signaling. *Circ Res* 98,1414-1421; 2006.

URBANEK K, ROTA M, CASCAPERA S, BEARZI C, NASCIMBENE A, ANGELIS A, HOSODA T, CHIMENTI S, BAKER M, LIMANA F, NURZYNSKA D, TORELLA D, ROTATORI F, RASTALDO R, MUSSO E, QUAINI F, LERI A, KAJSTURA J, ANVERSA P. Cardiac stem cells possess growth factor-receptor systems that after activation regenerate the infarcted myocardium, improving ventricular function and long-term survival. *Circ Res* 97, 663-673; 2005.

VAKEVA AP, AGAH A, ROLLINS SA, MATIS LA, LI L, STAHL GL. Myocardial Infarction and Apoptosis After Myocardial Ischemia and Reperfusion : Role of the Terminal Complement Components and Inhibition by Anti-C5 Therapy. *Circulation* 97, 2259-2267; 1998.

VAN KERCKHOVEN R, KALKMAN EA, SAXENA PR, SCHOEMAKER RG. Altered cardiac collagen and associated changes in diastolic function of infarcted rat hearts. *Cardiovasc Res* 46, 316-323; 2000.

VASSILOPOULOS G, WANG PR, RUSSELL DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 422, 901–904; 2003.

VERMES I, HAANEN C, STEFFENS-NAKKEN H, REUTELINGSPERGER C. A novel assay for apoptosis: flow cytometric detection of phosphatidylserine early apoptotic cells using fluorescein labelled expression on Annexin V. *Journal of Immunological Methods* 184, 39-51; 1995.

WANG L, MA W, MARKOVICH R, CHEN J-W, WANG PH. Regulation of Cardiomyocyte Apoptotic Signaling by Insulin-like Growth Factor I. *Circ. Res* 83, 516-522; 1998.

WEBER KT, SUN Y, TYAGI SC, CLEUTJENS JP. Collagen network of the myocardium: function, structural remodeling and regulatory mechanisms. *J Mol Cell Cardiol* 26, 279-292; 1994.

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

WEISS JL, MARINO PN, SHAPIRO EP. Myocardial infarct expansion: recognition, significance and pathology. *Am J Cardiol* 68, 35-40; 1991.

WERNECK-DE-CASTRO JPS, COSTA-E-SOUSA RH, OLIVEIRA PF, PINHO-RIBEIRO V, MELLO DB, PEÇANHA R, MATTOS E, OLIVARES EL, MAIA ACV, MILL JG, GOLDENBERG RCS, CAMPOS-DE-CARVALHO AC. G-CSF does not improve systolic function in a rat model of acute myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* XX, 1-8; 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. www.who.int/.

WURMSER AE, GAGE FH. Cell fusion causes confusion. *Nature* 414, 485-486; 2002.

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.

YAMAMURA T, NAKAMURA H, YAMAMOTO T, UMEMOTO S, FUJII T, KOBAYASHI N, MATSUZAKI M. Fas Expression and Apoptosis Correlate With Cardiac Dysfunction in Patients With Dilated Cardiomyopathy. *Jpn Circ J* 63, 149 – 154; 1999.

YING QI-L, NICHOLS J, EVANS EP, SMITH AG. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 416, 545-548; 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](#)