

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO

BRUNO LEONARDO BARRANCO ESPORCATTE

**CÉLULAS MESENQUIMAIS DE MEDULA ÓSSEA E O REMODELAMENTO
CARDÍACO APÓS LESÃO ISQUÊMICA EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Instituto de Biofísica
Carlos Chagas Filho da Universidade Federal
do Rio de Janeiro como requisito parcial à
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Rio de Janeiro
Julho 2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO

BRUNO LEONARDO BARRANCO ESPORCATTE

**CÉLULAS MESENQUIMAIS DE MEDULA ÓSSEA E O REMODELAMENTO
CARDÍACO APÓS LESÃO ISQUÊMICA EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Instituto de Biofísica
Carlos Chagas Filho da Universidade Federal
do Rio de Janeiro como requisito parcial à
obtenção do título de Doutor em Ciências.

ORIENTADORES: Prof. Dr. Antonio Carlos Campos de Carvalho
Profa. Dra. Regina Coeli dos Santos Goldenberg

Rio de Janeiro
Julho 2010

ESPORCATTE, Bruno Leonardo Barranco

Células mesenquimais de medula óssea e o remodelamento cardíaco após lesão isquêmica em camundongos/Bruno Leonardo Barranco Esporcatte. Rio de Janeiro, UFRJ, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho.

xv, 124 p., il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2010.

1. Infarto agudo do miocárdio. 2. Terapia celular. 3. Medula óssea. 4. Células mesenquimais. 5. Ecocardiograma. 6. Fisiologia – Tese. I. Tese (Doutorado) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. II. Título.

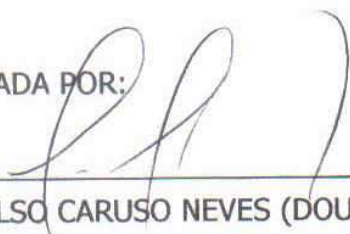
"CÉLULAS MESENQUIMAIS DE MEDULA ÓSSEA E O REMODELAMENTO
CARDÍACO APÓS LESÃO ISQUÊMICA EM CAMUNDONGOS".

BRUNO LEONARDO BARRANCO ESPORCATTE

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO
GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS

RIO DE JANEIRO, 06 DE JULHO DE 2010.

APROVADA POR:



DR. CELSO CARUSO NEVES (DOUTOR – U.F.R.J)

COORDENADOR DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (FISIOLOGIA)



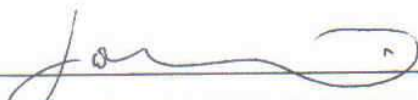
DR. ANTÔNIO CARLOS CAMPOS DE CARVALHO (DOUTOR U.F.R.J) – ORIENTADOR



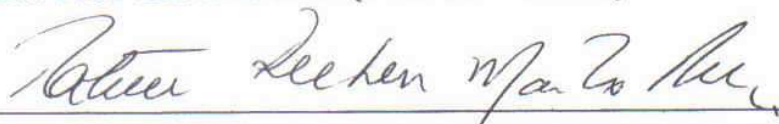
DR.ª. REGINA COELI DOS SANTOS GOLDENBERG (DOUTORA U.F.R.J) - ORIENTADORA



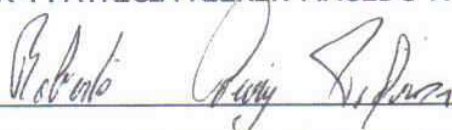
DR.ª. ADRIANA BASTOS DE CARVALHO (DOUTORA – U.F.R.J) - REVISORA



DR. JOSÉ GERALDO MILL (DOUTOR – U.F.E.S)



DR.ª. PATRICIA RIEKEN MACEDO ROCCO (DOUTORA – U.F.R.J)



DR. ROBERTO COURY PEDROSA (DOUTOR – U.F.R.J)

BRUNO LEONARDO BARRANCO ESPORCATTE

**CÉLULAS MESENQUIMAIS DE MEDULA ÓSSEA E O REMODELAMENTO
CARDÍACO APÓS LESÃO ISQUÊMICA EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Instituto de Biofísica
Carlos Chagas Filho da Universidade Federal
do Rio de Janeiro como requisito parcial à
obtenção do título de Doutor em Ciências
Biológicas (Fisiologia)

ORIENTADORES: Prof. Dr. Antonio Carlos Campos de Carvalho
Profa. Dra. Regina Coeli dos Santos Goldenberg

DATA DA APROVAÇÃO: 06/07/2010

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Adriana Bastos Carvalho (revisora)
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof^a. Cristiane Del Corso (suplente externo)
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. José Geraldo Mill
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. José Hamilton Matheus do Nascimento (suplente interno)
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof^a. Patrícia Rieken Macedo Rocco
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Roberto Coury Pedrosa
Universidade Federal do Rio de Janeiro

À minha avó Ceny que há 27 anos torna concreto o significado das palavras
ensino, dedicação e amor

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, que neste mundo repleto de provas, lutas, desafios e necessidades me ajuda a superar obstáculos que por vezes se figuram intransponíveis.

Aos meus avós Antonio Barranco (*in memoriam*) e Ceny Beraba Barranco por cada momento de luta na minha infância e por moldarem meus valores éticos.

À minha mãe Ana Gisele Barranco, grande amiga e companheira. Que juntos consigamos superar nossos desafios.

Ao meu pai Roberto Esporcatte, pelo exemplo profissional e pelas orientações ao longo deste caminho. Que nossa amizade continue crescendo e nos aproximando.

À minha namorada Carine Rocha que inexplicavelmente me “aturou” nos últimos seis anos. Te amo!

Ao Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho e todo seu corpo docente responsável pela formação de excelentes profissionais que mantém a tradição e a qualidade do ensino das diversas carreiras biomédicas da UFRJ.

Ao professor Antonio Carlos Campos de Carvalho pela orientação e por todas as oportunidades oferecidas.

À professora Regina Coeli dos Santos Goldenberg pela convivência e amizade ao longo dos sete anos no laboratório.

Ao dr. Stephan Lactermacher, inicialmente professor e hoje grande amigo. Ficam os conselhos: nunca cante e jamais dance.

À professora Nazareth de Novaes Rocha, incansável e sempre disposta a iniciar outro grupo experimental.

À amiga Debora Mello sempre interessada e dedicada aos nossos experimentos, devidamente recompensados com “caixas de bis”.

À amiga Adriana Bastos Carvalho pelo convívio desde os tempos de graduação. Professora, sua minerva não é azul, é preta!

Ao amigo dr. Fábio Fortes por todo o suporte com as culturas de células e pelas ótimas risadas ao fim do dia!

À querida Conceição e seus meninos Maicon e Willian que nunca deixaram que faltassem camundongos para meus experimentos!

Às destaques da iniciação científica Karina Asensi e Beatriz Christie. Obrigado pela ajuda e parabéns pelo desempenho.

Às meninas que tornam o laboratório mais gracioso, porém extremamente barulhento: Fernanda, Ju Passipieri, Ju Silva, Andreza, Isa e Grazi.

Aos hepáticos por terem finalmente terminado o protocolo que poluía o ambiente. Forte abraço Nobru, Luiz Fernando e Ju Dias.

Aos amigos do lado negro da força: Fabrício, Fredson, Carol Carvalho, Luizinho, Cássia e Pedrão, companheiros de FESBEs.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – REPRESENTATIVO DO PROCEDIMENTO CIRÚRGICO COMUM AO PROTOCOLO DE OCLUSÃO PERMANENTE E ISQUEMIA E REPERFUSÃO.....	29
FIGURA 2 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DO APARATO PARA OCLUSÃO TRANSIENTE DA CORONÁRIA DESCENDENTE ANTERIOR.	30
FIGURA 3 – FASE 1 : CRONOGRAMA DA DEFINIÇÃO DO MODELO DE INFARTO POR OCLUSÃO PERMANENTE.	41
FIGURA 4 – FASE 2: CRONOGRAMA DA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DA ADMINISTRAÇÃO DE CÉLULAS MESENQUIMAIS POR VIA INTRAMIOCÁRDICA EM ANIMAIS INFARTADOS POR OCLUSÃO PERMANENTE.	41
FIGURA 5 – FASE 3: COMPARAÇÃO DOS ACHADOS ELETROCARDIOGRÁFICOS E HISTOLÓGICOS DO PROTOCOLO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO E OCLUSÃO PERMANENTE.	42
FIGURA 6 – FASE 3: CRONOGRAMA DO PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO CARDÍACA APÓS LESÃO MIOCÁRDICA INDUZIDA POR ISQUEMIA E REPERFUSÃO.....	42
FIGURA 7 – FASE 4: CRONOGRAMA DO PROTOCOLO DE TERAPIA POR INJEÇÃO INTRAVENOSA.	42
FIGURA 8 – ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA PI VS. OP	44
FIGURA 9 – REPRESENTATIVO DOS REGISTROS ELETROCARDIOGRÁFICOS PI VS. OP	45
FIGURA 10 – MARCADORES DE NECROSE MIOCÁRDICA.....	47
FIGURA 11 – ANÁLISE ECOCARDIOGRÁFICA.....	48
FIGURA 12 – ANÁLISE ERGOESPIROMÉTRICA PI VS. OP	50
FIGURA 13 – FOTOGRAFIA DOS CORAÇÕES OP VS. PI.....	51
FIGURA 14 – PESO ÚMIDO DO CORAÇÃO PI VS. OP	51
FIGURA 15 – ANÁLISE HISTOLÓGICA OP.....	52
FIGURA 16 – VALIDAÇÃO DO MICROARRANJO POR PCR EM TEMPO REAL	54
FIGURA 17 – FOTOMICROGRAFIAS REPRESENTATIVAS DA MORFOLOGIA DAS MSC EM CULTURA.....	55
FIGURA 18 – INDUÇÃO ADIPOGÊNICA.....	56
FIGURA 19 – INDUÇÃO OSTEOGÊNICA.....	56
FIGURA 20 – CITOMETRIA DE FLUXO DAS GFP-MSCT.....	57
FIGURA 21 – AVALIAÇÃO ERGOESPIROMÉTRICA: PLACEBO VS. GFP-MSCT (VIA INTRAMIOCÁRDICA).....	59
FIGURA 22 – AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DAS CÉLULAS COM TRIPLA MARCAÇÃO INJETADAS NO MIOCÁRDIO UMA SEMANA APÓS A TERAPIA.....	60
FIGURA 23 – AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DAS CÉLULAS COM TRIPLA MARCAÇÃO INJETADAS NO MIOCÁRDIO DUAS SEMANAS APÓS A TERAPIA.	61
FIGURA 24 – ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA PI VS. OP VS. IR	66
FIGURA 25 – REPRESENTATIVO DA EVOLUÇÃO DO ECG DURANTE A CIRURGIA	67
FIGURA 26 – ANÁLISE ELETROCARDIOGRÁFICA 24 HORAS APÓS A CIRURGIA OP VS. IR.....	68
FIGURA 27 – REPRESENTATIVOS DA AVALIAÇÃO BIDIMENSIONAL (A E B) E UNIDIMENSIONAL (C E D) DE ANIMAIS NORMAIS E INFARTADOS POR ISQUEMIA E REPERFUSÃO, RESPECTIVAMENTE.	70
FIGURA 28 – AVALIAÇÃO ECOCARDIOGRÁFICA DOS ANIMAIS INFARTADOS POR ISQUEMIA E REPERFUSÃO.....	71
FIGURA 29 – TEMPO DE RELAXAMENTO ISOVOLUMÉTRICO E FRAÇÃO DE EJEÇÃO PELO MÉTODO DE SIMPSON DE ANIMAIS INFARTADOS POR ISQUEMIA E REPERFUSÃO.....	72
FIGURA 30 – ANÁLISE MACROSCÓPICA AOS 30 DIAS APÓS A CIRURGIA NOS GRUPOS IR E OP ...	73
FIGURA 31 – HISTOLOGIA AOS 30 DIAS APÓS A CIRURGIA EM ANIMAIS SUBMETIDOS À ISQUEMIA E REPERFUSÃO.....	73
FIGURA 32 – AVALIAÇÃO ECOCARDIOGRÁFICA: PLACEBO VS. 1 INJEÇÃO VS. 3 INJEÇÕES	76
FIGURA 33 – AVALIAÇÃO ECOCARDIOGRÁFICA: PLACEBO VS. 1 INJEÇÃO VS. 3 INJEÇÕES	77

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PARÂMETROS ELETROCARDIOGRÁFICOS ESTUDADOS	46
TABELA 2 – AVALIAÇÃO ECOCARDIOGRÁFICA: NORMAL VS. PI VS. OP	49
TABELA 3 – AVALIAÇÃO ECOCARDIOGRÁFICA: PLACEBO VS. GFP-MSC (VIA INTRAMIOCÁRDICA)	58
TABELA 4 – GENES COM EXPRESSÃO AUMENTADA APÓS O INFARTO DO MIOCÁRDIO E NORMALIZADOS APÓS INJEÇÃO INTRAMIOCÁRDICA DE GFP-MSC	62
TABELA 5 – GENES COM EXPRESSÃO AUMENTADA APÓS O INFARTO DO MIOCÁRDIO E DIMINUÍDA APÓS INJEÇÃO INTRAMIOCÁRDICA DE GFP-MSC.....	63
TABELA 6 – GENES COM EXPRESSÃO NORMAL APÓS O INFARTO DO MIOCÁRDIO E AUMENTADA APÓS INJEÇÃO INTRAMIOCÁRDICA DE GFP-MSC.....	64
TABELA 7 – GENES COM EXPRESSÃO NORMAL APÓS O INFARTO DO MIOCÁRDIO E DIMINUÍDA APÓS INJEÇÃO INTRAMIOCÁRDICA DE GFP-MSC	65
TABELA 8 – ANÁLISE ELETROCARDIOGRÁFICA DOS ANIMAIS SUBMETIDOS À ISQUEMIA E REPERFUSÃO.....	69
TABELA 9 – AVALIAÇÃO ECOCARDIOGRÁFICA DOS ANIMAIS SUBMETIDOS À ISQUEMIA E REPERFUSÃO E TRATADOS COM PLACEBO, UMA OU TRÊS INJEÇÕES DE GFP-MSC POR VIA INTRAVENOSA.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS

AE	diâmetro do átrio esquerdo
AE/Ao	relação AE dividido por Ao
Ao	diâmetro transversal dimensão da aorta
CD	em inglês <i>cluster of differentiation</i>
CKMB	creatinofosfoquinase fração MB
CMMO	células mononucleares de medula óssea
cTn	troponina I
DA	artéria coronária descendente anterior
DMEM	meio de cultura, em inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
ECG	eletrocardiograma
ECO	ecocardiograma
EDTA	ácido etilendiamino tetra-acético; em inglês <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>
eGFP	proteína verde fluorescente; em inglês <i>enhanced green fluorescent protein</i>
FE	fração de ejeção
FS	fração de encurtamento
G-CSF	fator de estimulação de colônias de granulócitos; em inglês <i>granulocyte colony-stimulating factor</i>
GFP	camundongos que expressam a proteína eGFP
GFP-MSC	células mesenquimais derivadas de camundongos GFP
HE	hematoxilina e eosina
HSC	células-tronco hematopoiéticas; em inglês <i>hematopoietic stem cell</i>
IAM	infarto agudo do miocárdio
IC	insuficiência cardíaca
IFN- γ	interferon-gama
IL-1	interleucina-1
IR	isquemia e reperfusão
IV	intravenosa
MSC	células-tronco mesenquimais; em inglês <i>mesenchymal stem cell</i>
OP	oclusão permanente
PA	parede anterior
PBS	tampão fosfato salino; em inglês <i>phosphate buffered saline</i>
PE-10	aparato de polietileno número 10
PGF	fator de crescimento placentário; em inglês <i>placental growth factor</i>
PI	pseudoinfartados

POSTN	periostina
PP	parede posterior
RER	taxa de troca respiratória
SDS	dodecil sulfato de sódio
SFB	soro fetal bovino
SIV	septo interventricular
SSC	solução de citrato salino padrão; em inglês <i>standard saline citrate</i>
TGF- β	em inglês <i>transforming growth factor beta</i>
THBS1	trombospondina-1
TNF- α	fator de necrose tumoral; em inglês <i>tumor necrosis factor alpha</i>
TRIV	tempo de relaxamento isovolumétrico
TTC	em inglês <i>triphenyltetrazolium chloride</i>
TUNEL	em inglês <i>Terminal deoxinucleotidil transferase Uracil Nick End Labeling</i>
VCO ₂	produção de dióxido de carbono
VE	ventrículo esquerdo
VEGF	fator de crescimento do endotélio vascular; em inglês <i>vascular endothelium growth factor</i>
VO ₂	consumo de oxigênio

RESUMO

ESPORCATTE, Bruno Leonardo Barranco. **Células mesenquimais de medula óssea e o remodelamento cardíaco após lesão isquêmica em camundongos**. Rio de Janeiro, 2010. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Fisiologia). Orientadores: Antonio Carlos Campos de Carvalho e Regina Coeli dos Santos Goldenberg. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2010.

Fundamentos: As cardiopatias de origem isquêmica estão entre as principais causas de mortalidade no mundo. Uma grande parcela dos pacientes que sofre um evento isquêmico evolui para estágios avançados de insuficiência cardíaca com indicação de transplante do coração. Como opção a este tratamento, uma das alternativas promissoras é a terapia celular.

Objetivo: Avaliar o potencial terapêutico da injeção de células mesenquimais de medula óssea (MSC) por via intramiocárdica e intravenosa.

Métodos: Camundongos C57BL/6, ambos os sexos e com 8-10 semanas de idade, foram submetidos à lesão miocárdica isquêmica e estratificados através de parâmetros eletro e ecocardiográficos. Confirmada a disfunção miocárdica, receberam células mesenquimais derivadas de camundongos que expressam uma proteína verde (GFP - *green fluorescent protein*) em todas as suas células.

Resultados: Animais tratados através da injeção intramiocárdica de MSC apresentaram menor dilatação da cavidade ventricular ($0,24 \pm 0,02$ cm vs. $0,32 \pm 0,05$ cm, $p < 0,05$) e maior fração de encurtamento ($35 \pm 1\%$ vs. $22 \pm 7\%$, $p < 0,05$) quando comparados ao grupo-placebo ao final do protocolo experimental. Além disso, a terapia celular foi capaz de normalizar a expressão de 71% dos genes alterados pelo evento isquêmico. Dentre os genes que retornaram aos níveis basais após o tratamento estão aqueles relacionados à angiogênese, resposta imunoinflamatória, apoptose, e remodelamento de matriz extracelular. A injeção intravenosa de MSC em dose única não foi capaz de frear o remodelamento cardíaco, entretanto, animais infartados que receberam três injeções seriadas de MSC apresentaram menores valores de diâmetro do ventrículo esquerdo em sístole ($0,30 \pm 0,06$ cm vs. $0,34 \pm 0,03$ cm, $p < 0,01$) e em diástole ($0,39 \pm 0,06$ cm vs. $0,432 \pm 0,03$ cm, $p < 0,01$) em relação ao grupo-placebo. Apesar do benefício funcional após a terapia, não foram observadas células marcadas no tecido hospedeiro.

Conclusões: A terapia com células mesenquimais interrompeu o processo de remodelamento cardíaco quando administrada por via intramiocárdica e através da injeção intravenosa seriada. A ausência de células marcadas no miocárdio sugere que o mecanismo de ação destas não é baseado na transdiferenciação ou fusão celular, sendo a sinalização parácrina a hipótese mais provável.

Palavras-chave: Camundongos, Infarto agudo do miocárdio, Medula óssea, Células mesenquimais, Ecocardiograma, Microarranjo genético

ABSTRACT

ESPORCATE, Bruno Leonardo Barranco. **Células mesenquimais de medula óssea e o remodelamento cardíaco após lesão isquêmica em camundongos**. Rio de Janeiro, 2010. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Fisiologia). Orientadores: Antonio Carlos Campos de Carvalho e Regina Coeli dos Santos Goldenberg. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2010.

Background: Ischemic heart disease is one of leading cause of death in the world. Many patients who suffer an ischemic event develop end stages heart failure with clinical indication of transplant. As option to this treatment, one promising alternative is cell therapy.

Objectives: To evaluate the therapeutic potential of intramyocardial and intravenous delivery of bone marrow mesenchymal stem cells (MSC).

Methods: C57BL/6 mice, both sex and 2 months and aged 8 – 10 weeks, were submitted to ischemic heart injury and stratificated by electro and echocardiography parameters. After cardiac disfunction confirmation, had received MSC from transgenic mice with over expression of green fluorescent protein (GFP).

Results: Animals treated with intramyocardial injection had lower left ventricular chamber diameter ($0.24\pm 0.02\text{cm}$ vs. $0.32\pm 0.05\text{cm}$, $p<0.05$) and higher shortening fraction ($35\pm 1\%$ vs. $22\pm 7\%$, $p<0.05$) when compared to sham group. Moreover, cell therapy was able of normalizing the expression of 71% of the genes modified by the ischemic event. Amongst the genes that had returned to basal expression levels after therapy were those related to angiogenesis, immune and inflammatory response, apoptosis and extracellular matrix. Intravenous delivery of MSC in single dose was not able to prevent cardiac remodeling, however infarcted animals that received three serial injections had presented lower left ventricular chamber diameter in systole ($0.30\pm 0.06\text{cm}$ vs. $0.34\pm 0.03\text{cm}$, $p<0.01$) and diastole ($0.39\pm 0.06\text{cm}$ vs. $0.432\pm 0.03\text{cm}$, $p<0.01$) when compared to sham group. Although a functional benefit after therapy was observed, we did not observe GFP-positive cells in the host tissue.

Conclusions: Therapy with MSC delivered by intramyocardial or serial intravenous injections attenuated the cardiac remodeling. The absence of marked cells in the myocardium suggests that the mechanism is not based on cell transdifferentiation or fusion, indicating that the paracrine effect is the most likely mechanism hypothesis.

Keywords: Mice, Myocardial infarction, Bone marrow, Mesenchymal stem cells, Echocardiogram, Microarray

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 INSUFICIÊNCIA CARDÍACA.....	16
1.2 INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO.....	17
1.3 REMODELAMENTO CARDÍACO	19
1.4 MODELO EXPERIMENTAL	20
1.5 TRANSPLANTE DO CORAÇÃO.....	22
1.6 TERAPIA CELULAR	22
1.7 MEDULA ÓSSEA	23
1.8 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE MEDULA ÓSSEA	24
1.9 VIAS DE ADMINISTRAÇÃO	25
2 OBJETIVOS	27
3 METODOLOGIA.....	28
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	28
3.2 INDUÇÃO DO INFARTO DO MIOCÁRDIO.....	28
3.3 MARCADORES DE NECROSE MIOCÁRDICA	30
3.4. REGISTRO ELETROCARDIOGRÁFICO	30
3.5 ESTUDO ECOCARDIOGRÁFICO	31
3.6 ANÁLISE ERGOESPIROMÉTRICA	32
3.7 CULTURA DE CÉLULAS MESENQUIMAIS	33
3.8 TRANSPLANTE CELULAR POR VIA INTRAMIOCÁRDICA.....	35

3.9 TRANSPLANTE CELULAR POR VIA INTRAVENOSA.....	36
3.10 HISTOPATOLOGIA.....	36
3.11 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA	37
3.12 TRATAMENTO ESTATÍSTICO	40
3.13 DESENHO DO ESTUDO	40
4 RESULTADOS.....	43
4.1 OCLUSÃO PERMANENTE	43
4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS.....	54
4.3 INJEÇÃO INTRAMIOCÁRDICA	57
4.4 ISQUEMIA E REPERFUSÃO.....	65
4.5 INJEÇÃO INTRAVENOSA	74
5 DISCUSSÃO	78
6 CONCLUSÕES	89
REFERÊNCIAS.....	90

1 INTRODUÇÃO

1.1 INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

A insuficiência cardíaca (IC) é um estado fisiopatológico em que uma anormalidade da função cardíaca é responsável pela incapacidade do coração de ejetar sangue em ritmo e quantidades apropriadas às necessidades dos tecidos e/ou permite que isto aconteça somente a partir de um volume diastólico anormalmente elevado.¹

Apesar dos avanços na prevenção e no controle das doenças cardiovasculares, a incidência e a prevalência da IC continuam aumentando.² Aproximadamente 2,6% da população norte-americana (5.800.000 indivíduos) apresenta tal doença com uma incidência anual de 670 mil casos. A incidência esperada para o ano de 2010 é de 10 pacientes a cada 1000 acima de 65 anos, gerando custos diretos e indiretos de 39,2 bilhões de dólares para a economia americana.³

No Brasil essa realidade não é diferente. Em 2007 foram 293.473 internações totalizando um custo acima de R\$230 milhões de reais, com 23.412 pacientes evoluindo para óbito.^{4,5} A sobrevida média após o diagnóstico da IC é baixa, aproximadamente 59% dos homens e 45% das mulheres morrerão em cinco anos após o diagnóstico da doença. A principal etiologia da IC, no país, é a cardiopatia isquêmica crônica associada à hipertensão arterial.⁴

A diminuição da população de cardiomiócitos, secundária a eventos isquêmicos ou a condições de sobrecarga volumétrica e/ou pressórica crônica, pode levar a diferentes graus de falência funcional. Essa perda de miocárdio viável afeta tanto a capacidade contrátil quanto a de relaxamento do coração. Por isso, atualmente, a IC é uma síndrome causada não somente pela disfunção sistólica, mas também pela disfunção diastólica,⁶ sendo esta última responsável por quase 1/3 dos casos.^{7,8}

Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento da IC estão: cardiopatias chagásicas, valvulopatias e, principalmente, infarto agudo do miocárdio (IAM),⁹ sendo responsável por 61,6% dos casos.⁹ Esse impacto contundente da doença coronariana sobre a morbimortalidade permanece a despeito de todos os avanços ocorridos no tratamento clínico, na cardiologia intervencionista e na cirurgia cardíaca.

São inquestionáveis os progressos da terapêutica medicamentosa para IC nas duas últimas décadas, em especial o uso dos inibidores da enzima conversora da angiotensina, os betabloqueadores e a espironolactona, todos gerando, além da melhora dos sintomas e da qualidade de vida, significativa redução da mortalidade e consequente impacto positivo na sobrevida.¹⁰⁻¹²

Adicionalmente ao arsenal terapêutico das formas avançadas de IC, dispõe-se hoje de dispositivos como balão intra-aórtico, marca-passo multissítio, coração artificial e técnicas cirúrgicas como anuloplastia mitral, ventriclectomia parcial e transplante cardíaco ortotópico, além da reabilitação física dos pacientes. Infelizmente, uma parcela crescente desses pacientes vê-se privada dos benefícios trazidos por essas técnicas,¹³ seja pela presença de contraindicações clínicas e/ou por restrições econômicas, visto que são procedimentos extremamente caros e nem sempre com cobertura pelo Sistema Único de Saúde.

As intervenções atualmente empregadas na clínica médica são capazes de frear, mas não de impedir o remodelamento cardíaco e, conseqüentemente, a evolução natural da doença. Isso porque nenhuma terapia age na base fisiopatológica da doença, ou seja, a perda de cardiomiócitos. Assim, a evolução para IC grave é apenas uma questão de tempo.

1.2 INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO

Quando há desproporção entre o fornecimento e o consumo de oxigênio, a fibra miocárdica passa por alterações que variam de acordo com a duração e a intensidade da inadequação do aporte sanguíneo. Do ponto de vista clínico, pacientes com doença coronariana crônica estão sujeitos à incidência maior de arritmias ventriculares, *angina pectoris* e IC, em especial aqueles pacientes com infartos de grande extensão ou repetitivos.¹⁴

Na interrupção brusca do fluxo, por oclusão de um dos ramos das artérias coronárias, evidencia-se um empalidecimento da região subjacente à obstrução, assim como a perda de motilidade,¹⁵ evoluindo com lesão irreversível das fibras miocárdicas, estabelecendo o IAM. Tal quadro desencadeia uma resposta neuro-hormonal caracterizada pela ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona e do sistema nervoso simpático. Estes mecanismos adaptativos visam a manter a

frequência cardíaca, pressão arterial e débito cardíaco, mantendo assim a perfusão tecidual.

Entretanto, essas respostas, sem apropriada modulação farmacológica, podem levar a desequilíbrio na sinalização beta-adrenérgica e na concentração intracelular de cálcio,^{16,17} culminando em hipertrofia dos miócitos, apoptose, proliferação de fibroblastos, depósito de colágeno intersticial que, em última instância, levam ao remodelamento cardíaco.¹⁸ A consequência desse rearranjo estrutural é a redução do débito sistólico que, associada ao aumento da resistência vascular, leva ao desenvolvimento de sinais e sintomas de congestão e hipoperfusão.¹⁸⁻²⁰

A exposição do conteúdo citoplasmático ao sistema imunológico após o IAM ativa uma resposta autoimunogênica evidenciada pela presença de grande quantidade de anticorpos contra proteínas cardíacas.^{21,22} Esses anticorpos “anticardíacos” são também encontrados no plasma circulante de pacientes com miocardiopatia dilatada,²³⁻²⁵ mas a relação entre autoanticorpos e a doença isquêmica não é evidente. A miosina cardíaca, uma das proteínas contráteis do sarcômero, é lançada na corrente sanguínea e é um dos antígenos contra a qual o sistema imune reagirá após a necrose dos miócitos, relação já estabelecida em outras doenças do coração, como miocardite e doença reumática cardíaca.^{26,27}

Avanços recentes demonstraram que a inflamação tem um papel fundamental em todas as etapas de progressão do IAM. Assim, diversos marcadores inflamatórios têm sido investigados como possíveis preditores de risco coronariano. A reação inflamatória após a injúria isquêmica é coordenada pela ativação de uma série de citocinas que são pré-requisitos para a cicatrização.²⁸⁻³¹ Destas, o interferon-gama (IFN- γ), uma citocina clássica de resposta imune T *helper* do tipo 1 (Th1),³² apresenta aumento significativo em pacientes vítimas do IAM.³³ Estudos prévios demonstraram que o aumento da resposta Th1 promoveu o desenvolvimento de doenças autoimunes contra órgãos específicos como, por exemplo, o modelo experimental de encefalomielite autoimune.³⁴ As citocinas pró-inflamatórias IL-1 e TNF- α ³⁵ também estão envolvidas em vários mecanismos de desenvolvimento da IC após a injúria isquêmica. A expressão de quimiocinas também está marcadamente aumentada na fase crônica do infarto e estas participam de forma importante na regulação do infiltrado e atividade leucocitária assim como na angiogênese e deposição de tecido fibrótico.³⁶

Assim, constata-se que o IAM é uma doença de base multifatorial e que as respostas compensatórias do organismo acabam por levar a alterações estruturais da bomba cardíaca.

1.3 REMODELAMENTO CARDÍACO

Após a lesão isquêmica inicial, a zona infartada é gradualmente substituída por tecido fibroso, visto que os cardiomiócitos têm capacidade limitada de se regenerar e a presença de células-tronco no tecido cardíaco é insuficiente para recuperar os cardiomiócitos lesados.³⁷ Assim, o infarto do miocárdio se caracteriza por apresentar uma fase aguda e uma fase de cicatrização, na qual o tecido necrosado é gradativamente substituído por tecido conjuntivo fibroso.

Tão logo a supressão do aporte sanguíneo se instala, o fenômeno de remodelamento cardíaco é ativado. Acredita-se que sua ocorrência na fase aguda do infarto funcione como mecanismo compensatório, com intuito de manter o débito cardíaco. Contudo, a longo prazo, essa alteração da arquitetura contribui para o desenvolvimento da IC. O aumento da pressão diastólica final é responsável por alterações neuro-hormonais que influenciam a resposta hemodinâmica após o IAM.

A injúria isquêmica é a principal causa de remodelamento do ventrículo esquerdo (VE). Essa alteração da arquitetura cardíaca é caracterizada por hipertrofia dos cardiomiócitos,³⁸ dilatação cavitária do VE remanescente³⁹ e afinamento da parede infartada com possível formação de aneurisma. Além disso observa-se também acúmulo de cálcio citoplasmático⁴⁰, alterações físico-químicas da matriz extracelular⁴¹ e alteração da expressão de proteínas contráteis.⁴² Esses achados estão relacionados à extensão do infarto, à evolução do processo cicatricial e da sobrecarga hemodinâmica que pode se instalar já na fase aguda.⁴³

O mecanismo pelo qual se dá a inexorável progressão da doença e remodelamento cardíaco, que ocorrem mesmo com a remoção dos fatores nocivos responsáveis pela lesão inicial, ainda não foi totalmente elucidado. A resposta hipertrófica associada à produção de citocinas, aumento do estresse oxidativo e dano ao DNA⁴⁴ são fatores que induzem à ocorrência de apoptose mesmo em cardiomiócitos não isquêmicos na borda do infarto, contribuindo assim para a expansão da lesão e remodelamento ventricular.⁴⁵

O componente central dessa maquinaria apoptótica é um sistema proteolítico envolvendo uma família de proteases chamada caspases. Essas enzimas participam de uma cascata ativada em resposta aos agentes pró-apoptóticos citados e culmina na clivagem de diversas proteínas, resultando em desestruturação da célula. A ativação desse sistema pode ser feita por uma via extrínseca, dependente de receptores de citocinas (em especial os relacionados ao TNF) na membrana celular, ou pela via intrínseca representada pelas proteínas da família bcl-2 localizadas na membrana mitocondrial externa.

Neste cenário, entende-se a necessidade do conhecimento básico sobre a fisiopatologia da miocardiopatia isquêmica, dos mecanismos de ativação celular e controle humoral e da importância dos estudos pré-clínicos para testar novas formas de terapia para a IC.

1.4 MODELO EXPERIMENTAL

Os estudos de infarto em modelos experimentais, através da ligadura da artéria coronária descendente anterior (DA) por fio cirúrgico, já vêm sendo feitos há mais de 50 anos.⁴⁶ Os primeiros modelos experimentais utilizados rotineiramente foram em cães, porém as dificuldades de trabalhar com esses animais levaram a buscas constantes de novos protocolos experimentais.

Procurando modelos animais mais adequados para indução de IAM, foram feitas tentativas com diversos mamíferos como ratos, camundongos, hamsters e cobaias. A ligadura da DA como método experimental já é bem documentada em ratos⁴⁷ e foi aprimorada em camundongos.^{15,48-50}

O desenvolvimento de camundongos transgênicos, que expressam proteínas fluorescentes ubiquamente ou sobre controle de promotores específicos,⁵¹ ou ainda que apresentam deleção^{52,53}/ inclusão seletiva de genes, torna os camundongos os animais de escolha entre os modelos experimentais de IAM.

Além disso, a anatomia coronariana do camundongo é semelhante à de outros mamíferos,¹⁵ inclusive o homem, quanto à irrigação da parede anterior. A 2mm da válvula aórtica ramificam-se duas coronárias: direita e esquerda. A coronária direita ramifica-se em duas outras artérias que irão suprir o ventrículo direito e a região septal. A coronária esquerda apresenta dois padrões comuns de variação anatômica: 1) DA origina-se do tronco da coronária esquerda e segue até o

ápice como uma única artéria; 2) a DA bifurca ainda próximo ao tronco da coronária esquerda dando origem à artéria *diagonalis*, e ambas seguem até o ápice. Anatomicamente, a DA parece ser a principal artéria nutridora do ventrículo esquerdo.⁵⁴

Isquemia e Reperusão

Dentre os modelos de IAM, a lesão por isquemia e reperusão (IR) é a que mais se aproxima da realidade clínica, uma vez que o restabelecimento precoce do aporte sanguíneo é a base do tratamento clínico dos pacientes que sofreram IAM, seja pela abertura mecânica dos vasos ocluídos seja pela angioplastia com colocação de endopróteses expansíveis (*stents*), ou ainda pela reperusão farmacológica através do uso de trombolíticos.⁵⁵

A adaptação desta situação à bancada é feita pela ligadura temporária da DA, na qual a sutura da região em questão é feita de modo transiente, permitindo a reperusão da área ocluída após o período determinado de isquemia.^{48,56-59}

A duração do período isquêmico é o principal determinante do tamanho do infarto. Michael e colaboradores⁴⁸ demonstraram, através de análises histológicas e funcionais, que intervalos de isquemia acima de 120 minutos geravam disfunções idênticas a uma oclusão permanente (OP) da DA e, sendo assim, teriam a mesma evolução e prognóstico.

Essa é a reprodução do que ocorre na clínica, em que se observa um aumento de morbimortalidade em pacientes que são submetidos à terapia de reperusão acima de um período de 4 horas do início dos sintomas isquêmicos.⁶⁰ Vários trabalhos mostram que a terapia de reperusão deve ser instaurada até 90 minutos após o início da sintomatologia, acima do qual há graves prejuízos funcionais.^{55,61,62}

A reperusão, apesar de ser uma medida de tratamento, também pode resultar em uma série de eventos deletérios, tais como necrose celular, lesão de microvasculatura, disfunção endotelial, ativação de granulócitos, acentuado edema celular e restauração não uniforme do fluxo para todas as porções do tecido.⁶³⁻⁶⁵ Sendo assim, pacientes que recebem essa terapia ainda apresentam disfunções que, dependendo do grau, podem evoluir para insuficiência cardíaca.

A atual terapia medicamentosa da insuficiência cardíaca visa a atenuar a sintomatologia e frear o processo de falência miocárdica que, em última instância, obriga o paciente a ser submetido a transplante cardíaco.

1.5 TRANSPLANTE DO CORAÇÃO

Para o doente terminal, o transplante cardíaco continua sendo reconhecido como a melhor modalidade de tratamento, mesmo não tendo sido testado em estudos randomizados controlados.⁶⁶ Avanços importantes na seleção do receptor, manutenção do doador, novas drogas imunossupressoras, avanços no diagnóstico de rejeição e experiência no manuseio pós-transplante foram fundamentais para a melhoria do sucesso desse procedimento terapêutico.⁶⁷⁻⁷⁰

Os pacientes candidatos a transplante são aqueles com doença avançada, classe funcional IV permanente, ou III intermitente com IV, com sintomas severos e incapacitantes, sem alternativa de tratamento e com alta mortalidade em um ano.¹³ Há consenso entre os especialistas de que o transplante cardíaco deve ser reservado para aqueles pacientes que melhor se beneficiam em termos de qualidade de vida e sobrevida. Devido à diversidade socioeconômica da população brasileira, uma criteriosa avaliação deve ser realizada buscando-se identificar: aceitabilidade, condições sociais, padrão educacional e dinâmica familiar.

Seja pelo alto custo, por complexidade técnica ou por indicações restritivas, o transplante cardíaco falha em atender à demanda. Assim, apesar de todos os esforços, a insuficiência cardíaca na sua forma avançada, permanece com mortalidade de 30%-40% no primeiro ano.^{71,72}

1.6 TERAPIA CELULAR

Neste cenário, a comunidade científica busca alternativas terapêuticas para reduzir a morbimortalidade desses pacientes. Uma das mais promissoras possibilidades é a terapia celular. O uso de terapia celular em portadores de IC crônica ainda se reveste de incertezas quanto ao método de seu implante, assim como sobre o melhor tipo celular.⁷³ Estudos preliminares realizados no Brasil têm demonstrado efeito benéfico para pacientes com insuficiência cardíaca.^{74,75} O método é promissor, porém ainda são necessários estudos prospectivos

randomizados e com maior número de pacientes para que possa ser adotado como terapêutica estabelecida.^{76,77}

Dentre as células estudadas, as de medula óssea parecem ser uma população promissora, uma vez que são de fácil obtenção e manipulação, o problema da rejeição pode ser evitado pelo transplante autólogo e não há dilemas éticos e religiosos envolvendo o seu uso.

1.7 MEDULA ÓSSEA

A medula óssea é encontrada no canal medular dos ossos longos e nas cavidades dos ossos esponjosos. Durante o desenvolvimento fetal, a geração de células sanguíneas, chamada de hematopoiese, ocorre inicialmente em ilhotas sanguíneas do saco vitelino e do mesênquima para-aórtico. A partir do primeiro mês de vida intrauterina, inicia-se a hematopoiese no fígado, principal local de formação de células do sangue no período fetal, e no baço. Essa função é assumida de modo gradual pela medula óssea, cuja produção aumenta à medida que a produção hepática decai. Ao nascimento a medula óssea é o principal local de produção de células sanguíneas do organismo e assim se mantém por toda a vida do indivíduo.⁷⁸

O tecido hematopoiético da medula óssea é constituído por células e fibras reticulares que formam uma esponja percorrida por inúmeros capilares sinusoides. Entre as células reticulares existe um número variável de macrófagos, células adiposas, células precursoras dos eritrócitos, granulócitos, monócitos, plaquetas e células-tronco indiferenciadas.

A primeira e mais bem caracterizada população de células-tronco encontrada na medula compreende as células-tronco hematopoiéticas (HSC – em inglês *hematopoietic stem cell*), responsáveis pela produção de todas as células sanguíneas.⁷⁹ A segunda, é representada pelas células-tronco mesenquimais (MSC – em inglês *mesenchymal stem cell*), que são células estromais não hematopoiéticas, extremamente raras em condições fisiológicas na medula óssea (menos que 0,1% do total da população celular).⁸⁰

O suprimento contínuo de eritrócitos e precursores de tecido linfóide é mantido pelas HSC, células multipotentes, que se autorrenovam, podendo ser mobilizadas da medula para a circulação periférica mediante estímulos específicos.⁸¹ A medula óssea é um tecido hierarquicamente organizado, com raras populações de

HSC, originando descendentes que vão perdendo seu potencial de autorrenovação e sua capacidade de diferenciação, tornando-a mais e mais restrita, para finalmente originarem células diferenciadas maduras.⁸²

A presença de células-tronco não hematopoiéticas na medula óssea foi observada há cerca de 130 anos pelo patologista alemão Cohnheim. Em seu trabalho ele sugeriu que a medula óssea poderia ser fonte de fibroblastos que depositam fibras colágenas como parte do processo normal de cicatrização.⁸³

Friedenstein e colaboradores foram os primeiros a relatar a existência de uma população de células-tronco no estroma de medula óssea com capacidade de se diferenciar em outras células mesenquimais. Neste trabalho, as células da medula óssea foram colocadas em frascos de cultura e após quatro horas as células não aderentes foram removidas, descartando assim as células hematopoiéticas. As células aderentes foram descritas como células de aparência variada, mas após algumas passagens em cultura mostravam-se morfologicamente mais homogêneas, delgadas, afiladas, semelhantes a fibroblastos. Eles também demonstraram que essas células se diferenciavam em pequenas colônias que apresentavam depósitos de osso e cartilagem.⁸⁴

As observações iniciais de Friedenstein foram reproduzidas por um extenso número de investigadores, particularmente pelos grupos de Piersma⁸⁵⁻⁸⁷ e de Owen^{88,89}. Estes e outros estudos posteriores estabeleceram que as MSC, isoladas de maneira relativamente simples, são multipotentes e capazes de se diferenciarem em osteoblastos, condroblastos, adipócitos e mioblastos.⁹⁰⁻⁹⁵

Estas células foram denominadas células-tronco mesenquimais devido a sua habilidade de se diferenciar em outros tipos celulares ou ainda células-tronco estromais de medula porque parecem surgir do complexo conjunto de estruturas de suporte encontrado na medula.⁹⁶

1.8 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE MEDULA ÓSSEA

Segundo a Sociedade Internacional de Terapia Celular, as células multipotentes mesenquimais de estroma de medula óssea humana são aquelas que apresentam aderência à placa de cultura *in vitro*, expressão específica de antígenos de superfície de membrana e potencial de diferenciação.^{97,98}

A amostra de células plástico-aderentes deve apresentar em mais de 95% dos eventos analisados por citometria de fluxo os antígenos de membrana CD105 (endogлина), CD73 (ecto-5'nucleotidase) e CD90 (Thy-1). Além disso, deve ser apresentada expressão menor que 2% em marcadores comprometidos com a linhagem hematopoiética como CD45 (antígeno comum dos leucócitos), CD34 (expresso principalmente em precursores de células hematopoiéticas e células endoteliais), CD14 (receptor LPS) ou CD11b (integrina α M, expresso principalmente em granulócitos, macrófagos e células NK), CD79a (Ig α , expresso principalmente em linfócitos B maduros) ou CD19 (B4, expresso na maioria dos linfócitos B), além de não expressar HLA (antígeno leucocitário humano) de classe II.

A principal característica que identifica as MSC é a capacidade de se diferenciar em três linhagens mesenquimais. Assim, sob condições e estímulos específicos *in vitro*, essas células devem se diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condroblastos.

1.9 VIAS DE ADMINISTRAÇÃO

Ainda não há consenso sobre a melhor forma de administração das células-tronco. Os principais estudos em humanos apresentam grande variedade de vias, além de diferentes tempos de tratamento após o diagnóstico de IAM.⁷⁷

As vias diretas de terapia incluem diferentes rotas, como a intramiocárdica, intracoronariana, intravenosa, endomiocárdica, venosa retrógrada e transvenosa intramiocárdica. Faltam estudos randomizados e meta-análises para definir qual a melhor opção, porém a via intracoronariana é mais vantajosa quando se aborda o paciente com intervenção coronariana percutânea,⁹⁹ sendo a mais utilizada nos principais estudos multicêntricos randomizados. No estudo BOOST, primeiro estudo clínico randomizado e controlado, células mononucleares de medula óssea foram administradas por via intramiocárdica em 30 pacientes. Quando comparados ao grupo-controle, evidenciou-se, no grupo que recebeu as células, melhora da fração de ejeção ao final de seis meses.¹⁰⁰ Utilizando protocolo semelhante porém com amostragem maior (204 pacientes), o estudo REPAIR AMI também encontrou maior fração de ejeção utilizando ventriculografia.^{101,102} Meluzin e colaboradores estratificaram 66 pacientes em grupos iguais que receberam baixa dose de células

mononucleares de medula óssea (1×10^7) e alta dose (1×10^8) comparados ao grupo-placebo, constatando aumento da fração de ejeção de maneira dose-dependente.

A mobilização de células da medula óssea através de citocinas, representando a via indireta de tratamento, mostrou-se inicialmente em alguns modelos experimentais capaz de induzir a angiogênese e restaurar o miocárdio lesado.^{103,104} Entretanto, a administração de G-CSF na maioria dos estudos pré-clínicos e multicêntricos randomizados não foi eficaz.¹⁰⁵⁻¹⁰⁹ Ellis e colaboradores compararam diferentes doses de G-CSF aplicadas a pacientes cinco dias após o IAM e 30 horas após intervenção percutânea e não observaram diferença na função ventricular quando comparados aos grupos-controle.¹¹⁰

A injeção intravenosa de células, como no transplante de medula óssea, em pacientes com miocardiopatia representa uma estratégia interessante por ser uma via pouco invasiva que possibilita injeções repetidas com baixo risco para o paciente. Alguns estudos pré-clínicos evidenciaram melhora da função ventricular em porcos infartados que receberam MSC por via intravenosa (IV).^{111,112}

As células mononucleares utilizadas na maioria dos estudos em animais apresentaram resultados animadores; porém nos protocolos clínicos os resultados variam de positivos a ausentes ou transitórios em pacientes com miocardiopatia isquêmica. Como alternativa, as MSC estão sendo utilizadas em um número crescente de estudos, entretanto várias questões sobre seu uso necessitam ser elucidadas.

2 OBJETIVOS

Levando em consideração a importância que as doenças isquêmicas representam para a população, tanto no aspecto de saúde pública quanto pelo impacto econômico, e considerando as perspectivas recentes de estudos e emprego de novas terapias celulares, o presente trabalho, utilizando o camundongo como modelo experimental, tem como objetivos principais:

- Investigar o potencial terapêutico da administração de células mesenquimais de medula óssea por injeção intramiocárdica infarto cicatrizado em modelo de oclusão permanente da artéria descendente anterior, em fase crônica;
- Avaliar se a administração de células mesenquimais por via intravenosa em modelo de isquemia e reperfusão miocárdica, no período crônico, possui benefício funcional e se a injeção seriada é uma opção viável e com potencial terapêutico.

Objetivos específicos:

- Caracterizar os modelos de oclusão permanente e isquemia transitória da artéria descendente anterior, através de parâmetros funcionais e histológicos;
- Isolar e caracterizar as células mesenquimais de medula óssea;
- Avaliar o perfil de expressão gênica de corações infartados e tratados com injeção intramiocárdica de células mesenquimais.

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Camundongos machos e fêmeas C57BL/6 de oito semanas, pesando entre 20g e 25g, fornecidos pelo biotério do Programa de Bioengenharia e Biotecnologia Animal, foram disponibilizados para os protocolos de lesão miocárdica por oclusão permanente ou isquemia e reperfusão. Os animais C57BL/6 eGFP, cedidos pelo Prof. Okabe⁵¹ e mantidos no biotério com livre acesso à água e ração, foram utilizados como doadores de células de medula óssea. A terapia celular foi feita por via intramiocárdica nos animais infartados por OP enquanto os animais infartados por IR receberam as células por via intravenosa. Animais do grupo-placebo receberam o mesmo volume do veículo pelo qual as células foram administradas.

Todos os procedimentos seguiram os protocolos aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências da Saúde (CEUA-CCS) sob a identificação IBCCF 026/2008 (Terapia celular em modelo experimental de infarto do miocárdio em camundongo) e do Guia de Cuidado e Uso de Animais de Laboratório.¹¹³

3.2 INDUÇÃO DO INFARTO DO MIOCÁRDIO

Anestesiava-se o animal, após pesagem, utilizando-se cloridrato de xilasina (Anasedan®) na dose de 20mg/kg e cloridrato de quetamina (Dopalen®) na dose de 80mg/kg, ambas na mesma seringa e aplicadas por via intraperitoneal. Após 2 minutos, o animal perdia o reflexo postural sendo fixado a uma pequena mesa cirúrgica em decúbito dorsal. Em seguida, procedia-se à antissepsia com álcool a 70% na altura do pescoço e tronco ventral (Figura 1A) e realizava-se um pequeno acesso, 5mm acima da fúrcula esternal. Divulcionavam-se as estruturas anatômicas de forma a se visualizar a traqueia e a cartilagem cricotireoide, o que permitia a sua punção com jelco 24 (Figura 1B), mimetizando uma cricotireoideostomia e possibilitando o acoplamento do animal a um ventilador (*Harvard Apparatus; Holliston, MA*) previamente ajustado (ar comprimido / volume corrente de 0,2ml / FR: 120irpm até 160irpm). Após a instalação do suporte ventilatório, realizava-se o acesso a cavidade torácica na região paraesternal na altura do 4º espaço intercostal esquerdo com o auxílio de um bisturi (nº15). Divulcionava-se a musculatura torácica

(peitoral maior e menor) de forma a visualizar os 4^o e 5^o espaços intercostais à esquerda. Com auxílio de uma tesoura pontiaguda, acessava-se o espaço acima daquele que melhor se observava o *ictus cordis* (Figura 1C). Realizava-se o pneumotórax e, com o auxílio de uma tesoura, alargava-se o espaço acessado, de forma a visualizar o coração (Figura 1D). Com auxílio de afastadores, identificava-se a região interseptal abaixo da aurícula esquerda onde era feita a ligadura com fio 7-0 mononylon (Figuras 1E e 1F).

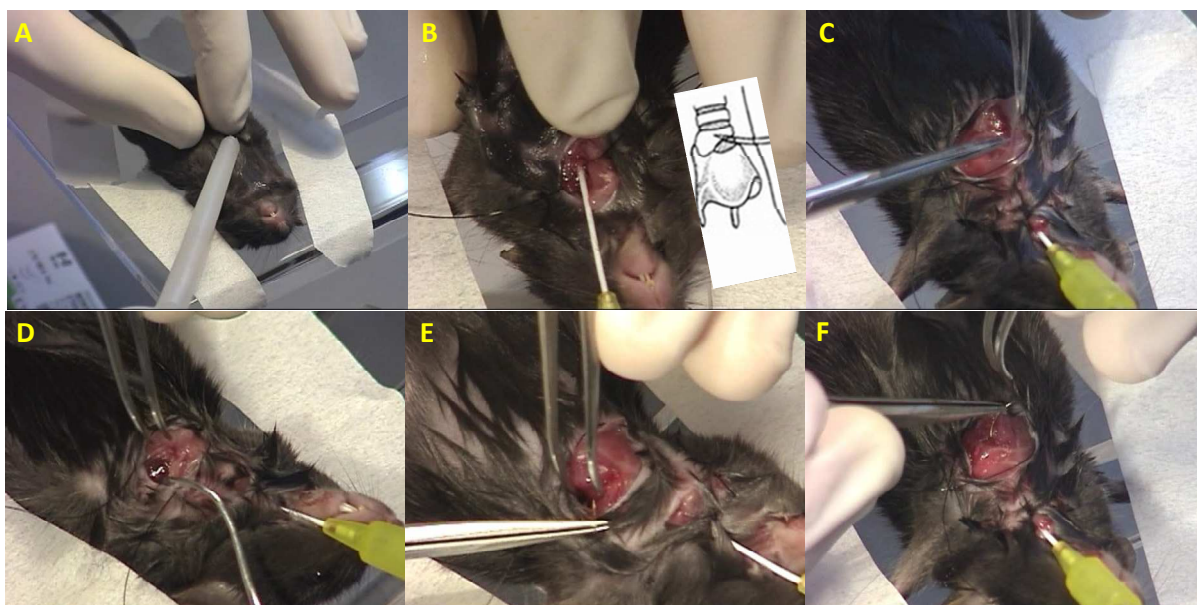


Figura 1 – Representativo do procedimento cirúrgico comum ao protocolo de oclusão permanente e isquemia e reperfusão.

Em A observa-se a fixação do animal à mesa cirúrgica e antissepsia. O acesso ventilatório foi realizado através de cricotireoideostomia (B), permitindo assim a realização da toracotomia (C), exploração da cavidade torácica (D e E) e realização da ligadura.

Nesta etapa, dois modelos de lesão isquêmica podiam ser obtidos: OP e IR. Para a indução do infarto por OP, o ponto cirúrgico era feito diretamente sobre a musculatura cardíaca; para a realização do protocolo de IR a sutura era realizada sobre um aparato de polietileno (PE10 – Figura 2).

Após 90 minutos de isquemia, o PE10 era removido, permitindo a reperfusão do tecido isquêmico.¹¹⁴ O animal era desmamado do suporte ventilatório gradualmente, mediante o retorno dos reflexos de retirada. Durante o período de isquemia, o animal permanecia em plano anestésico e com acesso respiratório. Ao final do período isquêmico, o animal retornava ao campo cirúrgico e novamente era acoplado ao ventilador. A sutura da pele era desfeita e a cavidade torácica exposta novamente, visualizando-se o coração. Abaixo da ligadura sobre o aparato, o

miocárdio apresentava-se esbranquiçado. Com o auxílio de uma pinça e uma tesoura de Vannas o ponto simples era removido, permitindo a reperfusão. A síntese da pele era concluída e o animal retornava à gaiola mediante retorno dos reflexos posturais.

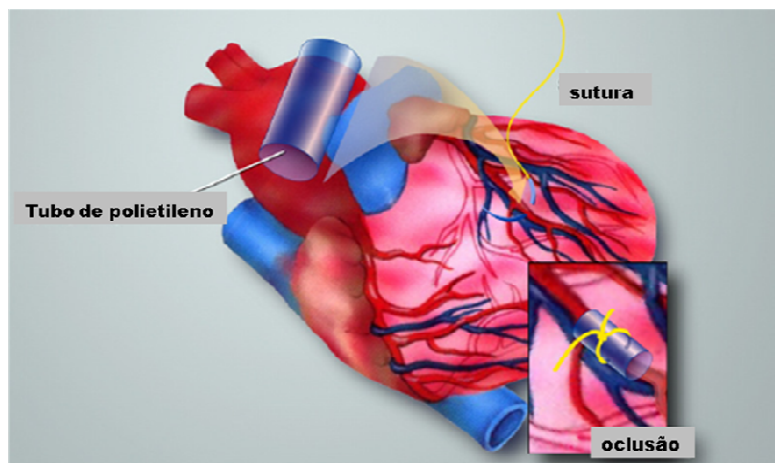


Figura 2 – Esquema representativo do aparato para oclusão transitória da coronária descendente anterior.

Adaptado de Klocke R, et al. Surgical animal models of heart failure related to coronary heart disease. *Cardiovasc Res.* 2007;74:29-38.

3.3 MARCADORES DE NECROSE MIOCÁRDICA

As análises dos níveis séricos de troponina I (cTn) e enzima creatinafosfoquinase específica para o músculo cardíaco (CK-MB) foram realizadas três dias após o IAM. As caudas dos animais eram cortadas e o sangue retirado por capilares heparinizados. O transporte do material até um laboratório clínico especializado foi feito em recipientes térmicos a 4°C. O intervalo entre a coleta de material e a sua análise não ultrapassou seis horas. As amostras foram centrifugadas a 1000G por 10 minutos e o soro analisado por técnica de química seca contendo anticorpos antitroponina I e CK-MB (*Opus™*). As dosagens foram realizadas utilizando testes enzimáticos desenvolvidos para humanos em laboratório privado. Somente foi considerado infartado o animal que apresentasse níveis séricos de troponina I $\geq 0,3\mu\text{g/mL}$.

3.4. REGISTRO ELETROCARDIOGRÁFICO

Para o registro eletrocardiográfico, fixaram-se dois eletrodos no tecido subcutâneo dos animais na linha axilar posterior até três dias antes da cirurgia de ligadura da DA. Isso possibilitou a análise eletrocardiográfica da derivação convencional D1 de forma contínua e com o animal fora do plano anestésico. Utilizou-se o aparelho *BIO AMP da ADInstrument*, calibrado para a velocidade de 50mm/s e voltagem de 20mm=1mV e o programa *Chart* versão 5.0 para as análises subsequentes. O critério empregado para a determinação do IAM foi a observação de onda Q patológica (primeira onda negativa do complexo QRS maior do que 1/3 da primeira onda positiva que sucede) ou desvio do eixo além de 90° (complexo QRS negativo) na derivação D1 do registro eletrocardiográfico.¹¹⁵⁻¹¹⁷ Isso significa que o eixo de despolarização ventricular desviou-se para a direita, devido à inatividade elétrica da parede lesada. Além da presença de onda Q, observou-se a presença de elevação do segmento ST na vigência de estímulo isquêmico.

3.5 ESTUDO ECOCARDIOGRÁFICO

Para a realização do ecocardiograma (ECO), anestesiavam-se os animais por inalação com isoflurano 1,5% (Cristália), tricotomizados na região torácica anterior e fixados à plataforma aquecida do equipamento. Durante todo o protocolo eram monitoradas: frequência cardíaca, respiratória e temperatura corporal dos camundongos. Inicialmente, utilizou-se o equipamento *Vivid7 - GE* com transdutores eletromecânicos de 13,0MHz e *software* específico para camundongo, permitindo a aquisição de imagens com profundidade de 6mm nos modos unidimensional e bidimensional, além das análises das velocidades de fluxo, utilizando-se as técnicas de Doppler pulsátil e contínuo, como também do mapeamento de fluxo em cores. Posteriormente, o laboratório adquiriu o equipamento *Vevo 770* específico para camundongos (*Visual Sonics*, Toronto, Canadá). Os transdutores eletromecânicos de 30,0MHz eram utilizados em contato com uma grande camada de gel (*Carbogel*) sobre o tórax dos animais. As análises foram feitas com ECG contínuo, permitindo a sincronização dos fenômenos elétricos e mecânicos.

Analisou-se a geometria cardíaca, utilizando-se o modo unidimensional (Modo-M) para avaliar os seguintes parâmetros: dimensão do átrio esquerdo (AE), dimensão da aorta (Ao), relação AE/Ao, espessura da parede posterior (PP) do VE em sístole e diástole, espessura do septo interventricular em sístole e diástole,

diâmetro da cavidade ventricular ao final da sístole (VEs), diâmetro da cavidade ventricular ao final da diástole (VEd). As medidas de volumes, fração de ejeção (FE%) e encurtamento (FS%) foram realizadas em modo bidimensional.

No caso da função diastólica, utilizaram-se os índices derivados da velocidade de fluxo transmitral obtidos pela técnica de Doppler pulsátil. Tais índices compreenderam a onda E (maior valor da velocidade de fluxo inicial do enchimento ventricular), onda A (maior valor da velocidade de fluxo telediastólico mitral), relação E/A (razão entre as velocidades máximas das ondas E e A) e tempo de relaxamento isovolumétrico.

O mesmo operador realizou os exames de todos os grupos nos mesmos dias, desconhecendo a procedência dos animais quanto aos grupos experimentais a que pertenciam.

3.6 ANÁLISE ERGOESPIROMÉTRICA

Antes de cada exame, os animais eram pesados. Para a mensuração do consumo de oxigênio (VO_2), produção de dióxido de carbono (VCO_2), taxa de troca respiratória (RER) e limiar anaeróbio utilizou-se uma câmara ergoespirométrica (*AccuScan Instruments, Model LC2/M, USA*). O influxo de ar ambiente era de 680ml/min, assim como o efluxo. Este último era conectado a um analisador simultâneo de gases (oxigênio e gás carbônico) (*Sable Systems FC-1B O_2 e CA-2A CO_2 Analyzers, USA*). Realizou-se o teste ergométrico com inclinação da esteira fixa a 10°. Os animais eram colocados na câmara para adaptação de cinco minutos antes de iniciar o exercício. A partir desse momento, os camundongos corriam por 5 minutos em diferentes velocidades (0,1m/s; 0,2m/s; 0,3m/s e 0,4m/s) e eram mantidos na velocidade máxima até a exaustão. Na porção final da esteira havia uma rede energizada para manter o animal correndo continuamente. A exaustão foi definida quando o camundongo permanecia recebendo choque por mais de 15 segundos. O consumo máximo de oxigênio foi calculado pela fórmula: $[(VO_2 \text{ Final} - VO_2 \text{ adaptação de 5min} / 100) \times 680\text{ml}] / \text{peso (kg)}$. As curvas de VO_2 e CO_2 foram superpostas e o limiar anaeróbio foi determinado pelo ponto de mudança brusca da produção de CO_2 quando comparada com a curva de VO_2 .

O mesmo operador realizou os exames de todos os grupos nos mesmos dias, desconhecendo a procedência dos animais quanto aos grupos experimentais.

3.7 CULTURA DE CÉLULAS MESENQUIMAIS

Isolamento das Células de Medula Óssea

Para isolamento da fração mononuclear das células de medula óssea (CMMO), os fêmures e as tíbias de camundongos GFP eram retirados em fluxo laminar. O restante do procedimento realizou-se em condições estéreis. Com auxílio de pinças e tesouras, retirou-se o tecido em volta dos ossos, cortadas as duas epífises de cada osso e, com auxílio de uma seringa de 5ml, aplicou-se meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) sem soro no interior dos ossos, coletando-se, em seguida, a medula em um tubo de 15ml. Dissociavam-se as células com pipeta Pasteur e os tubos centrifugados por 5 minutos a 250xg. Após a centrifugação, o precipitado era ressuspenso em 2ml de meio DMEM e aplicado sobre 2ml de Ficoll (*Histopaque 1083, Sigma*) em um tubo de 15ml. Em seguida, centrifugavam-se os tubos por 25 minutos a 450xg. Formava-se, então, um anel correspondente às células mononucleares. Essas células eram recolhidas e transferidas para um novo tubo, onde eram lavadas três vezes com salina tamponada com tampão fosfato 10mM pH7,4. O sedimento de células era ressuspenso em 1mL de solução salina, seguindo-se a contagem das células.

Após a obtenção das CMMO (conforme descrito acima), estas eram plaqueadas na densidade de 2×10^7 células/mL em frascos de poliestireno de 25cm² contendo DMEM acrescido de 20% de soro fetal bovino (SFB), suplementado com 2mM de L-glutamina, antibióticos (penicilina 100IU/mL e estreptomicina 100mg/mL), e mantidas a 37°C em estufa com atmosfera úmida em presença de 5% de CO₂. No terceiro dia de cultivo, descartava-se o meio de cultura e as HSC bem como removiam-se da cultura as células não aderentes. As células aderentes eram lavadas duas vezes com salina e meio DMEM completo era adicionado à cultura. Quando as células alcançavam 60-70% de confluência, eram removidas dos frascos de poliestireno de 25cm² através da adição de tripsina-EDTA 0,25%. Repetiu-se esse procedimento por três vezes, a fim de se obter uma cultura rica em MSC.

Análise por Citometria de Fluxo

Para determinar o padrão de proteínas de superfície, as MSC foram analisadas por citometria de fluxo. Resumidamente, as células em cultura foram lavadas em PBS e dissociadas pela incubação com solução não enzimática a 37°C por 5 minutos. As mesmas foram ressuspensas em PBS e centrifugadas a 300xg por 5 minutos. Após centrifugação, as células foram ressuspensas em 100µl de PBS, passadas em filtro de 100µm de poro e contadas na câmara de Neubauer. A suspensão de células foi avolumada com PBS de modo que, a cada 100µl, detinha-se $1,5 \times 10^5$ células. Em seguida, colocou-se 100µl da suspensão de células em tubos para citometria (12x75mm; BD Falcon). A cada tubo foram adicionados 3µl de anticorpos monoclonais (CD34 e CD45) que foram incubados por 20 minutos ao abrigo da luz. Após o período de incubação, as células foram lavadas uma vez com PBS e ressuspensas em 200 µl de PBS e analisadas no citômetro (*FACS Aria Cell Sorter; Becton Dickinson*). Utilizou-se o tubo que não possuía anticorpo como parâmetro de calibração do aparelho. No mínimo, 50000 eventos foram coletados e analisados com o *BDFacs Diva Software*.

Ensaio de Diferenciação

Para verificar a potencialidade das MSC, as mesmas foram cultivadas em meios indutores de diferenciação por 21 dias. MSC de mesma passagem cultivadas em *DMEM Low Glucose* pelo mesmo período de tempo foram utilizadas como controle. A seguir, descrevem-se os protocolos utilizados em cada tipo de indução.

Indução adipogênica

As MSC eram plaqueadas em placas de 6 poços (TPP®) a uma densidade de 10^4 células/cm² e, após 72 horas, cultivadas em meio de indução adipogênica por 21 dias. O meio adipogênico é composto por *DMEM Low Glucose (Sigma-Aldrich)* acrescido de 15% de SFB, suplementado com 10^{-7} M de dexametasona, 2,07µM de insulina e 0,45mM de 3-isobutil-1-metilxantina (*IBMX; Sigma-Aldrich*). Ao fim do protocolo de indução, as células foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato por 20 minutos a 37°C e lavadas três vezes com PBS. Para identificar a presença de acúmulos intracelulares de triglicerídeos neutros, as células foram incubadas por 15 minutos com óleo vermelho O 0,5% (*Sigma-Aldrich*) em

temperatura ambiente. Retirava-se o excesso de corante com lavagens em água destilada.

Indução Osteogênica

Para esta indução, as MSC foram plaqueadas em placas de 6 poços (TPP®) a uma densidade de 10^4 células/cm² e, após 72 horas, cultivadas em meio de indução osteogênica por 21 dias. O meio osteogênico é composto por DMEM *Low Glucose* acrescido de 15% de soro fetal bovino (SFB), suplementado com 10^{-7} M de dexametasona, 10mM de β -glicerolfosfato e 0,5 μ M de ácido ascórbico. Ao final dos 21 dias de indução, as células foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato por 20 minutos a 37°C e lavadas três vezes com PBS. Para identificar a presença de acúmulos de cálcio, as células foram incubadas por 15 minutos com o corante vermelho de alizarina 1% (*Sigma-Aldrich*) em temperatura ambiente. Retirou-se o excesso de corante com lavagens em água destilada.

Marcação celular

Após a contagem, as células GFP MSC foram coradas com os marcadores Hoescht® (Sigma) e Cell Tracer® (Invitrogen). Ambos os corantes foram adicionados sobre o sedimento de células e homogeneizado. As células privadas de luz foram incubadas em estufa com atmosfera úmida em presença de 5% de CO₂ (*Thermo Forma*) durante 20 minutos. Uma vez marcadas, as células foram centrifugadas a 250xg durante 5 minutos à temperatura ambiente. Repetiu-se este processo seis vezes para a retirada do possível excesso dos corantes. Ao final da última centrifugação, ajustou-se o volume de acordo com o número de células necessárias para o transplante celular.

3.8 TRANSPLANTE CELULAR POR VIA INTRAMIOCÁRDICA

Dez dias após a cirurgia de infarto, os animais eram anestesiados e acoplados ao ventilador previamente configurado com os mesmos parâmetros utilizados no protocolo de indução da lesão isquêmica.

Realizava-se a toracotomia seguindo as etapas de incisão cutânea, divulsionamento dos músculos da região e toracotomia propriamente dita no quinto

espaço intercostal à esquerda. Nesse momento, o coração era visualizado e a região do infarto facilmente identificada pela presença de cicatriz (área esbranquiçada). Procedia-se à injeção de $1,5 \times 10^4$ de GFP-MSC (grupo experimental) ou Matrigel (BD Biosciences)(grupo-controle) na borda da cicatriz, adjacente ao músculo cardíaco íntegro, no volume de $30 \mu\text{L}$, dividida em três injeções em diferentes pontos.

Após a injeção intramiocárdica, realizava-se a toracorráfia como descrita para a produção do infarto e os animais eram retirados do ventilador mecânico somente quando apresentassem movimentos respiratórios espontâneos.

Ao final de duas a três horas, período em que os animais eram observados quanto a sua condição clínica, cirúrgica e pós-anestésica, eram recolocados em suas gaiolas, levados ao biotério e mantidos com água e ração *ad libitum*.

3.9 TRANSPLANTE CELULAR POR VIA INTRAVENOSA

Obedecendo à mesma cronologia do protocolo de injeção intramiocárdica, os animais infartados eram anestesiados e após perda dos reflexos posturais fixados à mesa cirúrgica, tricotomizados e submetidos à assepsia com álcool etílico 70%. Realizou-se uma pequena incisão paratraqueal direita a 2mm da clavícula para que a veia jugular externa pudesse ser facilmente visualizada após leve divulsão do tecido subcutâneo. Com uma pequena seringa de insulina (*BD ultrafine II 30UI, BD*) punccionava-se a veia jugular e $100 \mu\text{L}$ de solução com 2×10^5 GFP-MSC eram injetados na circulação. Antes da retirada da agulha, ocluía-se a veia temporariamente com o auxílio de dois *clamps*, posicionados cefálica e caudalmente ao local da punção. Após 1 minuto, desobstruía-se a veia jugular e o seu fluxo era restabelecido. Na ausência de sangramento, suturava-se a pele com fio mononylon 5-0.

3.10 HISTOPATOLOGIA

Foi infundida uma solução de heparina sódica (Liquemine®, Roche Brasil), 10UI/10g de peso corporal, diluída em solução salina por via intraperitoneal. Sob anestesia com isoflurano (Cristália) os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Realizada incisão mento-pubiana na pele e retirada do gradil costal anterior

com o auxílio de tesoura e pinça cirúrgica. Em seguida, puncionava-se o ventrículo esquerdo com uma agulha 23 gauge e conectava-se a uma bomba peristáltica enquanto o átrio direito era seccionado. Perfundia-se o animal, inicialmente, com 30ml de PBS durante 10 minutos e após com 30ml de formalina 4%. Após completa retirada do sangue e fixação inicial, seccionava-se o coração em três partes de mesma espessura.

Para a determinação da área isquêmica 24 horas após a cirurgia, as fatias do coração foram colocadas durante 10 minutos em solução de TTC 1% (cloreto 2,3,5-trifeniltetrazólio) a 37°C. Esta técnica marca em vermelho o miocárdio viável e em branco o tecido isquêmico. O cálculo da área de infarto do coração é estimado pela média aritmética da área de infarto de cada secção do órgão

A análise histológica nos protocolos crônicos foi feita com as colorações de hematoxilina e eosina (HE) e picrosirius em tecido emblocado em parafina. Analisou-se o material em microscópio óptico.

3.11 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA

Extração de RNAm

Extraiu-se o RNAm total com a utilização do *Ribopure Kit (Ambion)* a partir do tecido de todo o coração dos animais dos diferentes grupos. Após a extração, o RNA foi ressuspenso em água MilliQ livre de RNase em quantidade suficiente para atingir uma concentração mínima de 1,25µg/mL; as amostras foram analisadas em espectrofotômetro para a determinação da concentração e a pureza do RNA avaliada pela relação entre a absorbância em 260nm e 280nm.

Microarranjo Genético

Compararam-se as amostras de RNAm extraídas de coração total de camundongos dos seguintes grupos: controle, infartado, infartado tratado com células mesenquimais. Para tal, utilizaram-se 14.576 sequências de cDNA produzidos no laboratório especializado em microarranjo de DNA do *Albert Einstein College of Medicine (AECOM, Bronx, Nova Iorque, EUA)* para hibridização. O RNAm extraído foi processado como descrito em Iacobas e colaboradores.¹¹⁸

Resumidamente, foram utilizadas amostras de quatro animais para cada grupo. Cada amostra contendo 60µg RNAm foi transcrito para cDNA, utilizando dUTPs fluorescentes [Cy3-dUTP (verde; g) ou Cy5-dUTP (vermelho; r)]. Foram hibridizadas as seguintes combinações para análise de microarranjo: animais não infartados, animais infartados sem tratamento e animais infartados tratados com GFP-MSC. Os cDNA marcados foram hibridizados a 50°C. Após hibridização, as lâminas foram lavadas com solução contendo 0,1% dodecil sulfato de sódio (SDS) e 1% SSC (3 M NaCl + 0.3 M citrato de sódio) para remover os cDNAs não hibridizados.

Após secagem, as amostras foram imediatamente escaneadas em um scanner especial para microarranjos (*GeneTAC LS IV microarray scanner, Genomic Solutions*). Para o processamento das imagens, alinhamento dos pontos e integração dos arquivos gerados pelas imagens e geração de relatório de intensidade dos dados utilizou-se o programa *GenePix Pro 4.1*. Os dados originais foram normalizados como descrito por Iacobas e colaboradores.^{119,120} O relatório final foi então gerado em forma numérica, em arquivo separado por vírgulas, compatível com *Microsoft Excel* e com o programa de análise estatística SAS.

A razão de expressão entre os grupos estudados foi computada como a média geométrica da intensidade de fluorescência normalizada detectada por cada canal (verde e vermelho) para o mesmo gene. O valor p da razão de fluorescências entre os grupos de estudo foi calculado utilizando-se o teste t de Student para as médias das duas distribuições. Foi considerada diferença estatisticamente significativa valores $p < 0,05$. Todos os genes que apresentaram significância estatística ($p < 0,05$) e variação na expressão maior ou menor que 1,5 ($x > 1,5$ ou $x < 1,5$) foram considerados com expressão aumentada ou diminuída em relação ao grupo-controle, respectivamente. Utilizaram-se os programas *GenMapp* e *MappFinder* (<www.genmapp.org>) para identificar a categoria (*Gene Ontology*) dos genes afetados.

Validação do microarranjo

Para validação dos dados obtidos com a técnica de microarranjo de DNA, observou-se a expressão dos níveis de RNA mensageiro pela técnica de RT-PCR em tempo real nas mesmas amostras de RNAm utilizadas.

Para tal, preparou-se o cDNA com o *kit* de transcrição reversa *High Capacity* (*Applied Biosystems*) de acordo as instruções do fabricante. Os genes Hif1a, Ifnar1, Nos2, Mmp23 e Tlr4 envolvidos na resposta inflamatória foram escolhidos e suas sequências obtidas no *Genebank* (*Bethesda, USA*). As amplificações do RT-PCR foram realizadas em placas de 96 poços do *ABI Prism 7500 Fast Sequence Detector* (*Applied Biosystems*) em reações de 25µl contendo 150nM dos iniciadores (*primers*) senso e anti-senso, *Power SYBR Green Master Mix* (*Applied Biosystems*) e 1µl do cDNA diluído 100X. O programa de amplificação consistiu em 55°C por 2min, 95°C por 10min seguido de 40 ciclos de 95°C por 15s e anelamento a 60°C por 1min. Obtiveram-se dados de curva de dissociação ao final para verificar a especificidade da reação de PCR. Determinou-se a quantidade relativa do RNAm gene específico pelo método do CT comparativo expresso pela fórmula $2^{-(\Delta Ct)}$, onde Ct se refere ao ciclo da reação no qual a amplificação começa a ser detectada, valor que é determinado pelo software *7500 Real-Time PCR System Sequence Detection*. ΔCt é a diferença entre o Ct do RNAm alvo menos o Ct do controle endógeno (beta-actina). A variação na expressão entre os grupos foi obtida com a razão de valor $2^{(\Delta Ct)}$ nos vários grupos tratados pelo valor do grupo normal.

Hif1a (Gene bank accession number NM_010431)

Senso (5'-3') TCAAGTCAGCAACGTGGAAG

Anti-senso (5'-3') TATCGAGGCTGTGTCGACTG

Ifnar1 (Gene bank accession number NC_000082)

Senso (5'-3') TCCCCGCAGTATTGATGAGT

Anti-senso (5'-3') CTGGTCTGTGAGCTGTACTT

Mmp23 (Gene bank accession number NC_00070.5)

Senso (5'-3') CCACGGTGGCATTCACTTTGATGA

Anti-senso (5'-3') CAATGTGGCATTGAGGTGCATGAG

Nos2 (Gene bank accession number NM_010927)

Senso (5'-3') TCCCTGATGACATTCCTTCTT

Anti-senso (5'-3') CATTGGAAGTGAAGCGTTTCG

Tlr4 (Gene bank accession number NM_021297)

Senso (5'-3') CAGCTGGGCTGTACAAACCTT

Anti-senso (5'-3') TGAGCCACATTGAGTTTCTTTA

3.12 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Escolheu-se o teste a ser empregado de acordo com a finalidade e com as características da variável envolvida. Deu-se preferência à utilização de teste paramétrico, porém nos casos onde a variável não tinha uma distribuição normal ou os pressupostos para a sua utilização não podiam ser cumpridos, utilizava-se o teste não paramétrico equivalente. Assim, no caso de comparação entre os dois grupos, por exemplo, oclusão permanente vs. isquemia e reperfusão, foi utilizado o teste t de Student para grupos não pareados ou seu equivalente não paramétrico (Mann-Whitney). Nas comparações entre três grupos optou-se pelo teste de ANOVA uma via e quando a variável tempo foi acrescentada utilizou-se ANOVA de duas vias. Para análise de sobrevivência utilizou-se curva de Kaplan-Meier com teste de Mantel-Cox. Nos casos de significância estatística empregou-se o pós-teste de Bonferroni. Em todos os testes, o grau mínimo de significância considerado foi 95% ($p < 0,05$) ou 99% ($p < 0,01$) e os cálculos realizados no computador, utilizando para tanto o programa *Graph Pad prisma 4*®.

3.13 DESENHO DO ESTUDO

O trabalho foi dividido em quatro fases de acordo com o tipo de protocolo de indução da lesão isquêmica e a via de administração adotada. O primeiro estudo baseou-se no infarto do miocárdio induzido por oclusão permanente da artéria descendente anterior e definição do modelo através de análises eletrocardiográficas, bioquímicas, através da dosagem de marcadores de necrose miocárdica (troponina I e CK-MB), ecocardiográfica, ergoespirométricas e histológicas. Ao final do estudo foi realizada a análise da expressão do RNAm do coração de animais infartados (figura 3).

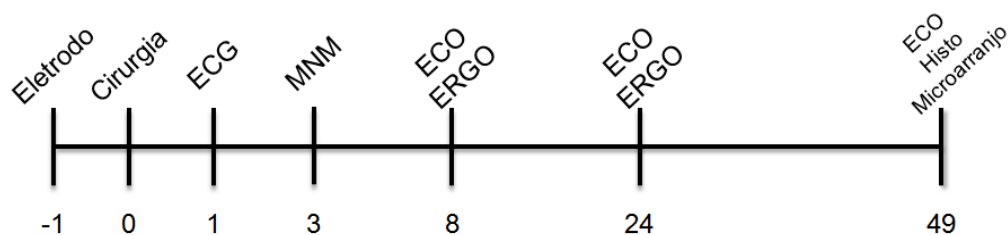


Figura 3 – FASE 1 : cronograma da definição do modelo de infarto por oclusão permanente.

Números abaixo da barra representam número de dias em relação à cirurgia (marco zero). ECG=eletrocardiograma; MNM= marcadores de necrose miocárdica; ECO=ecocardiograma; ERGO= ergoespirometria; Histo=histologia.

A segunda fase do estudo foi a terapia com células mesenquimais administradas por via intramiocárdica onze dias após a indução do infarto (figura 4).



Figura 4 – FASE 2: cronograma da avaliação do potencial terapêutico da administração de células mesenquimais por via intramiocárdica em animais infartados por oclusão permanente.

Números abaixo da barra representam número de dias em relação à cirurgia (marco zero). ECG=eletrocardiograma; MNM= marcadores de necrose miocárdica; ECO=ecocardiograma; ERGO= ergoespirometria; TTO= tratamento; Histo=histologia.

Uma vez definido o efeito da injeção intramiocárdica das células mesenquimais injetadas diretamente no coração, optou-se por verificar se a administração de células por via intravenosa apresentaria algum benefício funcional. Para tanto foi realizado um terceiro protocolo (figura 5) para o estabelecimento do modelo de lesão miocárdica por isquemia e reperfusão e verificação do padrão eletrocardiográfico e histológico da lesão induzida, comparando os achados aos obtidos pela oclusão permanente da DA.

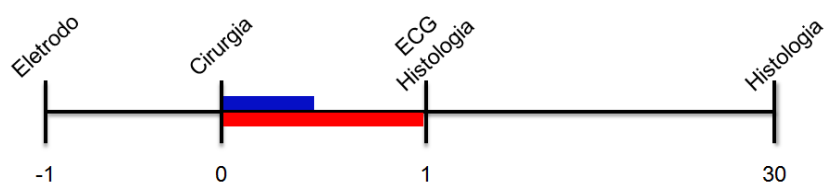


Figura 5 – FASE 3: comparação dos achados eletrocardiográficos e histológicos do protocolo de isquemia e reperfusão e oclusão permanente.

Números abaixo da barra representam número de dias em relação à cirurgia (marco zero). ECG=eletrocardiograma. Barra azul representa o grupo reperfundido e barra vermelha simboliza manutenção do estímulo isquêmico.

Após a observação do padrão eletrocardiográfico, foi realizada a avaliação da função cardíaca através do ecocardiograma seriado em aparelho específico para pequenos roedores (figura 6).

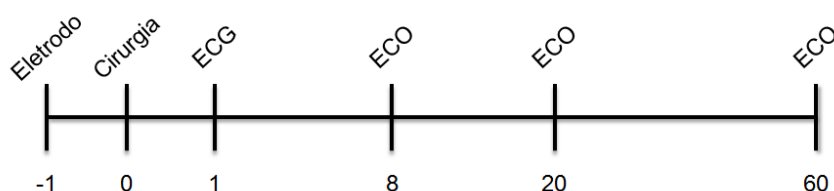


Figura 6 – FASE 3: cronograma do protocolo de avaliação da função cardíaca após lesão miocárdica induzida por isquemia e reperfusão.

Números abaixo da barra representam número de dias em relação à cirurgia (marco zero). ECG=eletrocardiograma; ECO=ecocardiograma.

Por fim, a fase 4 do estudo constituiu-se do tratamento dos animais infartados por isquemia e reperfusão através da injeção de células mesenquimais por via intravenosa, sendo comparados grupos que receberam uma injeção e três injeções seriadas, com intervalo de uma semana entre elas (figura 7).

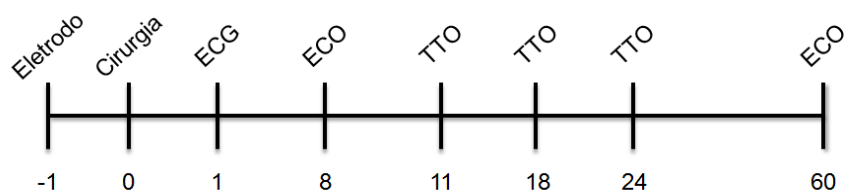


Figura 7 – FASE 4: cronograma do protocolo de terapia por injeção intravenosa.

Um grupo recebeu células 11 dias após a terapia e duas injeções de salina. O segundo grupo experimental recebeu três injeções de células seriadas (11, 18 e 24 dias após o infarto). O grupo placebo recebeu três injeções de salina nestas mesmas datas. Números abaixo da barra representam número de dias em relação à cirurgia (marco zero). ECG=eletrocardiograma; ECO=ecocardiograma.

4 RESULTADOS

4.1 OCLUSÃO PERMANENTE

O tempo de cirurgia necessário para a realização da traqueostomia, toracotomia, ligadura permanente da DA e síntese dos tecidos incisados foi aproximadamente de 10 minutos, no qual o animal permaneceu anestesiado e em prótese ventilatória. Mesmo com toracotomias amplas, não foi possível visualizar a circulação coronariana devido à pequena dimensão cardíaca. O uso de lentes de aumento também não contornou essa dificuldade, visto que o coração é uma estrutura móvel, perdendo-se continuamente a distância focal. Assim, a ligadura foi guiada pela relação anatômica da DA com a aurícula esquerda e o septo interventricular.

Os animais pseudoinfartados (PI) receberam igual procedimento, mas como os mesmos não apresentaram alterações compatíveis com infarto do miocárdio seja pela análise eletrocardiográfica ou bioquímica, supusemos que a ligadura não foi bem sucedida. Isso pode ocorrer não só pela imprecisão cirúrgica como também pelo fato de que mesmo camundongos singeneicos podem apresentar variações anatômicas inclusive da circulação coronariana,¹⁵ o que dificulta ainda mais a ligadura efetiva da DA.

A mortalidade nas primeiras 24 horas após a cirurgia ocorre devido à hemorragia, perfuração atrial, intolerância ao anestésico, mas principalmente devido a arritmias e insuficiência cardiorrespiratória aguda, totalizando 20% dos animais submetidos ao procedimento cirúrgico (Figura 8).

Após esse período, as causas de morte são falência cardíaca ou ruptura miocárdica, o que ocorreu em cerca de 35% do total de animais submetidos ao processo de IAM. Um total de 18% dos camundongos infartados morreu por ruptura cardíaca analisados pela necropsia. A ruptura cardíaca pode ser considerada como uma exacerbação da expansão do IAM, no qual a região expandida é incapaz de manter sua integridade após a deposição de colágeno e formação da cicatriz.¹²¹ Após o 15º dia do procedimento de ligadura da DA não se observaram óbitos.

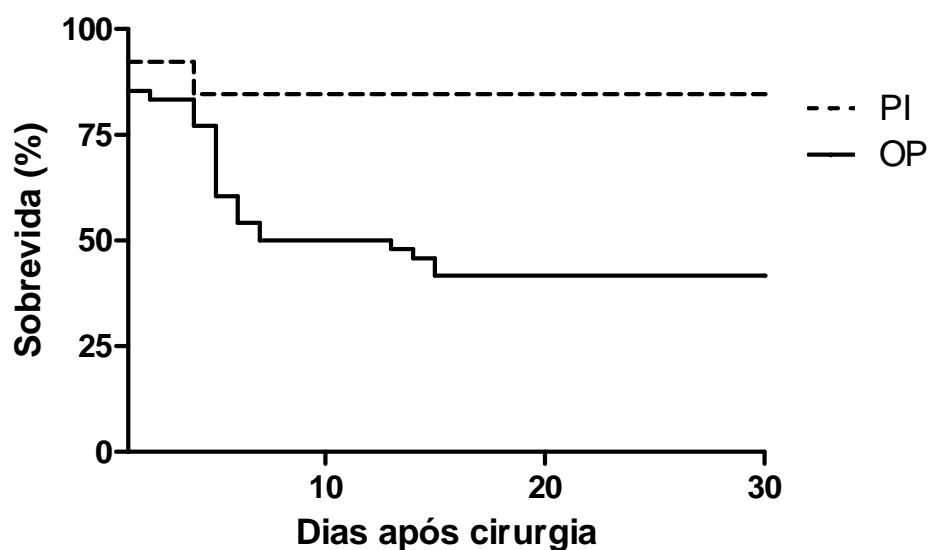


Figura 8 – Análise de sobrevivência PI vs. OP

A mortalidade do grupo OP ocorreu principalmente em dois momentos: um na primeira semana em torno do terceiro dia e outro na segunda quinzena.

PI=pseudoinfarto n=9; OP=oclusão permanente n=48, inicialmente.

Eletrocardiograma

O registro eletrocardiográfico foi realizado antes e após o procedimento cirúrgico com os animais fora do plano anestésico.¹²² Os animais pseudoinfartados não apresentaram nenhuma alteração eletrocardiográfica quando comparados de forma pareada aos registros de antes e depois do procedimento cirúrgico (Figura 9A).

A presença de supradesnivelamento do segmento ST e onda Q patológica, associada ao complexo QRS predominantemente negativo e onda T negativa na derivação D1 (Figura 9B) evidencia corrente de lesão, inatividade elétrica, desvio do eixo de despolarização ventricular para a direita e tecido cardíaco viável, porém isquêmico, respectivamente. Isso ocorre devido à lesão isquêmica da parede anterolateral irrigada pela DA.



Figura 9 – Representativo dos registros eletrocardiográficos PI vs. OP

ECG derivação D1 de animal fora do plano anestésico, pseudoinfartados (A) e oclusão permanente (B) 24 horas após a cirurgia. Seta em (B) destaca a presença de onda Q patológica e a seta menor aponta para o supradesnivelamento do segmento ST.

Além das alterações morfológicas das ondas eletrocardiográficas, a análise do ECG também evidenciou alterações de condução elétrica tanto atrial como ventricular (Tabela 1). Essas alterações perduraram até o término do estudo. O ECG foi capaz de evidenciar lesão isquêmica em 80% dos animais após 24 horas do procedimento cirúrgico.

Tabela 1 – Parâmetros eletrocardiográficos estudados

	Normal (n=25)	PI (n=7)	OP (n=10)
Amplitude			
P (mV)	0,088 ± 0,033	0,118 ± 0,036	0,147 ± 0,068
Q (mV)	0,003 ± 0,014	0,031 ± 0,045	0,221 ± 0,276 * #
QRS (mV)	0,608 ± 0,254	0,760 ± 0,392	0,357 ± 0,316 #
ST (mV)	0,004 ± 0,003	0,084 ± 0,087	0,397 ± 0,363 * #
T (mV)	0,106 ± 0,063	-0,024 ± 0,200	-0,140 ± 0,270 *
Duração			
P (ms)	11 ± 2	12 ± 1	14 ± 2 *
PR (ms)	34 ± 7	32 ± 5	37 ± 6
QRS (ms)	11 ± 2	14±4	15 ± 2 *
QT (ms)	22 ± 6	39 ± 13	68 ± 49 * #
QTc	71 ± 13	177 ± 147	201 ± 143 *
FC	592 ± 105	679 ± 80	532 ± 78 #

FC=frequência cardíaca; P=onda P; QRS=complexo QRS; T=onda T; PR=intervalo PR; Q=onda Q; ST=segmento ST; QT=intervalo QT; QTc=intervalo QT corrigido

*p<0,05 vs. normal; #p<0,05 vs. PI (PI=pseudoinfarto; OP=oclusão permanente). Valores representam média ± desvio padrão.

Bioquímica

Além dos critérios eletrocardiográficos, utilizou-se também análise bioquímica para a detecção dos animais infartados. Amostras de sangue foram coletadas da circulação caudal dos camundongos, três dias após a cirurgia. A análise de

creatinoquinase isoforma MB (CK-MB) foi capaz de distinguir os grupos infartados de pseudoinfartados (Figura 10A).

A concentração sérica de troponina I variou de 0,1ng/dL até 48ng/dL. Essa dispersão se justifica pela imprecisão da ligadura cirúrgica associada à variação anatômica da circulação coronariana. Todos os testes foram realizados com a mesma marca de *kits* de dosagem de troponina. Os animais com altos níveis de troponina I apresentaram pior desfecho clínico, morfofuncional e mortalidade precoce, confirmando o maior risco após processos isquêmicos agudos. Foram considerados infartados os animais em que os níveis séricos de troponina I superaram o corte de 0,3ng/dL (Figura 10B), o que aconteceu em 77% dos animais que sobreviveram ao protocolo cirúrgico. Os animais que não atingiram essa marca foram considerados pseudoinfartados (PI). Ao final dos protocolos experimentais iniciais a empresa que realizou os testes trocou o fornecedor de materiais e o novo kit não apresentou sensibilidade para a dosagem de troponina I em camundongos.

Houve uma forte associação (>95%) entre as duas análises (ECG x cTn). Apenas um animal apresentou critério eletrocardiográfico positivo e bioquímico negativo. Somente foram classificados como infartados os animais que apresentaram os dois critérios para lesão isquêmica.

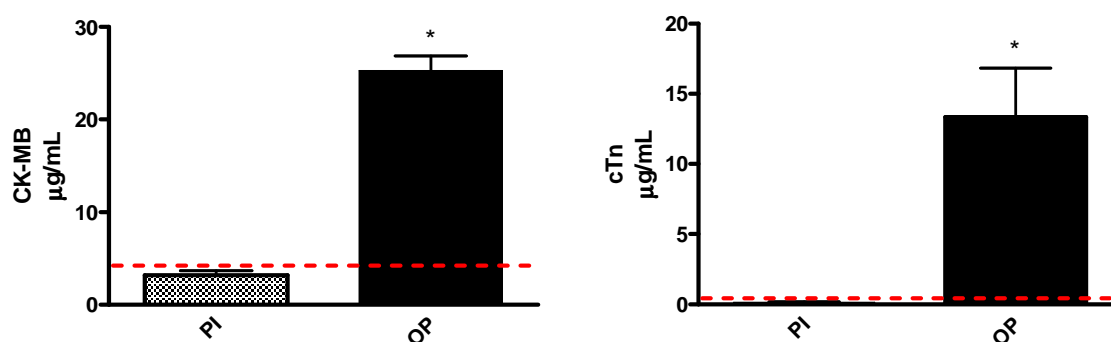


Figura 10 – Marcadores de necrose miocárdica

Em (A) CK-MB e em (B) troponina I após três dias do procedimento cirúrgico.

* $p < 0,05$; PI=pseudoinfarto $n=7$; OP=oclusão permanente $n=18$; linha tracejada representa o valor normal. Valores representam média \pm desvio padrão.

Ecocardiograma

Por ecocardiografia todos os grupos apresentaram valores basais similares (antes do procedimento cirúrgico) e as alterações induzidas pelo IAM estiveram

presentes até o término do estudo (Tabela 2). Sete semanas após o procedimento cirúrgico, a avaliação ecocardiográfica demonstrou, ao Modo-M, hipocinesia (Figura 11) associada ao afinamento da parede anterior nos animais infartados, como também aumento do diâmetro da cavidade ventricular esquerda em sístole (controle $0,23\pm 0,03\text{cm}$ vs. OP $0,32\pm 0,05\text{cm}$, $p<0,05$) e diástole (controle $0,36\pm 0,03\text{cm}$ vs. OP $0,40\pm 0,05\text{cm}$, $p<0,01$) e redução da fração de encurtamento (controle $36\pm 6\%$ vs. OP $22\pm 7\%$, $p<0,05$), denotando características de insuficiência cardíaca.

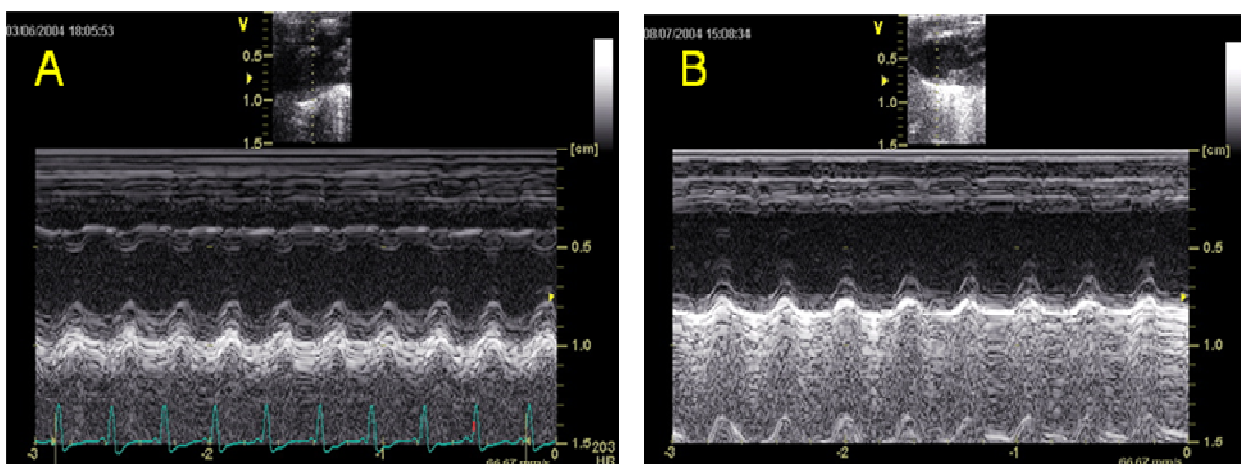


Figura 11 – Análise ecocardiográfica

Eixo curto paraesternal modo-M (A) PI e (B) OP após três semanas. Em (B) observa-se hipocinesia de parede anterior (seta) associada à dilatação da cavidade ventricular. PI=pseudoinfarto; OP=oclusão permanente

Os camundongos que não apresentaram ruptura cardíaca ou insuficiência cardíaca aguda desenvolveram dilatações mais modestas de VE, assim como menor afinamento de parede anterior. Durante a avaliação ecocardiográfica, em que os animais se apresentavam anestesiados, não houve diferença significativa da frequência cardíaca entre os grupos estudados.

Tabela 2 – Avaliação ecocardiográfica: Normal vs. PI vs. OP

	Normal (n=25)	PI (n=7)	OP (n=10)
VE d (cm)	0,36 ± 0,03	0,32 ± 0,11	0,40 ± 0,05 *#
VE s (cm)	0,23 ± 0,03	0,21 ± 0,11	0,32 ± 0,05 *#
PP d (cm)	0,09 ± 0,01	0,11 ± 0,03	0,08 ± 0,04
Onda A	0,14 ± 0,05	0,12 ± 0,02	0,13 ± 0,02
Onda E	0,43 ± 0,09	0,39 ± 0,07	0,53 ± 0,13 *#
E/A	3,25 ± 0,78	3,29 ± 0,67	4,51 ± 1,09 *#
FC (bpm)	250 ± 31	298 ± 56	249 ± 41
FS (%)	36 ± 6	37 ± 12	22 ± 7 *#

VE=diâmetro ventrículo esquerdo; E/A=relação entre onda E e onda A; FC=frequência cardíaca; FS=fração de encurtamento; PP=parede posterior; s=sístole; d=diástole

*p<0,05 vs. controle; #p<0,05 vs. PI. (PI=pseudoinfarto; OP=oclusão permanente). Valores representam média ± desvio padrão.

Ergoespirometria

A avaliação ergoespirométrica possibilitou a estimativa da reserva cardíaca, desmascarando a real disfunção cardíaca mediante o estresse físico. Os resultados deste estudo demonstraram que os animais infartados apresentaram menor consumo máximo de oxigênio (VO₂) (Figura 12A) como também menor limiar anaeróbio (Figura 12B) em relação ao grupo-controle e PI. A análise seriada evidenciou que no período pós-operatório recente (primeira semana), ambos os grupos (infartado e pseudoinfartado) apresentaram diminuição semelhante tanto do consumo máximo de oxigênio como do limiar anaeróbio. No grupo infartado houve uma progressão contínua da disfunção, enquanto que os animais pseudoinfartados apresentaram recuperação a níveis normais tanto do VO₂ como do limiar anaeróbio

após a terceira semana da cirurgia. Os animais com VO_2 e limiar anaeróbio menores apresentaram pior desfecho: maiores níveis de troponina, maior dilatação ventricular e mortalidade precoce.

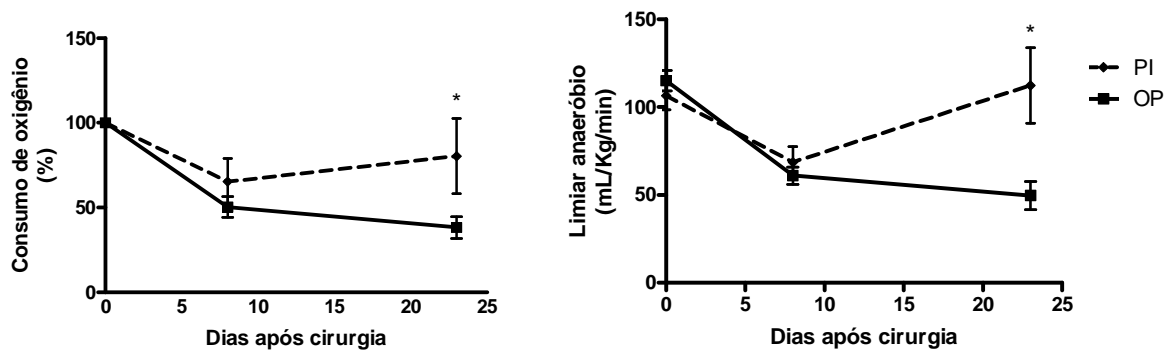


Figura 12 – Análise ergoespiométrica PI vs. OP

Em (A) consumo de oxigênio e em (B) limiar anaeróbio de animais PI e OP após a cirurgia.

* $p < 0,05$. (PI=pseudoinfarto; $n=7$, OP=oclusão permanente $n=4$). Valores representam média \pm desvio padrão.

Histopatologia

Após um período de sete semanas, os animais de ambos os grupos foram sacrificados. O estudo macroscópico da cavidade torácica revelou alterações de sintopia dos órgãos, como aderências e processo inflamatório cicatricial evidente.

No aspecto macroscópico dos corações, os animais infartados apresentaram dilatação da cavidade ventricular esquerda e afinamento da parede anterior associado à hipertrofia compensatória da parede septoposterior, perda da forma elíptica e presença visível de área de cicatriz na região anterolateral que, frequentemente, estendia-se até o ápice (Figura 13). Os corações pseudoinfartados eram similares aos dos animais-controle, exceto pela presença visível da linha de sutura e uma pequena área esbranquiçada que atingia somente a região subepicárdica ao redor da mesma.



Figura 13 – Fotografia dos corações OP vs. PI

Análise macroscópica do ventrículo esquerdo, fatiado transversalmente, de animais do grupo OP (A) e PI (B), sete semanas após a cirurgia.

PI=pseudoinfarto; OP=oclusão permanente

A análise do peso cardíaco demonstrou um aumento no peso de corações infartados quando comparados a animais pseudoinfartados (Figura 14). Este resultado pode parecer contraditório, visto que nos corações infartados houve perda de tecido miocárdico e, por isso, esperar-se-ia uma diminuição do peso cardíaco. Porém, o crescimento cavitário associado à substituição do tecido necrótico por fibrose e à hipertrofia compensatória do miocárdio remanescente contrapõe-se à perda de miócitos.

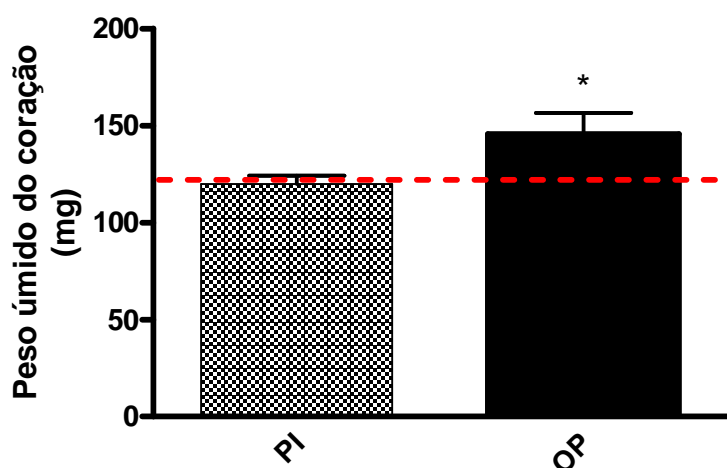


Figura 14 – Peso úmido do coração PI vs. OP

Observa-se o aumento do peso do coração dos animais submetidos à lesão isquêmica ao final do protocolo experimental.

* $p < 0,05$. Linha tracejada representa o valor normal. PI=pseudoinfarto $n=6$; OP=oclusão permanente $n=6$). Valores representam média \pm desvio padrão.

A análise microscópica evidenciou presença exuberante de fibras de colágeno com lesão transmural (Figura 15A) e área de infarto de 25% a 35%. Quando corado em HE (Figura 15B), os corações infartados apresentaram processo inflamatório intenso com presença de inúmeras células mononucleares (linfócitos e macrófagos), o que é condizente com o infarto crônico.

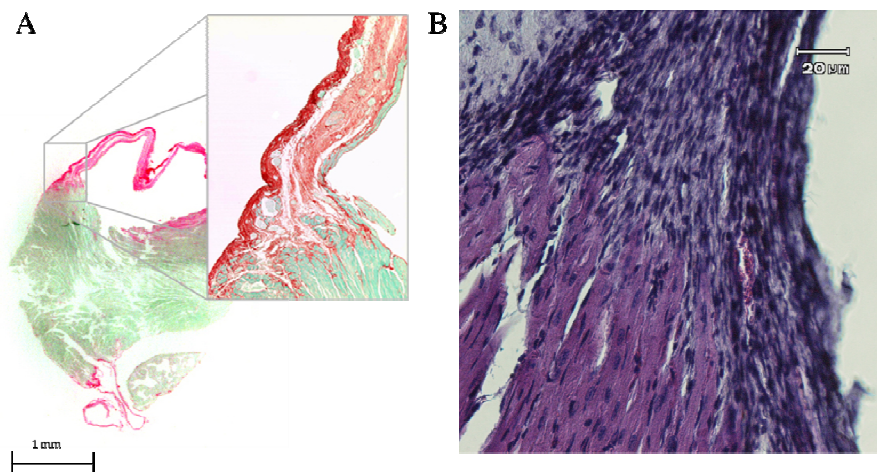


Figura 15 – Análise histológica OP

Em A: observa-se a diminuição da espessura da parede anterior e substituição da matriz por fibras colágenas, marcadas em vermelho pela coloração de picrosirius. Em B: na coloração de HE observa-se presença do infiltrado inflamatório.

Análise de microarranjo genético

Uma vez confirmadas as alterações funcionais na fase crônica do infarto do miocárdio, investigaram-se as repercussões da lesão isquêmica miocárdica mediante a análise da expressão gênica. Para tal, utilizou-se a técnica de microarranjo genético. O coração inteiro de animais com lesão isquêmica cicatrizada foi examinado. Dentre os genes presentes na biblioteca específica, 11.300 genes foram identificados, dos quais 2213 (19,58%) genes apresentavam expressão alterada nos animais infartados em relação aos controles. Destes, a grande maioria (95,57% - 2115 genes) estava com sua expressão aumentada, enquanto somente 98 genes apresentavam sua expressão diminuída.

Para facilitar a interpretação dos resultados, os genes foram classificados de acordo com a função descrita no programa *genMapp*. A grande maioria dos genes alterados não possuía funções conhecidas (33%) ou funções não classificadas (11%).

Dos genes conhecidos, a expressão exacerbada foi evidenciada predominantemente em genes relacionados à diferenciação e proliferação celular, transporte iônico, ativação do sistema complemento e resposta imunoinflamatória. Por outro lado, a expressão diminuída de genes estava relacionada às seguintes categorias: sinalização, comunicação celular, cadeia respiratória, proteínas contráteis e metabolismo.

Diversos genes da categoria inflamação, responsáveis pela tradução de receptores envolvidos na resposta celular, apresentavam expressão 1,5 vezes maior do que no coração de animais controles. Dentre estes, observa-se a presença de genes codificantes para receptores de TNF (Tnfrsf1a, Tnfrsf1b, Tnfrsf12), receptor de interleucina 1 (IL-1r1) e receptor de INF- γ (Ifngr1 e Ifngr2). Alguns genes relacionados à morte celular programada tiveram sua expressão aumentada, dentre eles genes pró-apoptóticos da família das caspases (caspases 8 e 3) e genes antiapoptóticos representados pela família bcl-2.

Não foi observada alteração da expressão de nenhuma interleucina com efeito anti-inflamatório (IL-4, IL-6 ou IL-10) ou de seus receptores no tecido cardíaco. Observou-se também a expressão aumentada de outras moléculas pró-inflamatórias como receptores Toll-like (TLR2 e TLR4) e proteínas de choque térmico (Hspb7 e Hspa12b). As análises também evidenciaram um aumento da expressão de 2,7 vezes para o receptor de Fc de IgG (Fc γ R3), que sugere a uma resposta citotóxica dependente de anticorpos. Além disso, o gene para (Ccl8), também conhecido como MCP-2 (*monocyte chemoattractant protein 2*), apresentava-se altamente estimulado no tecido cardíaco atingindo valor 9,7 vezes maior que a expressão normal.

A validação por PCR em tempo real foi feita por meio da análise de cinco genes que apresentaram expressão aumentada (Hif1a, Ifnar1, MMP23 and Tlr4) ou que não foram alterados pelo infarto (Nos2 – *nitric oxide synthase 2, inducible*). Os resultados estavam quantitativamente de acordo com os observados na técnica de microarranjo conforme observado na Figura 16.

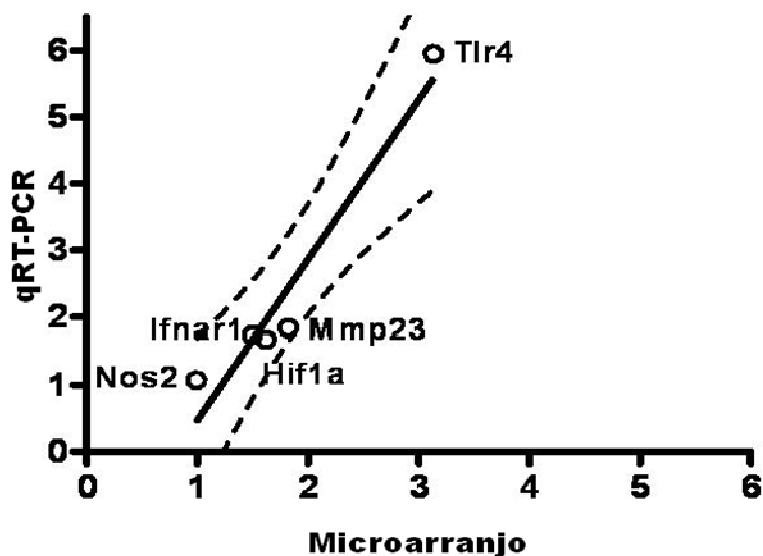


Figura 16 – Validação do microarranjo por PCR em tempo real

Varição na expressão de cada gene avaliado pelos dois métodos apresenta correlação positiva em cada amostra.

Linha pontilhada representa intervalo de confiança 95% (Pearson $R=0,968$, $p=0,0066$). Valores representam média \pm desvio padrão.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS

Características Morfológicas

As culturas foram observadas diariamente por microscópio de contraste de fase invertido para examinar a morfologia das células aderidas. Células semelhantes a fibroblastos aderidas ao plástico já podiam ser observadas nas culturas 24 horas após o plaqueamento. Além dessas, células de origem hematopoética, de morfologia arredondada, também compunham a população de células presentes na garrafa de cultura.

Nos dias subsequentes, as células fibroblastoides aumentaram em número, formando colônias isoladas em toda a superfície de cultivo. Ao fim da primeira semana, as colônias apresentavam maior tamanho e algumas das células arredondadas podiam ser visualizadas sobre as células fibroblastoides, formando uma segunda camada. Entre o 10^o-14^o dia de cultivo, a cultura alcançou 80% de confluência; quando as células foram recuperadas por meio da adição de tripsina-EDTA 0,25% e distribuídas em garrafas de 25cm² para expansão.

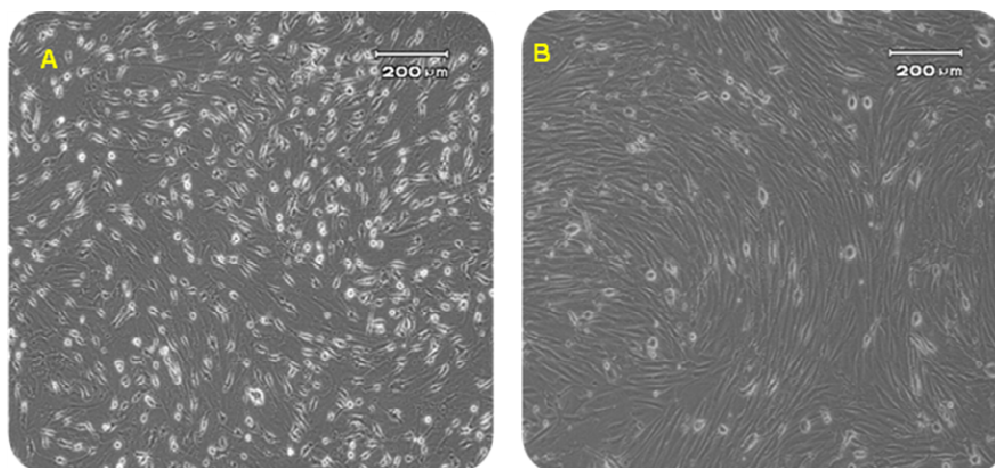


Figura 17 – Fotomicrografias representativas da morfologia das MSC em cultura

As células em primeira passagem com formato fibroblastoide e presença significativa de células arredondadas (A). Células em terceira passagem também fibroblastoides, com menor quantidade de células arredondadas presentes, organizavam-se de maneira a formar “morros e vales” (B).

As células em primeira passagem (Figura 17A) apresentavam-se mais heterogêneas, sendo predominante a população fibroblastoide. As células arredondadas ainda podiam ser visualizadas nesse momento, sem que se pudesse observar redução em seu número. Ao atingirem 80% de confluência, as células foram tripsinizadas, sendo este procedimento repetido três vezes. As células a partir da terceira passagem (Figura 17B) eram compostas por uma população rica de células que detinham características morfológicas semelhantes às classicamente atribuídas às células mesenquimais, como morfologia semelhante a fibroblastos e organização em formações similares a “morros e vales”. Pode-se notar diminuição progressiva da quantidade da população hematopoiética após as sucessivas passagens.

Ensaio de Diferenciação

As células-tronco mesenquimais têm como uma de suas características principais a capacidade de se diferenciar em linhagens celulares mesenquimais. Com esse intuito, a diferenciação em adipócitos e osteócitos foi induzida através do uso de meios específicos.

Após 21 dias em cultivo em meio adipogênico, podia-se visualizar a presença de vacúolos refringentes dentro das células (Figura 18A). Quando coradas com óleo

vermelho O 0,5%, esses vacúolos se mostraram positivos para a marcação, estando ocupados por triglicerídeos neutros. Desse modo, as MSC encaminharam-se eficientemente à diferenciação adipogênica (Figura 18B). Diferentemente das células induzidas, as GFP-MSC cultivadas pelo mesmo período de tempo em meio de cultura comum não apresentaram marcação positiva para triglicerídeos (Figura 18C).

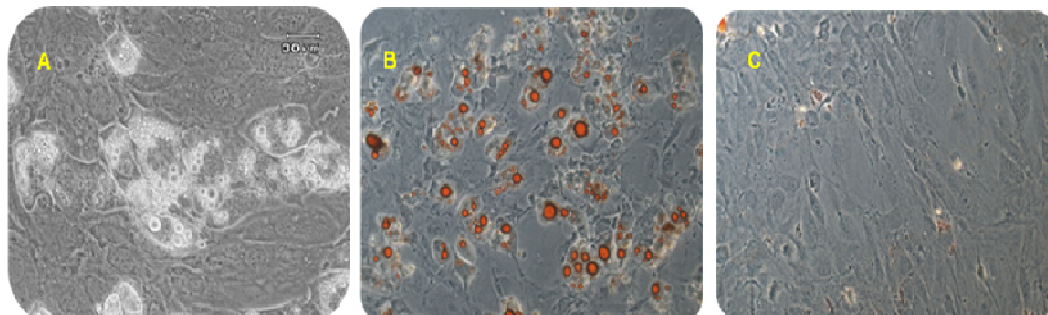


Figura 18 – Indução adipogênica

Fotomicrografias representativas do cultivo das MSC por 21 dias em meio indutor adipogênico (A e B) e em meio DMEM *Low Glucose* (C). Vacúolos intracitoplasmáticos refringentes podiam ser visualizados após o período de indução (A) e mostraram-se positivos em coloração com vermelho O, demonstrando conter triglicerídeos neutros (B). Aumento de 400X

Quando cultivadas durante o mesmo período usado no protocolo anterior em meio osteogênico, as GFP-MSC apresentaram marcação positiva para cálcio, evidenciado pela coloração com vermelho de alizarina (Figura 19A). Por outro lado, as GFP-MSC cultivadas pelo mesmo período de tempo em meio de cultura comum não apresentaram marcação positiva para acúmulo de cálcio (Figura 19B).

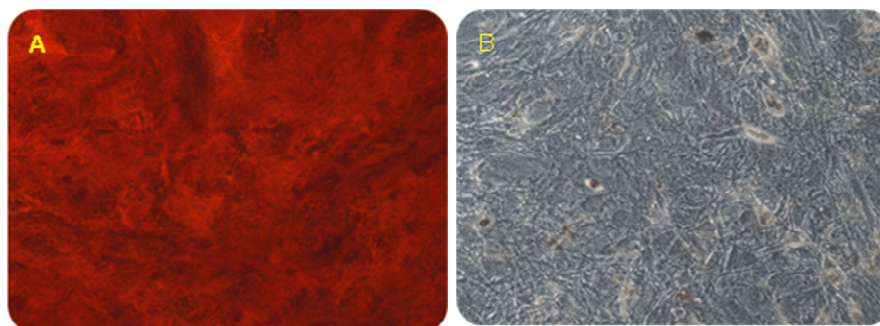


Figura 19 – Indução osteogênica

Fotomicrografias representativas do cultivo das MSC por 21 dias em meio indutor osteogênico (A) e em meio DMEM *Low Glucose* (B). Após indução, as GFP-MSC apresentaram marcação positiva para cálcio, que se apresentavam na forma de depósitos (A).

Aumento de 400X

Análise do Padrão de Proteínas de Superfície

A caracterização imunofenotípica das MSC (P3) foi realizada por meio de citometria de fluxo. A análise morfológica das células está representada na figura 20A. Não foi detectada a expressão de CD34 (não mostrado) e CD45, moléculas encontradas em células progenitoras hematopoiéticas/endoteliais (Figura 20B).

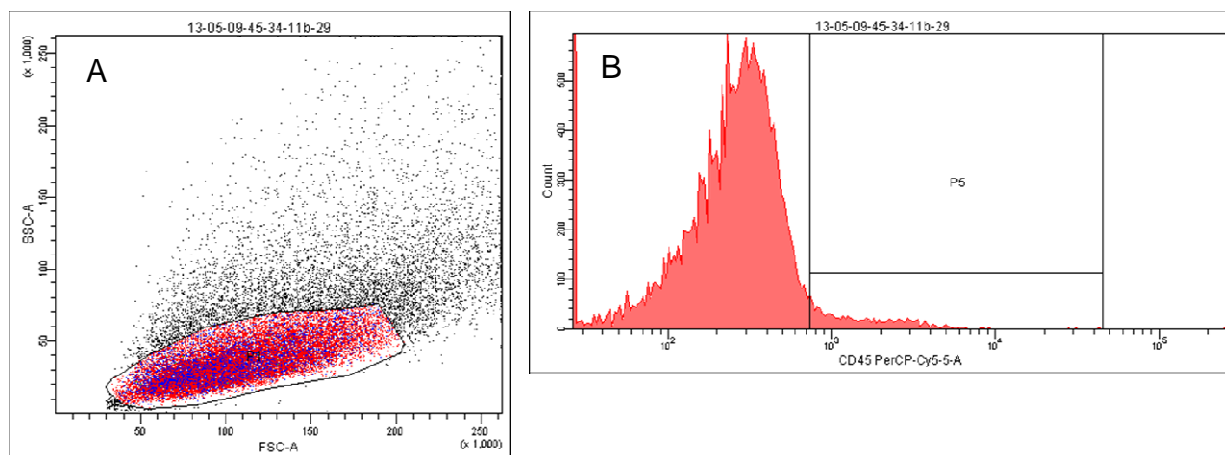


Figura 20 – Citometria de fluxo das GFP-MSC

Em A: gráfico correlacionando o tamanho (abcissa) e a granulosidade (ordenada) das células em terceira passagem. A população analisada se encontra delimitada pela elipse. Em B: histogramas representativos do perfil de expressão proteica de CD45 nas MSC.

4.3 INJEÇÃO INTRAMIOCÁRDICA

Para investigar o potencial terapêutico da injeção intramiocárdica das células mesenquimais de medula óssea, foi realizado um estudo preliminar com camundongos submetidos ao procedimento de infarto por OP. Os animais foram estratificados quanto ao grau de lesão miocárdica (dosagem de cTn) e função ventricular em grupos homogêneos: tratados com GFP-MSC ou veículo (grupo-placebo).

Avaliação Funcional

Na avaliação ecocardiográfica, ambos os grupos apresentaram valores similares após o procedimento de infarto, tanto de dimensões cavitárias como de fluxos. Não houve diferença significativa da frequência cardíaca entre os grupos analisados mesmo quando anestesiados.

Os animais que receberam células $1,5 \times 10^4$ células mesenquimais, onze dias após o infarto, apresentaram menor diâmetro ventricular e maior fração de encurtamento quando comparados aos camundongos infartados que receberam placebo ao final do protocolo experimental (Tabela 3).

Tabela 3 – Avaliação ecocardiográfica: Placebo vs. GFP-MSC (via intramiocárdica)

	<i>Placebo</i> (n=10)	<i>GFP-MSC</i> (n=4)
FC (bpm)	249 ± 41	220 ± 53
PA d (cm)	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01
PP d (cm)	0,08 ± 0,04	0,07 ± 0,01
VE d (cm)	0,40 ± 0,05	0,36 ± 0,02
VE s (cm)	0,32 ± 0,05	0,24 ± 0,02*
FS (%)	22 ± 7	35 ± 1*

FC=frequência cardíaca; PA=espessura de parede anterior; PP=espessura de parede posterior; VE=diâmetro do ventrículo esquerdo; s=sístole; d=diástole; FS%=fração de encurtamento *p<0,05. Valores representam média ± desvio padrão.

Na análise ergoespirométrica, ambos os grupos apresentaram valores basais similares (antes do procedimento cirúrgico). Após o procedimento de infarto, houve diminuição do consumo máximo de oxigênio. Isso se justifica não somente pela lesão isquêmica como também pela lesão cirúrgica, tendo ocorrido também com os animais da primeira etapa do estudo. Após o tratamento com veículo, os animais progrediram com disfunção cardíaca, evidenciada pela diminuição progressiva do VO₂. No entanto, os animais tratados com GFP-MSC apresentaram recuperação do consumo de oxigênio já na primeira avaliação ergométrica após o tratamento, tendo se mantido até o final do estudo, porém sem retornar aos valores pré-infarto (Figura 21).

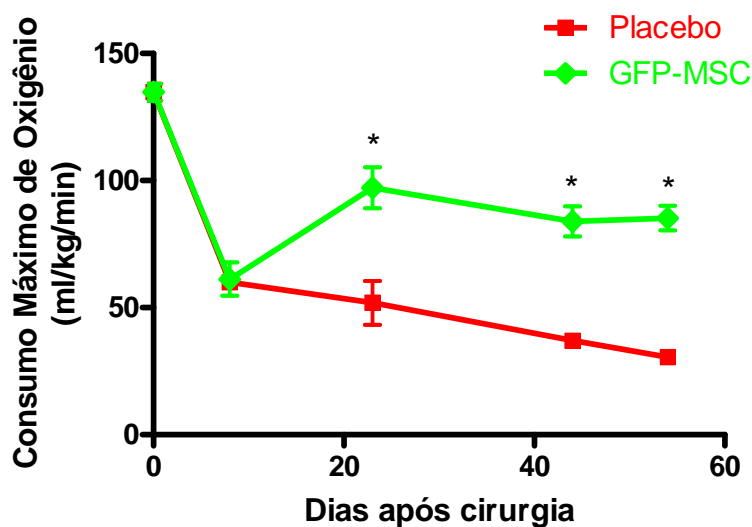


Figura 21 – Avaliação ergoespirométrica: Placeno vs. GFP-MSC (via intramiocárdica)

Após terapia com GFP-MSC, observa-se melhora funcional avaliada pelo consumo de oxigênio. Os animais que receberam placebo apresentaram disfunção progressiva. * $p < 0,05$. Valores representam média \pm desvio padrão.

Avaliação Histológica

Para tentar elucidar o mecanismo de ação das células mesenquimais de medula óssea, os corações dos animais tratados com células marcadas com eGFP, após o IAM, foram analisados histologicamente ao final do protocolo. Nenhuma célula marcada foi observada na região do perinfarto ou no tecido remanescente viável, ao término de sete semanas de estudo.

Devido ao paradoxo da ausência de células marcadas, apesar da estabilização do desempenho cardíaco em longo prazo, realizou-se um novo protocolo para averiguar a localização das células marcadas e a efetividade da injeção. Este protocolo consistiu do procedimento de infarto do miocárdio, injeção por via intramiocárdica de GFP-MSC com marcação tríplice, respeitando a cronologia do estudo anterior, mas com o sacrifício seriado destes animais. Foi observada, de forma precoce, na primeira semana após a injeção, a presença de grande quantidade de células com marcação tríplice (*GFP*, *Hoescht®* e *Cell Tracer®*). Nesse momento, as células se apresentaram com formas arredondadas muito próximas entre si, basicamente na região de perinfarto (Figura 22).

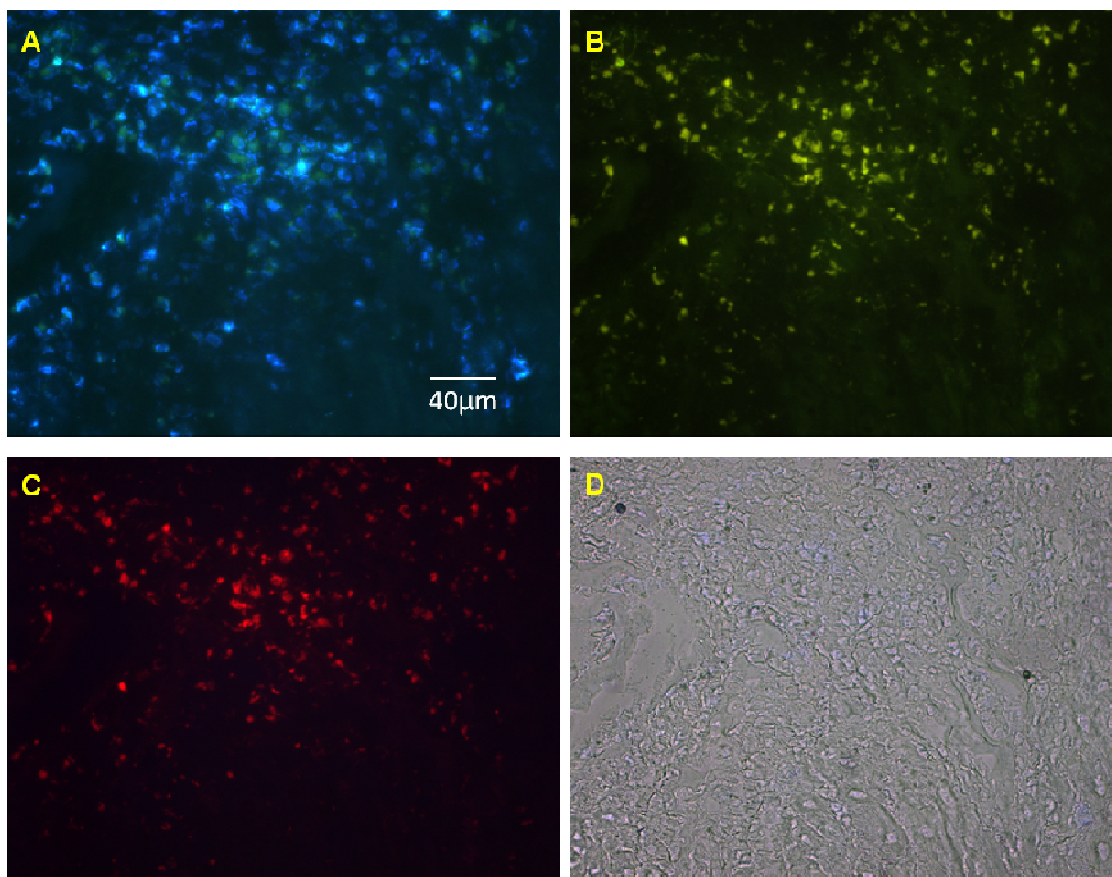


Figura 22 – Avaliação histológica das células com tripla marcação injetadas no miocárdio uma semana após a terapia.

Observa-se a presença de grande quantidade de células com conformação globosa apresentando a marcação com Hoescht® (A), eGFP (B) e *cell tracer*® (C). (D) ilustra o campo claro do tecido analisado.

A partir da segunda semana as células permaneceram com marcação tríplice, mas agora em número muito inferior ao inicial, distribuídas em várias regiões do tecido, entre a área de perinfarto e o tecido remanescente. Além disso, apresentavam-se com formas alongadas (Figura 23), dispersas entre si e distantes do local de injeção celular.

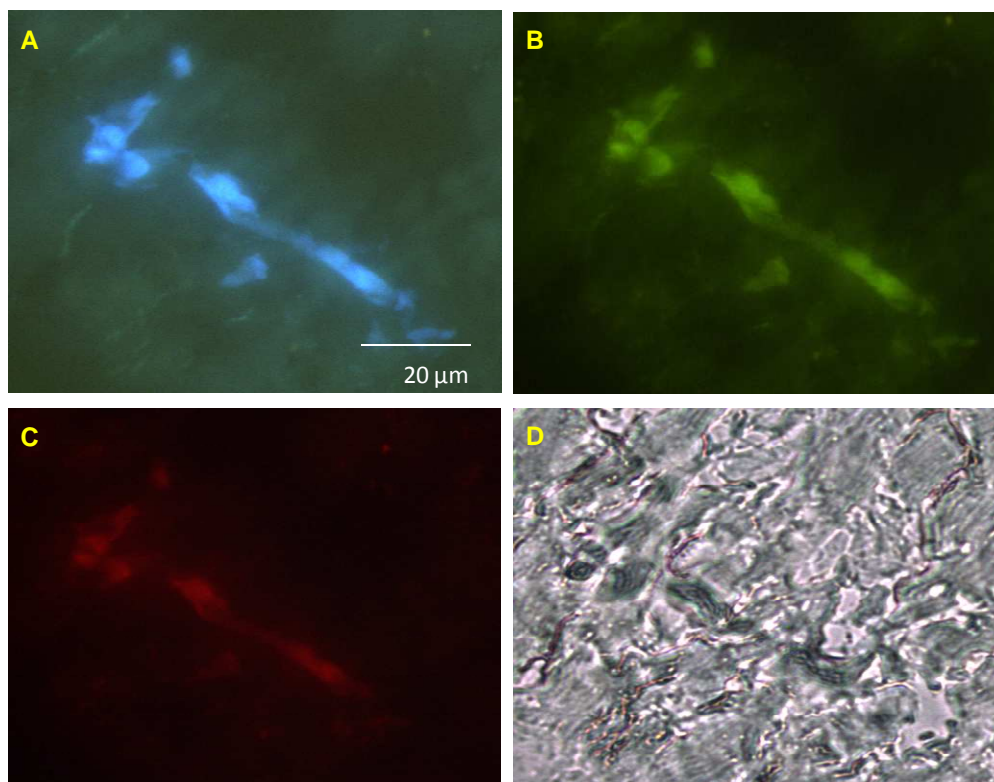


Figura 23 – Avaliação histológica das células com tripla marcação injetadas no miocárdio duas semanas após a terapia.

Observa-se a presença de pequena quantidade de células com conformação alongada e esparsas apresentando a marcação com Hoescht® (A), eGFP (B) e *Cell Tracer*® (C). (D) ilustra o campo claro do tecido analisado.

Após a quarta semana, não foram observadas células marcadas no tecido hospedeiro. No grupo tratado com veículo, o volume injetado continha ambos os corantes - *Hoescht*® e *Cell Tracer*® - diluídos. Nesses corações não se observou a presença de marcação dos corantes no tecido cardíaco através da microscopia de epifluorescência.

Microarranjo Genético

A utilização da terapia celular foi capaz de modular a reprogramação gênica induzida pela lesão isquêmica. Com a utilização de MSC, 71% dos genes alterados pelo IAM tiveram sua expressão normalizada. Dentre os 1.000 genes que retornaram aos níveis basais após a terapia celular estão aqueles relacionados à angiogênese (VEGF), resposta imunoinflamatória (receptores IL-1, INF- γ e TNF- α), apoptose (caspases e bcl2) e remodelamento de matriz extracelular (mmp23, mmp25, timp1 e timp2) (Tabela 4).

Tabela 4 – Genes com expressão aumentada após o infarto do miocárdio e normalizados após injeção intramiocárdica de GFP-MSC

Nome	Símbolo	IAM		IAM + MSC	
		X	p	X	p
Annexin A2	Anxa2	1,53	0,001	1,06	0,72
Annexin A3	Anxa3	1,78	0,03	1,16	0,63
APAF1 interacting protein	Apip	1,69	0,01	-1,07	0,68
Apoptosis, caspase activation inhibitor	Aven	1,78	0,02	1,29	0,17
Baculoviral IAP repeat-containing 2	Birc2	2,58	0,05	1,95	0,19
Baculoviral IAP repeat-containing 3	Birc3	2,14	0,001	1,39	0,16
BCL2/adenovirus E1B interacting protein 1	Bnip1	1,75	0,001	1,11	0,50
BCL2/adenovirus E1B interacting protein 2	Bnip2	1,66	0,004	1,41	0,07
BCL2/adenovirus E1B interacting protein 3	Bnip3	1,96	0,02	1,29	0,14
BCL2-associated transcription factor 1	Bclaf1	2,08	0,02	1,30	0,38
Bone morphogenetic protein 4	Bmp4	1,60	0,03	1,14	0,70
Caspase 3	Casp3	1,88	0,04	1,85	0,19
Caspase 8	Casp8	1,75	0,03	1,47	0,10
Chemokine (C-C motif) ligand 8	Ccl8	9,70	0,02	7,17	0,10
Chemokine (C-C motif) ligand 9	Ccl9	2,31	0,04	-1,07	0,87
Chemokine (C-X-C motif) ligand 14	Cxcl14	2,31	0,03	2,52	0,16
Fas-associated factor 1	Faf1	1,68	0,03	-1,01	0,98
Fc receptor, IgG, low affinity III	Fcgr3	2,70	0,02	1,26	0,48
Heat shock protein 14	Hspa14	1,92	0,02	1,38	0,13
Heat shock protein family, member 7 (cardiovascular)	Hspb7	1,78	0,01	1,11	0,54
Hypoxia inducible factor 1, alpha subunit	Hif1a	1,63	0,01	-1,00	0,99
Hypoxia up-regulated 1	Hyou1	2,02	0,01	1,64	0,22
Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit inhibitor	Hif1an	1,61	0,01	1,91	0,13
Interferon gamma receptor 1	Ifngr1	2,02	0,01	1,34	0,18
Interleukin 1 receptor, type I	Il1r1	2,53	0,02	1,69	0,09
Interleukin-1 receptor-associated kinase 1	Irak1	1,57	0,04	1,48	0,09
Interleukin-1 receptor-associated kinase 3	Irak3	2,95	0,03	1,56	0,25
Matrix metalloproteinase 23	Mmp23	1,83	0,01	1,43	0,27
Matrix metalloproteinase 25	Mmp25	2,12	0,03	3,61	0,09

Periostin, osteoblast specific factor	Postn	4,29	0,07	2,74	0,03
Receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1	Ripk1	2,23	0,01	1,29	0,39
Reticulon 4	Rtn4	1,98	0,01	2,01	0,13
Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade G, member 1	Serping1	2,10	0,005	1,49	0,34
Tissue inhibitor of metalloproteinase 1	Timp1	2,18	0,02	3,17	0,31
Tissue inhibitor of metalloproteinase 2	Timp2	1,52	0,01	1,20	0,51
Toll interacting protein	Tollip	1,50	0,05	1,12	0,60
Topoisomerase (DNA) I	Top1	2,11	0,03	1,65	0,10
TRAF and TNF receptor associated protein	Ttrap	1,63	0,01	-1,06	0,75
TRAF family member-associated Nf-kappa B activator	Tank	1,91	0,01	1,36	0,11
Vascular endothelial growth factor A	Vegfa	1,62	0,004	1,30	0,16
Vascular endothelial growth factor C	Vegfc	1,64	0,01	1,84	0,05

X=variação da expressão em relação ao coração normal;

Colunas vermelhas representam genes com expressão aumentada e amarelas representam genes com expressão normal.

Apenas três genes com expressão aumentada pelo IAM apresentaram modulação negativa no grupo tratado com MSC (Tabela 5).

Tabela 5 – Genes com expressão aumentada após o infarto do miocárdio e diminuída após injeção intramiocárdica de GFP-MS

Nome	Símbolo	IAM		IAM + MSC	
		X	p	X	p
DNA topoisomerase 1, mitochondrial	Top1mt	1,53	0,03	-14,62	0,02
BCL2-like 1	Bcl2l1	1,82	0,01	-1,97	0,01
FK506 binding protein 10	Fkbp10	4,75	0,00	-1,75	0,04

X=variação da expressão em relação ao coração normal; Colunas vermelhas representam genes com expressão aumentada e as amarelas representam genes com expressão diminuída.

Por outro lado, 738 genes sofreram modulação decorrente da injeção intramiocárdica de MSC, dos quais 593 apresentaram expressão aumentada. Dentre estes, estão presentes principalmente genes relacionados a proteínas contráteis (actina e miosina), organização de citoesqueleto, transporte de íons (potássio e cálcio), água e glicerol (aquaporina 7) e fatores inibidores de apoptose (Tabela 6).

Em 145 genes observa-se modulação negativa (Tabela 7). Nenhum gene com expressão diminuída pelo infarto apresentou modulação positiva no grupo tratado.

Tabela 6 – Genes com expressão normal após o infarto do miocárdio e aumentada após injeção intramiocárdica de GFP-MSC

Nome	Símbolo	IAM		IAM + MSC	
		X	p	X	p
Actin filament associated protein 1	Afap1	1,78	0,16	2,09	0,03
Actin-binding LIM protein 1	Ablim1	1,34	0,12	1,69	0,03
Myosin binding protein C, fast-type	Mybpc2	1,57	0,13	1,92	0,02
Myosin XVIIIb	Myo18b	1,04	0,89	4,37	0,0001
Potassium channel tetramerisation domain containing 12b	Kctd12b	1,17	0,48	2,98	0,004
Potassium inwardly rectifying channel, subfamily J, member 11	Kcnj11	1,30	0,30	1,78	0,02
Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 3	Kcnj3	1,90	0,15	4,03	0,04
Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit	Cacna1c	1,35	0,54	3,90	0,01
Aquaporin 7	Aqp7	1,11	0,65	1,92	0,03
X-linked inhibitor of apoptosis	Xiap	1,08	0,31	1,58	0,007
XIAP associated factor 1	Xaf1	1,32	0,10	1,55	0,02
Mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)	Mtor	1,30	0,43	2,81	0,004
tetratricopeptide repeat domain 7	Ttc7	1,74	0,09	1,60	0,03
Chemokine (C-C motif) ligand 2	Ccl2	1,03	0,88	2,09	0,03

X=variação da expressão em relação ao coração normal;

Colunas vermelhas representam genes com expressão aumentada e amarelas representam genes com expressão normal

Tabela 7 – Genes com expressão normal após o infarto do miocárdio e diminuída após injeção intramiocárdica de GFP-MSC

Nome	Símbolo	IAM		IAM + MSC	
		X	p	X	p
Angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8)	Agt	-1,35	0,45	-3,45	0,03
Calmodulin 2	Calm2	-1,08	0,60	-1,60	0,02
Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	Cdkn1a	1,69	0,18	-2,62	0,02
Cytochrome c oxidase, subunit VIIIb	Cox8b	-1,35	0,12	-2,02	0,03
Cytochrome c oxidase, subunit VIIIc	Cox8c	-1,62	0,15	-3,66	0,03
Cytochrome c oxidase, subunit XVII assembly protein homolog (yeast)	Cox17	-1,46	0,02	-1,81	0,01
Matrix metalloproteinase 27	Mmp27	-1,87	0,07	-2,72	0,03
Tissue inhibitor of metalloproteinase 4	Timp4	1,06	0,80	-2,48	0,02

X=variação da expressão em relação ao coração normal,

Colunas amarelas representam genes com expressão normal e verdes representam genes com expressão diminuída.

Após a terapia celular associada à atenuação da resposta ao estresse celular observou-se também uma alteração relativa da expressão do metabolismo, sinalização, transporte e transcrição celular, sugerindo um retorno à homeostase celular.

4.4 ISQUEMIA E REPERFUSÃO

Uma vez observado o benefício funcional da injeção intramiocárdica das GFP-MSC e sua ação sobre a expressão gênica nos corações infartados, questionou-se se a terapia por um acesso menos invasivo teria o mesmo efeito. O grande atrativo da utilização de uma via intravenosa é a possibilidade de injeções seriadas. Para isso, optou-se por desenvolver no laboratório um modelo de lesão miocárdica em que houvesse reperfusão e patência vascular após a lesão isquêmica.

O protocolo cirúrgico até o momento da ligadura foi o mesmo realizado no modelo de OP, perfazendo cerca de dez minutos. O animal permaneceu em isquemia durante 90 minutos. Após esse período, retornou à mesa cirúrgica para remoção da sutura, proporcionando a reperfusão e síntese final, em média por mais cinco minutos. O camundongo permaneceu ao longo do protocolo com o acesso

ventilatório instalado e em plano anestésico. Da mesma forma que o modelo de OP, não foi possível visualizar a DA, sendo a ligadura realizada mediante a visualização do septo interventricular e átrio esquerdo. Os animais PI receberam igual procedimento, porém sem que a oclusão fosse realizada.

A mortalidade precoce foi semelhante ao modelo de OP, em torno de 27%, fato que pode ser atribuído à maior manipulação cirúrgica, tempo operatório prolongado e a ocorrência de arritmias de reperfusão. Apenas 13% dos animais morreram após as primeiras 24 horas de protocolo (Figura 24).

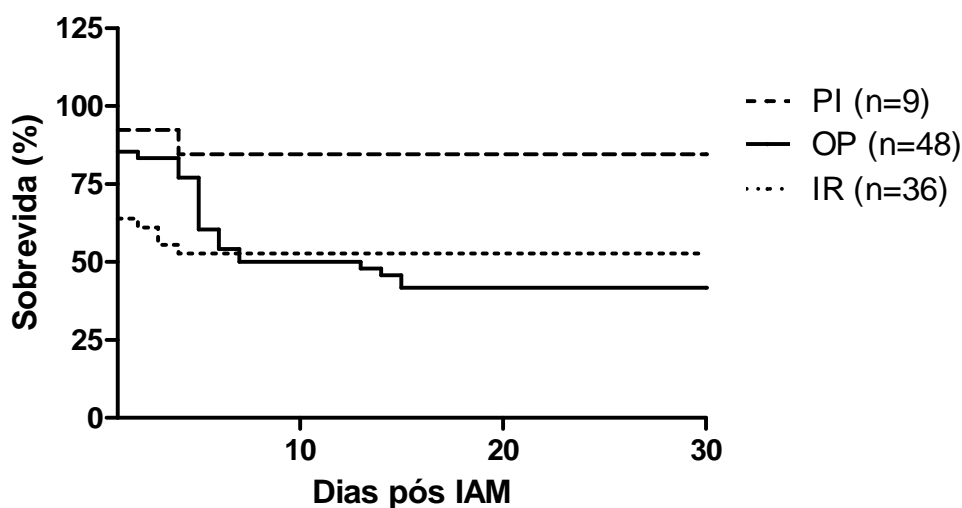


Figura 24 – Análise de sobrevivida PI vs. OP vs. IR

Mortalidade intraoperatória elevada nos animais submetidos à isquemia e reperfusão. PI=pseudoinfarto; OP=oclusão permanente; IR=isquemia e reperfusão

Eletrocardiograma

O implante prévio dos eletrodos no tecido subcutâneo dos camundongos permitiu a realização do ECG durante a cirurgia e 24 horas após, sem que o animal fosse anestesiado.

Antes de iniciar o protocolo de IR, com o animal já anestesiado e fixado à mesa cirúrgica, foram registrados 10 segundos de ECG controle e, durante todo o protocolo, cada animal teve seu registro gravado. Aos 10 minutos após instalação da sutura para a indução da isquemia, foi possível observar a elevação do segmento ST. Esse segmento representa o momento entre o final da despolarização e o início da repolarização em que não há formação de novos vetores elétricos.¹²³ Com a

redução do aporte sanguíneo, a permeabilidade da membrana dos miócitos modifica-se, permitindo a formação de dipolos durante essa transição, originando o desnivelamento positivo do segmento ST.¹²⁴ Aproximadamente aos 45 minutos de isquemia, foi possível notar uma primeira onda Q (negativa) no complexo QRS, representando o início do acometimento da fase de despolarização dos miócitos isquêmicos. Com a progressão da lesão, tais células perdem suas características elétricas dando origem à onda Q patológica.¹²³ Após a reperfusão, a principal característica observada foi o retorno do segmento ST à linha de base, representando o término do processo de corrente de lesão e sendo umas das alterações correlacionadas ao sucesso da terapia de reperfusão.¹²⁵ As células que foram irreversivelmente lesadas são representadas no ECG pela presença da onda Q patológica. Após a remoção da sutura que interrompia o fluxo sanguíneo da DA, observou-se a ocorrência de algumas arritmias como extrassístoles e taquicardia ventricular não sustentada (Figura 25).

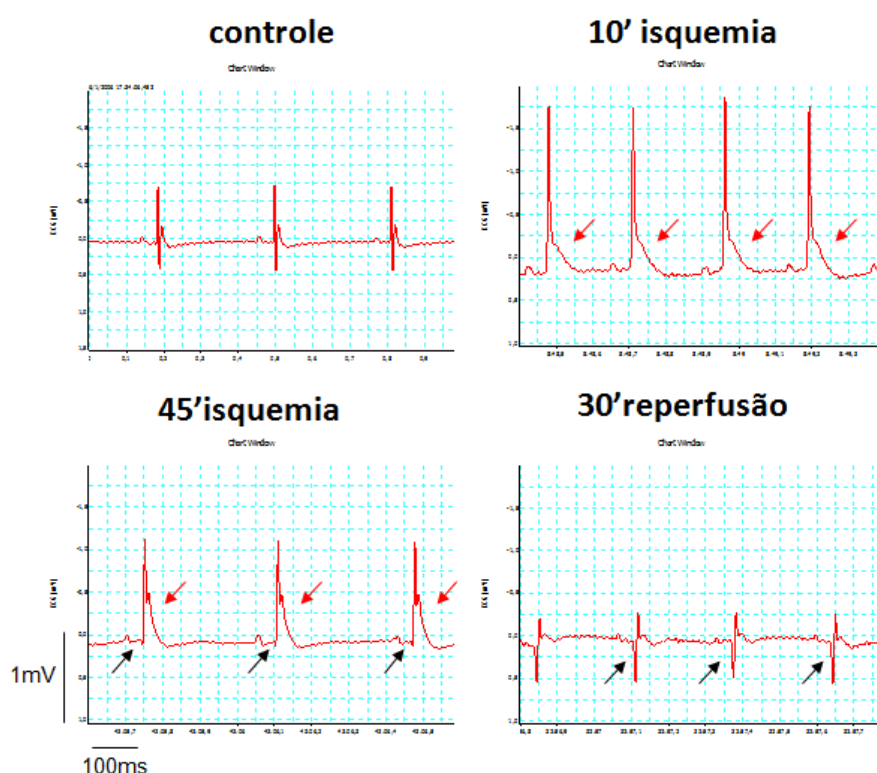


Figura 25 – Representativo da evolução do ECG durante a cirurgia

A primeira alteração notada é o aparecimento da elevação do segmento ST (→) aos 10 minutos, que denota a presença de isquemia. Aos 45 minutos, surge a onda Q (→), patognomônica de lesão irreversível. Trinta minutos após o início da reperfusão observa-se apenas a onda Q patológica sem a presença de supradesnivelamento do segmento ST, já que o estímulo isquêmico foi abolido.

No dia seguinte à cirurgia, os animais, não anestesiados, foram avaliados pelo ECG. Quando se analisaram os registros dos camundongos submetidos à OP e à IR, observou-se a presença da onda Q patológica nos dois grupos (Figura 26), característica de inatividade elétrica na parede anterior. Entretanto, o supradesnivelamento do segmento ST foi observado apenas nos animais submetidos ao protocolo de ligadura permanente da DA.

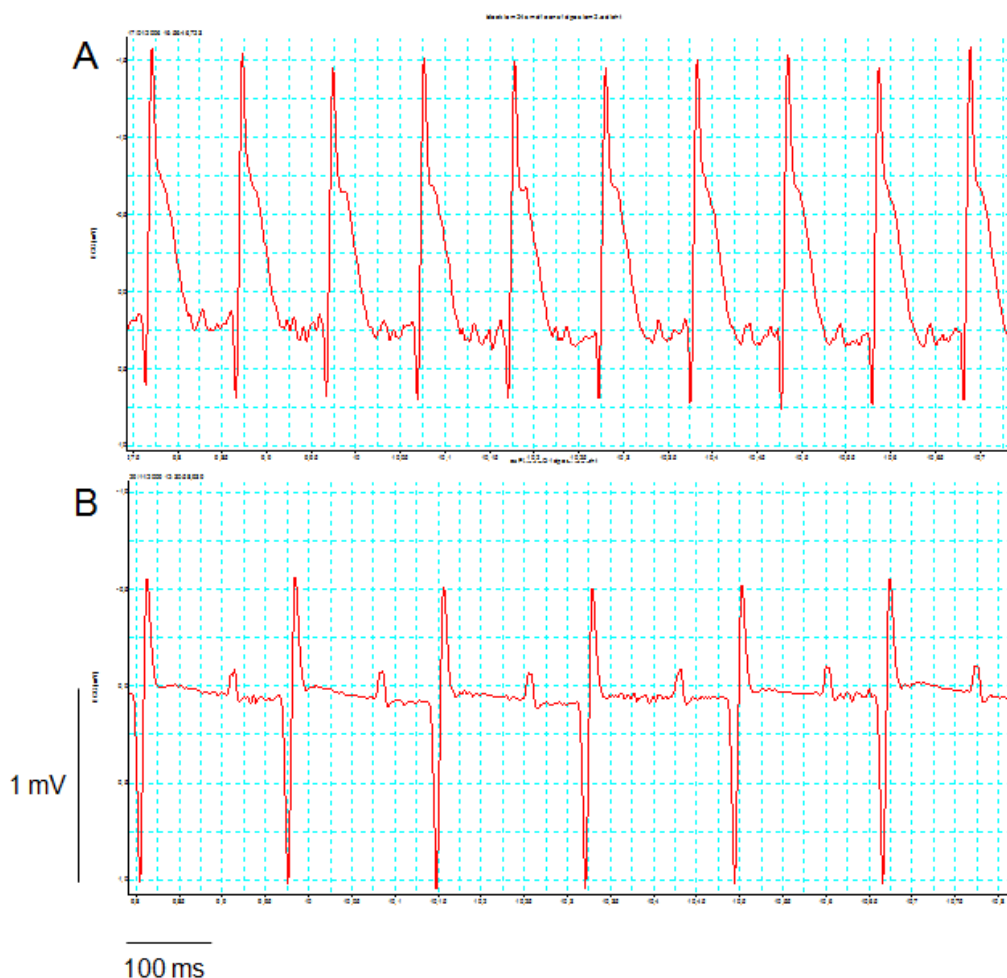


Figura 26 – Análise eletrocardiográfica 24 horas após a cirurgia OP vs. IR

O supradesnivelamento do segmento ST (seta) está presente apenas no grupo com oclusão permanente (A), visto que o estímulo isquêmico foi abolido no grupo reperfundido (B).

O retorno à linha de base do segmento ST na rotina clínica é um preditor simples e independente do sucesso da terapia de reperfusão miocárdica.^{126,127} Com base nisso, camundongos submetidos à IR e que 24 horas após a cirurgia apresentavam supradesnivelamento do segmento ST foram descartados do estudo. Nos diferentes protocolos realizados, em torno de 10% dos animais com isquemia transiente não tiveram sucesso na reperfusão. Além das alterações morfológicas das

ondas eletrocardiográficas, a análise do ECG também evidenciou alterações de condução elétrica tanto atrial como ventricular (Tabela 8).

Tabela 8 – Análise eletrocardiográfica dos animais submetidos à isquemia e reperfusão

	<i>Normal</i> (n=10)	<i>IR</i> (n=8)
Amplitude		
P (mV)	0,09±0,03	0,11±0,04
Q (mV)	- 0,002±0,01	-0,376±0,35*
QRS (mV)	0,417±0,463	-0,177±0,280*
ST (mV)	0,004±0,06	0,06±0,07*
T (mV)	0,180±0,95	0,489±0,137*
Duração		
P (ms)	0,011±0,002	0,014±0,001*
PR (ms)	0,03±0,007	0,05±0,02*
QRS (ms)	0,01±0,002	0,03±0,006
QT (ms)	0,027±0,005	0,027±0,011
QTc	0,09±0,018	0,081±0,031
FC	592±107	562±113

IR=isquemia e reperfusão; FC=frequência cardíaca; P=onda P; QRS=complexo QRS; T=onda T; PR=intervalo PR; Q=onda Q; ST=segmento ST; QT=intervalo QT; QTc=intervalo QT corrigido
*p<0,05 vs. Normal. Valores representam média ± desvio padrão.

Ecocardiografia

Os animais normais e pseudoinfartados foram acompanhados ao longo do estudo e não foram observadas, em nenhum momento, alterações significativas em

relação às medidas de cavidade nos dois grupos. A frequência cardíaca foi monitorada ao longo de todo o exame permanecendo em torno de 350 a 400 batimentos por minuto.

A utilização de equipamento específico para o uso laboratorial em pequenos roedores permitiu a detecção precoce das alterações estruturais induzidas pela lesão isquêmica. A avaliação bidimensional da cavidade ventricular demonstra a perda da conformação elíptica do VE (Figura 27A) que assume um formato globoso (Figura 27B). Além disso, a lesão isquêmica diminui a motilidade normal da parede anterior (Figura 27C) tornando-a acinética (Figura 27D).

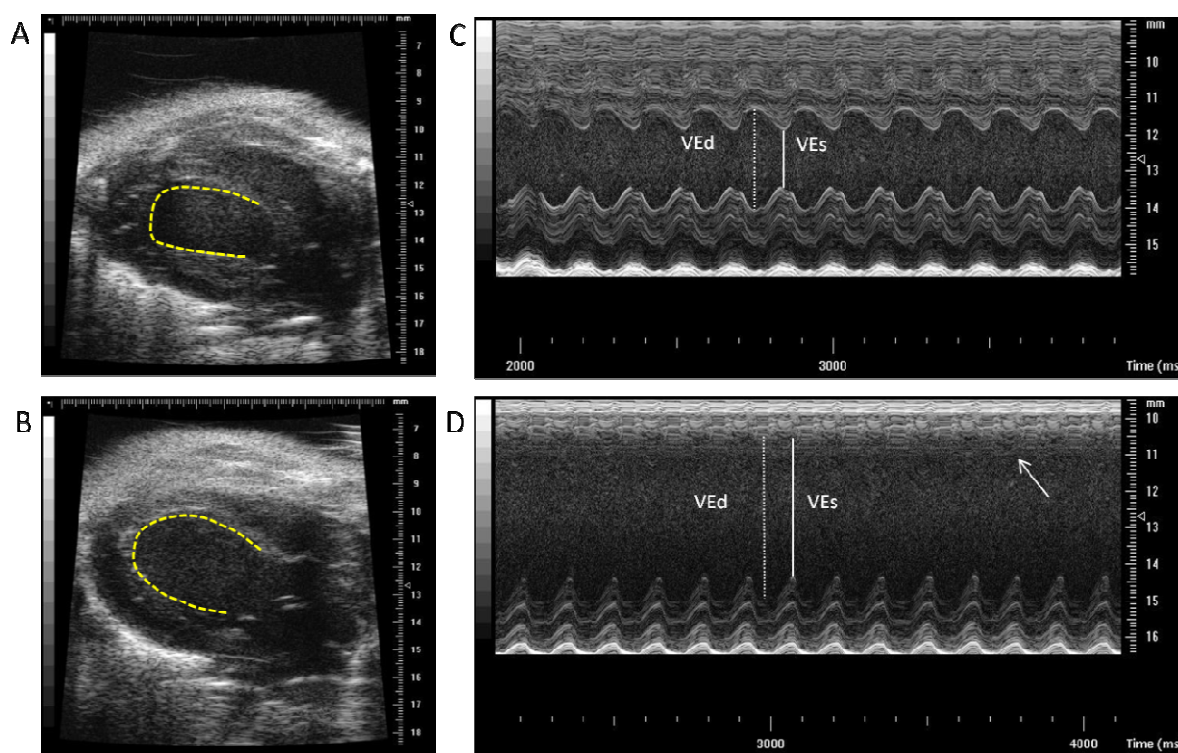


Figura 27 – Representativos da avaliação bidimensional (A e B) e unidimensional (C e D) de animais normais e infartados por isquemia e reperfusão, respectivamente.

Observa-se a alteração da conformação ventricular (linhas tracejadas amarelas em A e B), na qual os corações infartados apresentam dilatação da cavidade em sístole (linha branca) e diástole (linha branca tracejada). Além disso, nota-se acinesia da parede anterior indicada pela seta em D.

VEs=diâmetro do ventrículo esquerdo em sístole; VEd=diâmetro ventrículo esquerdo em diástole

Ao final da primeira semana já é possível notar o aumento da cavidade ventricular em sístole (controle $2,10 \pm 0,43 \text{ mm}$ vs. $2,83 \pm 0,46 \text{ mm}$, $p < 0,001$) e em diástole (controle $3,26 \pm 0,33 \text{ mm}$ vs. $3,83 \pm 0,48 \text{ mm}$, $p < 0,01$), alterações que aumentam com o tempo após a cirurgia (Figuras 28A e B).

Além do aumento da cavidade ventricular e acinesia da parede anterior observa-se ainda a redução da fração de encurtamento (controle $35,86 \pm 8,64\%$ vs. 8 dias $26,92 \pm 7,78\%$, $p < 0,05$; vs. 20 dias $23,39 \pm 8,75\%$, $p < 0,01$; vs. 60 dias $19,96 \pm 5,56\%$, $p < 0,001$) avaliada pelo modo bidimensional, e aumento da massa do ventrículo esquerdo (Figuras 28C e D).

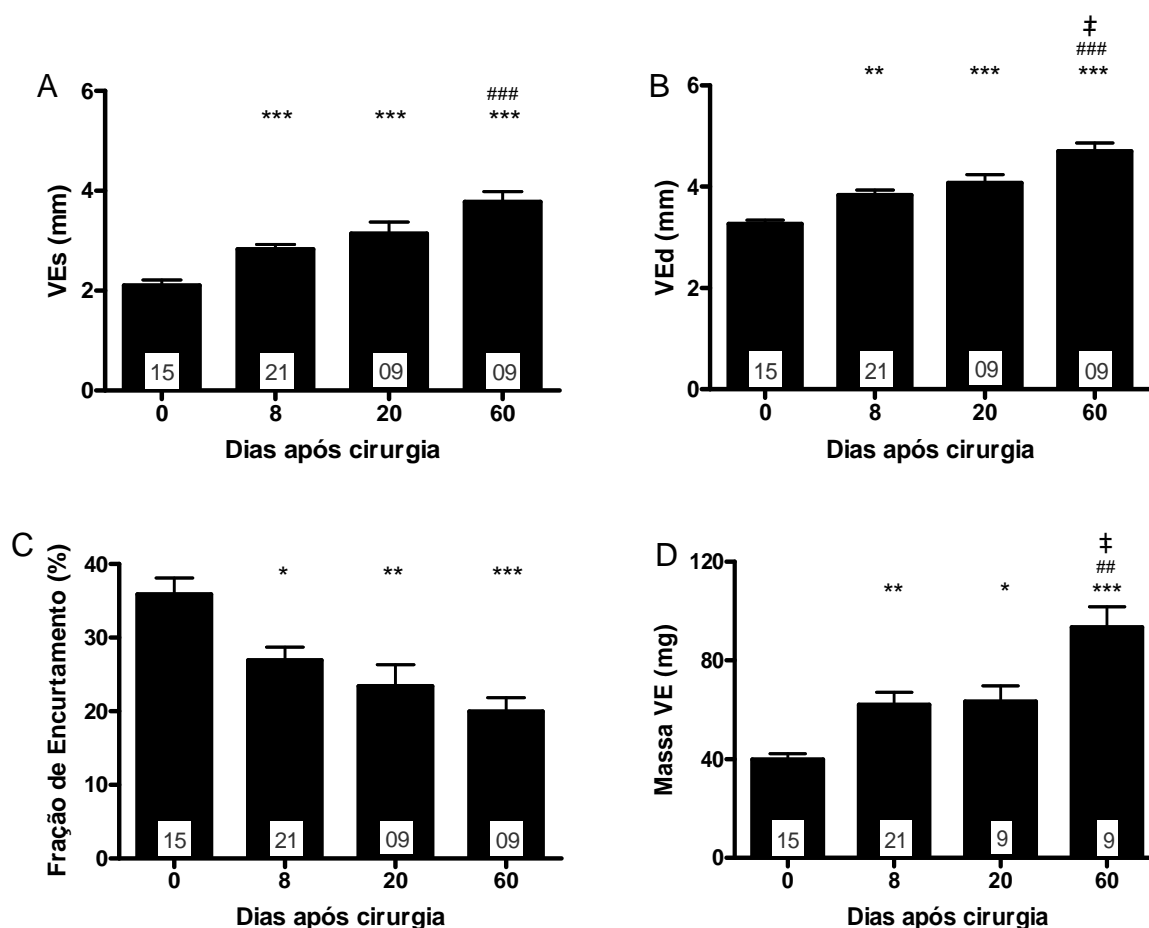


Figura 28 – Avaliação ecocardiográfica dos animais infartados por isquemia e reperfusão

Deteção da dilatação da cavidade ventricular em sístole (A) e diástole (B) foi possível já aos oito dias após o procedimento cirúrgico. Além disso, observou-se redução da fração de encurtamento e aumento da massa do ventrículo esquerdo.

VEs=ventrículo esquerdo em sístole; VEd=ventrículo esquerdo em diástole;

* vs. 0 $p < 0,05$, *** vs. 0 $p < 0,001$, ** vs. 0 $p < 0,01$, ### vs. 8 dias $p < 0,001$, ## vs. 8 dias $p < 0,01$, ‡ vs. 20 dias $p < 0,05$. (n de cada grupo especificado nas barras). Valores representam média \pm desvio padrão.

Para avaliação da função diastólica, foi realizada a medida do tempo de relaxamento isovolumétrico. A deficiência diastólica foi constatada pela redução do TRIV (Figura 29A) presente logo na primeira avaliação (controle $26,8 \pm 6,25\text{ms}$ vs. 8 dias $21,7 \pm 3,86\text{ms}$ $p < 0,001$).

Devido à maior sensibilidade do aparelho, foi possível aferir a fração de ejeção pelo método de Simpson (Figura 29B) através da obtenção de cortes transversais em diferentes alturas, associados a um corte longitudinal. Por meio dessa medida é possível inferir-se de forma global a disfunção cardíaca progressiva desses animais, desde o seu valor basal de $74,63 \pm 8,29\%$ para $62,58 \pm 11,62\%$ aos oito dias ($p < 0,01$); $53,41 \pm 10,41\%$ aos 20 dias ($p < 0,001$ vs. controle); e para $52,42 \pm 10,41\%$ aos 60 dias após o procedimento ($p < 0,001$ vs. controle).

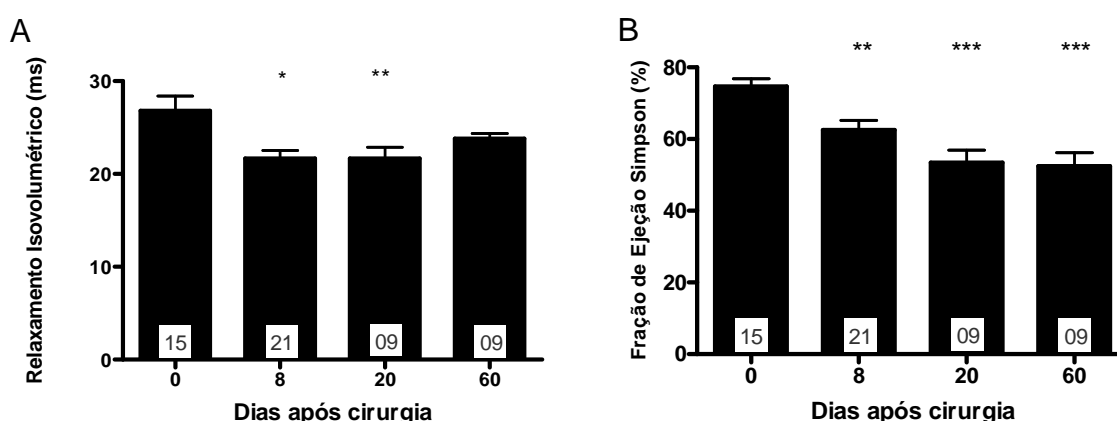


Figura 29 – Tempo de relaxamento isovolumétrico e fração de ejeção pelo método de Simpson de animais infartados por isquemia e reperfusão.

Avaliação mais fidedigna da disfunção cardíaca progressiva e permanente provocada pela injúria isquêmica.

*** vs. 0 $p < 0,001$; ** vs. 0 $p < 0,01$; *vs. 0 $p < 0,05$. Valores representam média \pm desvio padrão.

Histopatologia

Uma parcela previamente determinada dos grupos experimentais foi sacrificada e os corações corados por TTC, permitindo a quantificação da área de infarto. Devido à maior lesão isquêmica, o grupo OP apresentou uma área de infarto maior que o grupo IR ($18,91 \pm 7,07\%$ vs. $7,76 \pm 5,42\%$, $p = 0,021$).

Ao final de 30 dias, o restante dos animais foi sacrificado e submetido à análise macroscópica do coração e análises histológicas por coloração de hemaxilina e eosina e picrossírius. A análise macroscópica do tecido (Figura 30) revelou a presença de área infartada nos animais submetidos à IR e diminuição da espessura da parede aos cortes transversais. No grupo OP, a lesão isquêmica levou a intenso remodelamento cardíaco com dilatação importante da cavidade ventricular e à formação de aneurismas de ponta.

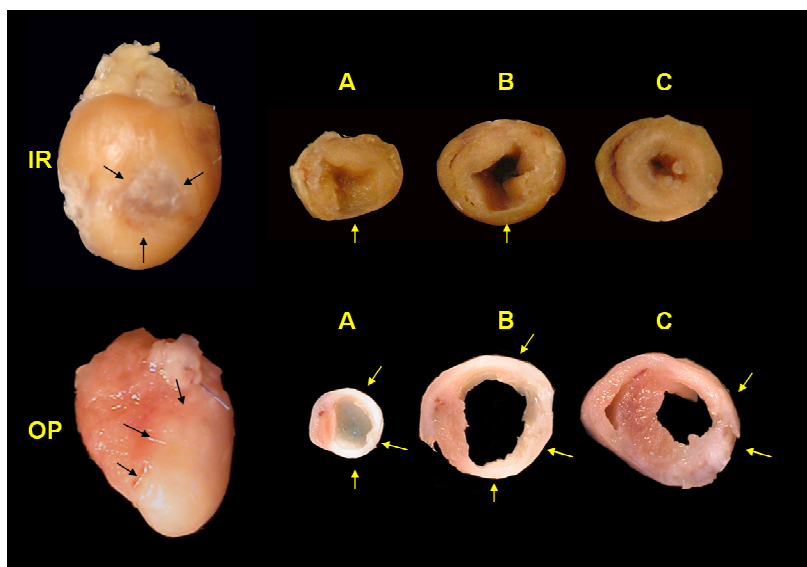


Figura 30 – Análise macroscópica aos 30 dias após a cirurgia nos grupos IR e OP

As setas pretas delimitam a borda cicatricial e as amarelas mostram o afilamento da parede do ventrículo esquerdo.

IR=isquemia e reperfusão; OP=oclusão permanente

Pela avaliação microscópica após colorações (Figura 31), observa-se no grupo IR a deposição de colágeno e a presença do infiltrado inflamatório característicos do infarto do miocárdio em estágio crônico, comprovando a efetividade do procedimento cirúrgico.

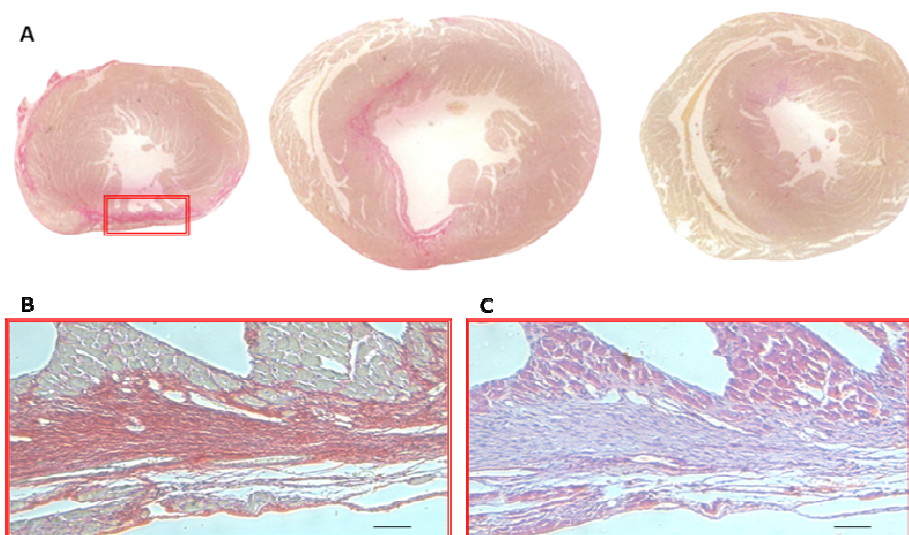


Figura 31 – Histologia aos 30 dias após a cirurgia em animais submetidos à isquemia e reperfusão.

Em A: observa-se a coloração de picrosírius marcando em vermelho a região de fibrose. Em B e C: está o aumento de 100x da região delimitada pelo retângulo em A, nas colorações de picrosírius e hematoxilina e eosina, respectivamente.

4.5 INJEÇÃO INTRAVENOSA

A possibilidade de administração das células por um acesso pouco invasivo permitiu a realização de injeções seriadas de GFP-MSC. Após a cirurgia, os animais infartados foram estratificados segundo a disfunção ecocardiográfica avaliada, 11 dias após a cirurgia, em três grupos experimentais segundo a quantidade de injeções de células que receberiam: placebo (três injeções semanais de veículo a partir do 18º dia pós-cirúrgico), uma injeção (uma injeção de 2×10^5 células no 18º dia e duas injeções de veículo nas duas semanas consecutivas) e três injeções (três injeções semanais de 2×10^5 células a partir do 18º dia de protocolo). A injeção das células foi feita pela veia jugular externa dos camundongos.

Nenhum animal morreu após a administração das células GFP-MSC pela veia jugular. Em diferentes protocolos no laboratório, a injeção por esta via não obteve este mesmo sucesso. Ao serem injetadas células mesenquimais de tecido adiposo, células mesenquimais derivadas de cordão umbilical ou placenta humana, todos os animais morreram poucos minutos após a administração.

Avaliação funcional

Na avaliação ecocardiográfica, ambos os grupos apresentaram valores similares após o procedimento de infarto, tanto de dimensões cavitárias como de fluxos. Não houve diferença significativa da frequência cardíaca entre os grupos analisados mesmo quando anestesiados.

Os animais do grupo-placebo, 18 dias após a IR, apresentaram importante dilatação da cavidade ventricular tanto em sístole ($2,52 \pm 0,28$ mm vs. $3,60 \pm 0,49$ mm, $p < 0,05$) quanto em diástole ($3,71 \pm 0,32$ mm vs. $4,58 \pm 0,48$ mm, $p < 0,05$), associada à redução da fração de encurtamento ($31,95 \pm 5,93\%$ vs. $21,62 \pm 3,99\%$) e ejeção ($60,4 \pm 8,41$ mm vs. $43,71 \pm 6,7$ mm, $p < 0,05$). Não se observaram diferenças significativas entre este grupo e os animais que receberam uma injeção de células GFP-MSC em todos os parâmetros avaliados (Tabela 9).

Tabela 9 – Avaliação ecocardiográfica dos animais submetidos à isquemia e reperfusão e tratados com placebo, uma ou três injeções de GFP-MSC por via intravenosa

	<i>Normal</i> (n=16)	<i>Placebo</i> (n=9)		<i>1 injeção</i> (n=7)		<i>3 injeções</i> (n=5)	
		8 dias	60 dias	8 dias	60 dias	8 dias	60 dias
VE s (mm)	2,10 ± 0,43	2,52 ± 0,29	3,60 ± 0,49	2,71 ± 0,14	3,39 ± 0,33	2,75 ± 0,50	2,97 ± 0,57**
SIV s (mm)	0,88 ± 0,21	0,92 ± 0,30	0,85 ± 0,26	0,87 ± 0,14	0,97 ± 0,18	0,80 ± 0,25	0,87 ± 0,26
PP s (mm)	0,91 ± 0,18	1,12 ± 0,22	0,85 ± 0,22	1,07 ± 0,23	0,83 ± 0,09	0,96 ± 0,11	1,07 ± 0,08
VOL s (µL)	15,48 ± 7,93	23,32 ± 6,90	55,95 ± 19,12	27,46 ± 3,56	47,71 ± 10,68	29,59 ± 13,45	35,81 ± 17,09**
VE d (mm)	3,26 ± 0,33	3,71 ± 0,32	4,58 ± 0,48	3,68 ± 0,33	4,32 ± 0,28	3,68 ± 0,39	3,90 ± 0,65**
SIV d (mm)	0,54 ± 0,08	0,63 ± 0,12	0,56 ± 0,14	0,64 ± 0,14	0,72 ± 0,14	0,57 ± 0,13	0,60 ± 0,20
PP d (mm)	0,54 ± 0,09	0,68 ± 0,11	0,85 ± 0,22	0,68 ± 0,15	0,83 ± 0,09	0,63 ± 0,04	0,72 ± 0,13
VOL d (µL)	43,49 ± 10,43	59,21 ± 13,02	97,94 ± 25,34	58,13 ± 12,23	84,25 ± 12,65	58,03 ± 14,89	68,34 ± 27,26**
VE massa (mg)	39,86 ± 9,08	64,56 ± 17,12	100,50 ± 23,53	64,71 ± 17,90	101,73 ± 15,46	55,76 ± 11,30	70,54 ± 21,78*
FS (%)	35,86 ± 8,64	31,95 ± 5,93	21,62 ± 4,00	26,08 ± 5,24	21,50 ± 4,92	25,48 ± 7,70	24,16 ± 2,86

Atenuação do remodelamento ventricular nos animais que receberam três doses de células mesenquimais.

VE=diâmetro do ventrículo esquerdo; VOL=volume ventricular; SIV=septo interventricular; PP=parede posterior; FS=fração de encurtamento; EF=fração de ejeção; s=sístole; d=diástole

*p<0,05; **p<0,01. Valores representam média ± desvio padrão.

Entretanto os animais que receberam três doses de células apresentaram menor dilatação da cavidade ventricular ao longo do protocolo quando comparados

ao grupo-PLACEBO em sístole ($2,97 \pm 0,57 \text{mm}$ vs. $3,60 \pm 0,49 \text{mm}$, $p < 0,01$) e diástole ($3,90 \pm 0,65 \text{mm}$ vs. $4,58 \pm 0,48 \text{mm}$, $p < 0,01$) (Tabela 9 e Figura 32).

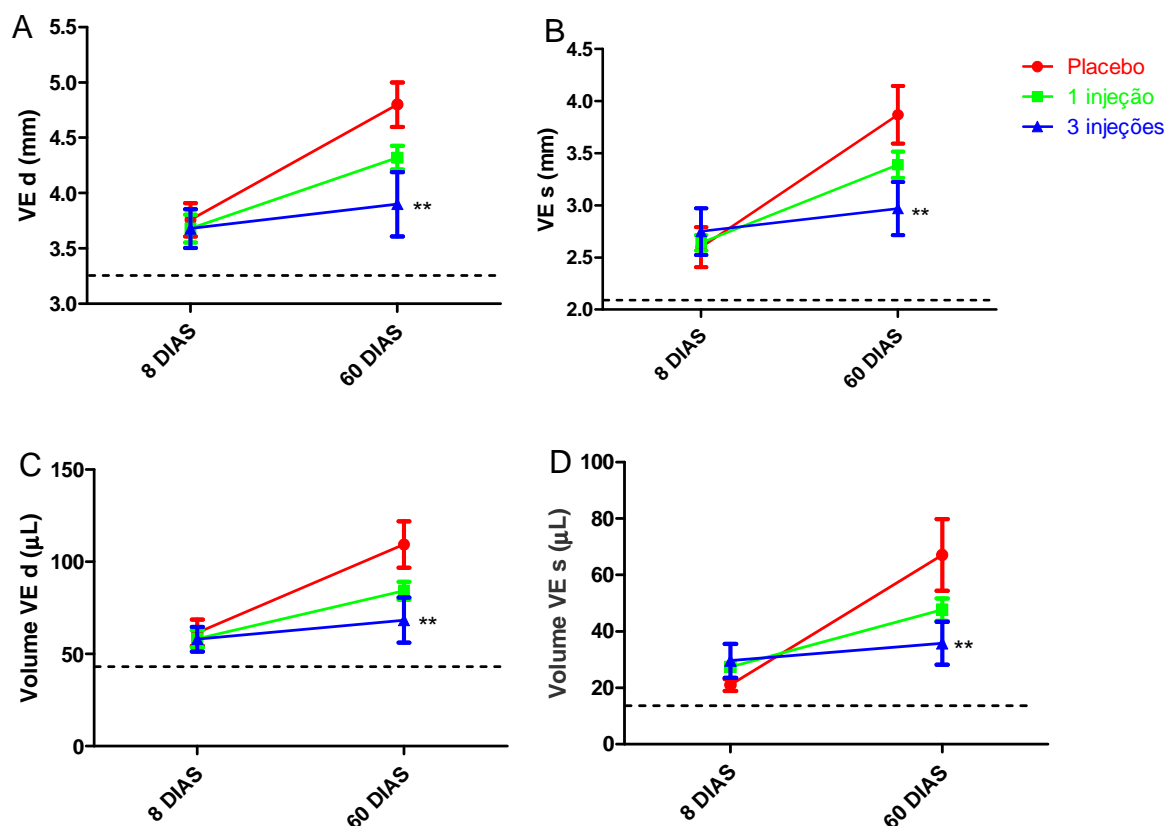


Figura 32 – Avaliação ecocardiográfica: Placebo vs. 1 injeção vs. 3 injeções

O remodelamento cardíaco não progrediu nos animais que receberam três injeções de GFP-MSC. ** $p < 0,01$. Placebo $n=9$; 1 injeção $n=7$; 3 injeções $n=5$.

VE=diâmetro do ventrículo esquerdo; VOL=volume ventricular; s=sístole; d=diástole. Linha tracejada representa o valor normal antes do infarto. Valores representam média \pm desvio padrão.

Além disso, observou-se no grupo que recebeu as três injeções de GFP-MSC a manutenção da fração de encurtamento até o 60º dia de estudo (oito dias: $25,48 \pm 7,70$ e 60 dias: $24,16 \pm 2,86$), enquanto no grupo-PLACEBO (oito dias: $31,95 \pm 5,93$ e 60 dias: $21,62 \pm 4,00$) e no que recebeu uma única injeção de células (oito dias: $26,08 \pm 5,24$ e 60 dias: $21,50 \pm 4,92$) este valor caiu ao longo do tempo. Porém aos 60 dias não houve diferença significativa de fração de encurtamento entre os três grupos (Figura 33A), embora a massa do VE tenha sido menor no grupo tratado três vezes com as células (PLACEBO: $100,50 \pm 23,53$, uma injeção: $101,73 \pm 15,46$, três injeções: $70,54 \pm 21,78$, $p < 0,01$) (Figura 33B).

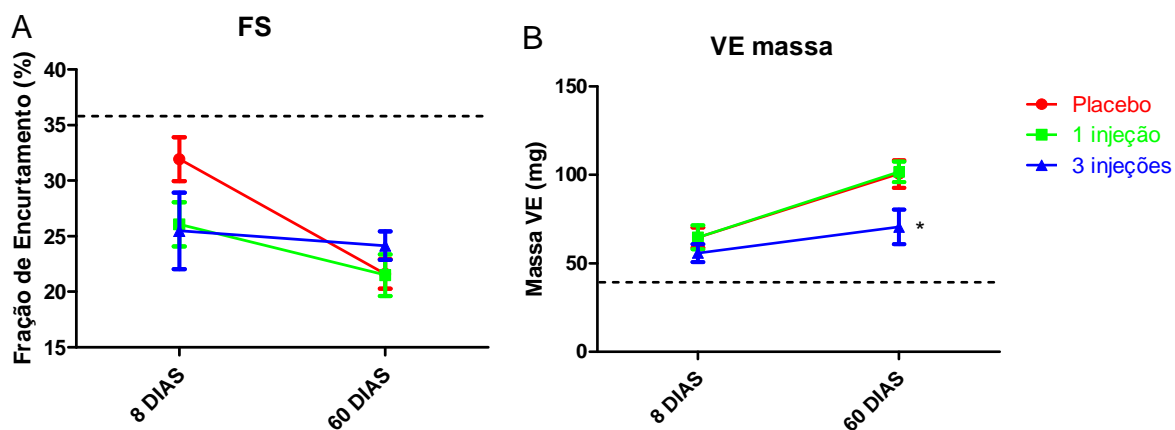


Figura 33 – Avaliação ecocardiográfica: Placebo vs. 1 injeção vs. 3 injeções

O protocolo de três injeções seriadas de GFP-MSC preveniu o aumento de VE e manteve a fração de encurtamento.

* $p < 0,05$. Valores representam média \pm desvio padrão.

Avaliação Histológica

Ao final do protocolo (60 dias), coração, fígado, pulmão, rim e baço foram extraídos e o tecido investigado à procura de células marcadas. Não foram observadas células com a tripla marcação nos tecido avaliados, assim como ao término do protocolo de injeção intramiocárdica.

5 DISCUSSÃO

Em modelos animais, a patologia induzida deve assemelhar-se à desordem humana com relação às características funcionais e aos aspectos estruturais. Os indícios mais importantes para criar o modelo experimental, obedecendo a essas circunstâncias, são obtidos na fisiopatologia da doença.¹¹⁴ No caso da cardiomiopatia isquêmica, a redução crônica do aporte sanguíneo pela formação das placas ateroscleróticas ou pela oclusão súbita por trombose de uma artéria coronária leva ao desenvolvimento em médio prazo da IC.¹²⁸ Assim, várias estratégias e métodos foram desenvolvidos para induzir o IAM.

Baseado nos princípios da doença de base do IAM, a alimentação rica em colesterol e gordura induz a hipercolesterolemia que é o fator de risco mais importante para a aterosclerose, levando à oclusão coronariana e consequente infarto do miocárdio, em modelo já descrito em suínos,¹²⁹ ratos¹³⁰ e em duas espécies de primatas.¹³¹ Entretanto, embora esse momento reproduza mais fielmente a doença humana, o momento e o local da oclusão ocorrem aleatoriamente, sem controle sobre a extensão do dano miocárdico.

Em contraste, a indução cirúrgica do IAM em modelos animais tem como vantagem a fácil identificação do momento, localização e extensão do evento coronariano, levando a resultados reprodutíveis. Como opção aos modelos de ligadura, dispõe-se da crioinjúria, capaz de gerar lesões semelhantes aos demais modelos, porém através de fisiopatologia muito distinta. A lesão provocada pelo processo de congelamento resulta da formação de cristais de gelo no espaço intra e extracelular e intravascular.¹³²

Na tentativa de melhor compreender os mecanismos celulares envolvidos no processo fisiopatológico da lesão isquêmica cardíaca, sem a interferência da aterosclerose, este grupo utilizou dois modelos experimentais de infarto agudo do miocárdio mediante a ligadura permanente ou transiente da artéria descendente anterior, em camundongos C57BL/6. Além da lesão isquêmica focal, os animais submetidos ao procedimento de infarto evoluíram com disfunção miocárdica avaliada por parâmetros elétricos, ecocardiográficos e ergoespirométricos.

Procedimento Cirúrgico

A sobrevida tanto da fase precoce como da tardia dos animais infartados está próxima ao descrito na literatura¹³³⁻¹³⁵ em ambos os modelos. A utilização de electrocauterização ou crioinjúria em vez de ligadura permanente da DA reduz a mortalidade tanto precoce como tardia em quase 50%,^{132,136} mas como mencionado a fisiopatologia da lesão é distinta. Apesar do menor dano miocárdico induzido pela isquemia e reperfusão, a mortalidade nas primeiras 24 horas após a cirurgia foi semelhante nos dois modelos experimentais. Alguns fatores explicam tal dado, como a maior manipulação cirúrgica dos animais submetidos à IR, tempo de procedimento mais longo e principalmente a ocorrência de arritmias características do processo de reperfusão.

Embora alguns estudos epidemiológicos sugiram diferenças adaptativas entre machos e fêmeas pós-IAM,¹³⁷⁻¹³⁹ neste estudo não se observaram diferenças significativas entre os sexos para nenhuma das análises realizadas.

Marcadores de Necrose Miocárdica

As lesões miocárdicas causadas pelo IAM são acompanhadas por morte celular através de necrose e apoptose. A necrose celular pode fazer com que constituintes do meio intracelular extravasem para o meio externo, conseqüentemente atingindo a circulação sanguínea, servindo como marcadores dessa situação. As troponinas I e T são utilizadas rotineiramente como marcadores específicos de injúria de células cardíacas¹⁴⁰ e têm se mostrado bastante úteis para a estratificação do risco após processos isquêmicos agudos e também para o diagnóstico de infarto agudo,^{141,142} possuindo correlação entre seus níveis séricos e a área do infarto medido no meio clínico¹⁴³ e experimental.^{144,145}

É interessante observar que a liberação de troponina acontece na área infartada, ou seja, nas células miocárdicas que estão em necrose e não no miocárdio remanescente, e esta perda celular pode ser demonstrada mesmo antes que haja alterações detectáveis pela histopatologia.¹⁴⁶ A Sociedade Europeia de Cardiologia e o Colégio Americano de Cardiologia têm sugerido a substituição da medida de CK-MB (enzima creatina-fosfoquinase específica para o músculo cardíaco) pela medida de troponinas no sangue por sua maior sensibilidade para

lesões no tecido cardíaco, e por permanecer em níveis elevados por mais tempo que a CK-MB.¹⁴⁷

Porém, as publicações experimentais usando troponina como marcador de lesão miocárdica são limitadas devido à pequena quantidade de amostra sanguínea que pode ser obtida dos camundongos. Mesmo assim, Metzler e colaboradores mostraram em seu estudo que após 24h do IAM havia uma correlação, com $r=0,84$, entre os níveis séricos de troponina e a área de infarto.¹⁴⁸ Neste estudo, foram utilizados *kits* para a dosagem de troponina I em humanos que apresentaram ótima correlação com os dados eletrocardiográficos e histológicos.

Eletrocardiograma

O eletrocardiograma permanece sendo uma ferramenta crucial para a identificação e o acompanhamento de pacientes infartados. Uma análise detalhada do padrão do segmento ST influencia a tomada de decisão em relação à terapia reperfusional. Além disso, o ECG é capaz de detectar arritmias, fruto do processo de remodelamento, que influencia o desfecho do paciente em curto prazo.

O ECG além de servir para a monitorização cirúrgica foi importante ferramenta na classificação dos grupos experimentais, permitindo classificação rápida e contínua dos grupos estudados. Estudos têm utilizado o registro do ECG em camundongos para caracterizar modelos transgênicos e patológicos de disfunção cardíaca.¹⁴⁹⁻¹⁵¹ Embora fácil de manusear, o ECG apresenta alta variação dos parâmetros analisados, com resultados discrepantes entre um estudo e outro.¹⁵² Isso se deve a diferenças de aquisição, técnicas de mensuração, diferenças de sexo,¹⁵³ idade,¹⁵⁴ além da anestesia,¹⁵⁵ caso utilizada. No presente caso, entretanto, as alterações do ECG, patognomônicas de IAM, como supradesnivelamento de segmento ST e onda Q patológica, apresentaram excelente correlação com os marcadores bioquímicos de necrose.

No pós-cirúrgico imediato, observou-se a presença de alterações do ritmo cardíaco como as taquicardias, fibrilação ventricular e o ritmo idioventricular acelerado. Alguns autores citam esses distúrbios de condução como marcadores inespecíficos de sucesso da reperfusão.^{156,157}

Ecocardiograma

Devido à riqueza de informações oferecidas, além da vantagem de ser um método não invasivo e trazer informações em tempo real do coração, sobretudo as referentes à evolução das doenças, o ecocardiograma ganhou grande popularidade e vem sendo aplicado frequentemente, inclusive em nível experimental. Esta ferramenta permite análise rápida em estudos *in vivo*, traduzindo-se num grande potencial para a avaliação do curso temporal do remodelamento cardíaco. Em conjunto com o efeito *Doppler*, o ECO continua sendo crucial para a detecção e quantificação das doenças cardiovasculares, fornecendo prognósticos e avaliando terapias.¹⁵⁸

Após o IAM, devido à perda de miocárdio viável, as funções sistólica e diastólica encontram-se diminuídas, além de poder ocorrer elevação da pressão diastólica final, depressão da pressão sistólica desenvolvida pelo ventrículo esquerdo e diminuição do débito cardíaco.

A função diastólica do ventrículo esquerdo é comumente avaliada pelo fluxo transmitral. Neste, observa-se o fluxo do enchimento rápido do ventrículo esquerdo (onda E) e do enchimento proveniente da contração atrial (onda A). Com mensuração da razão E/A, é possível acompanhar o desenvolvimento do processo de remodelamento no qual o paciente evolui através de padrões bem caracterizados de alteração do relaxamento, passando por um estágio de pseudonormalização até chegar à fase crônica da restrição do enchimento ventricular.

Embora a utilização de camundongos tenha trazido um grande avanço às pesquisas de identificação dos fatores genéticos envolvidos em doenças cardiovasculares, isso também criou desafios de avaliação de parâmetros morfofuncionais em pequenos corações. Os estudos de doenças humanas em modelos de camundongos transgênicos eram bastante limitados pela frequência cardíaca elevada e a pequena dimensão do coração. Recentemente, o aumento da velocidade de passagem de quadro e a obtenção de transdutores menores e de alta frequência, além da criação de imagens digitalizadas, possibilitaram uma avaliação mais acurada e reprodutível das imagens ecocardiográficas, inclusive em camundongos não anestesiados.¹⁵⁹

Tornou-se possível observar, em modelos murinos, alterações segmentares da motilidade da parede ventricular e correlacioná-las com área de risco isquêmico e

área de infarto,¹⁶⁰ sendo possível também avaliar as funções sistólica e diastólica.¹⁶¹ A análise seriada de estudos ecocardiográficos em pacientes tem mostrado uma dilatação do VE tanto na fase aguda como crônica e que atinge tanto a região infartada como a região remanescente. Além da dilatação ventricular pós-IAM, a função cardíaca está prejudicada, como evidenciado pela fração de encurtamento e elevação da pressão diastólica final do VE, acarretando importantes implicações prognósticas.¹⁶²

Apesar de toda essa tecnologia, nem sempre se observam com clareza os infartos de parede anterior do ventrículo em murinos, devido ao afilamento, acinesia e aderência pós-operatória.

A avaliação da função cardíaca de camundongos é limitada pelo pequeno tamanho do coração e sua frequência de batimentos elevada. Transdutores de frequência baixa, quando utilizados para adquirir imagens em campo próximo, realizam essa avaliação de maneira deficiente¹⁶³ e não apresentam sensibilidade suficiente para detectar pequenas disfunções.

Ecocardiogramas convencionais, equipados com transdutores de até 15MHz utilizados em hospitais, foram adaptados para a avaliação da função cardíaca em camundongos.¹⁶⁴ Inicialmente, durante os protocolos de OP, esse era o equipamento disponível para a realização do presente estudo. Apesar de prover informações importantes em outros modelos de doenças cardíacas, tais equipamentos não apresentam sensibilidade suficiente para inferir a função cardíaca no modelo de injúria por IR.

O modelo de infarto do miocárdio induzido por IR provoca disfunção ventricular dependente do tempo ao qual o animal é submetido à restrição de aporte sanguíneo.^{165,166} Michael e colaboradores⁴⁸ compararam a disfunção miocárdica de diferentes períodos de isquemia à oclusão permanente da artéria descendente anterior através da análise da perimetria da área infartada do ventrículo esquerdo. As oclusões temporárias de 30 minutos e de 60 minutos geraram lesões muito pequenas, possivelmente não detectáveis ao ecocardiograma. Entretanto o insulto isquêmico de 120 minutos levou a uma lesão sem diferença estatística quando comparada a animais infartados pela oclusão permanente da artéria em questão.

Em vista disso, adotou-se o tempo de 90 minutos como protocolo de isquemia, com o intuito de gerar lesões evidenciáveis ao ecocardiograma, sem provocar a mesma disfunção cardíaca que a oclusão permanente da descendente

anterior. Neste modelo foi possível detectar alterações ecocardiográficas precoces provocadas pela injúria, logo na primeira semana após o procedimento. Além disso, a evolução do remodelamento cardíaco pôde ser acompanhada ao longo dos dois meses de estudo.

O ecocardiógrafo específico para camundongos foi extremamente útil para a caracterização do modelo de infarto do miocárdio induzido por IR. Esse modelo mimetiza mais precisamente a situação clínica em que o paciente diagnosticado com infarto é submetido a alguma terapia de revascularização. Apesar de extensamente utilizada, a oclusão permanente da artéria coronária descendente anterior não é um modelo indicado para teste de administração de células, moléculas ou drogas que atuem diretamente na região isquêmica.

Microarranjo genético

A avaliação do perfil de expressão gênica em resposta à disfunção miocárdica de origem isquêmica destacou a ativação de processos de dano, reparo e remodelamento, refletido pelo aumento da expressão de proteínas de choque térmico e receptores *toll-like*. Além disso, observou-se um aumento da expressão de genes relacionado à via de apoptose. A presença de insulto isquêmico, associada à alteração nos processos de reparo e remodelamento, levam à reprogramação metabólica, constatada pelo grande número de genes alterados relacionados à manutenção da homeostase, regulação de ciclo celular, proteínas de citoesqueleto, fatores de transcrição e resposta ao estresse.

Devaux e colaboradores, procurando novos marcadores de prognóstico em pacientes com insuficiência cardíaca, avaliaram a expressão de genes relacionados à angiogênese em sangue periférico, correlacionando o nível de expressão destes com a fração de ejeção do paciente, no qual destacaram-se três genes: VEGFB, PGF e THBS1 que apresentaram correlação linear com o parâmetro funcional.¹⁶⁷ No presente experimento observou-se aumento da expressão do gene da trombospondina 1 (THBS1) diretamente no miocárdio de animais infartados. Não se observou a mesma correlação com o fator de crescimento vascular B (VEGFB); entretanto verificou-se que o VEGFA, representante da mesma família, apresentava expressão aumentada, o que está compatível com o trabalho de Lee e colaboradores.¹⁶⁸

Outro possível marcador de prognóstico da IC relatado na literatura, em que também se detectou o aumento da expressão, foi a periostina (POSTN).¹⁶⁹ Sua presença não é detectada em ventrículos normais, entretanto sua expressão aumenta após o evento isquêmico.¹⁷⁰ Camundongos transgênicos com expressão aumentada de periostina são mais susceptíveis a ruptura cardíaca após o infarto.¹⁷¹

Apoptose

A apoptose desempenha papel-chave na patogênese das miocardiopatias em seus diferentes estágios. Sua ativação ocorre através de múltiplos fatores como produção de citocinas, aumento do estresse oxidativo e dano ao DNA.⁴⁴ Na presença desses estímulos a morte programada pode ser ativada em cardiomiócitos não isquêmicos na borda do infarto, contribuindo assim para a expansão da lesão e remodelamento ventricular.⁴⁵

O componente central dessa maquinaria é um sistema proteolítico, envolvendo uma família de proteases chamada caspases. Essas enzimas participam de uma cascata ativada em resposta aos agentes pró-apoptóticos citados e culmina na clivagem de diversas proteínas, resultando em desestruturação da célula. A ativação desse sistema pode ser feita por uma via extrínseca, dependente de receptores de citocinas (em especial os relacionados ao TNF) na membrana celular, ou pela via intrínseca representada pelas proteínas da família bcl-2 localizadas na membrana mitocondrial externa.

Os resultados aqui encontrados demonstram a manutenção do estímulo pró-apoptótico em animais com insuficiência cardíaca, principalmente pela elevada expressão de genes da via extrínseca da apoptose, como receptor de TNF, caspases 8 e 3. Diferentes estudos sobre a inibição da atividade das caspases demonstraram atenuação do remodelamento cardíaco,¹⁷²⁻¹⁷⁴ através da redução da apoptose, e da clivagem de proteínas contráteis como a troponina I.

Neste cenário, as duas caspases com expressão aumentada no presente estudo são de grande importância. A função central da caspase 8 na indução da apoptose é a ativação direta da caspase 3 através de ligantes ativáveis. Communal e colaboradores¹⁷⁵ trataram proteínas miofibrilares com caspase 3 recombinante humana e analisaram os produtos de clivagem através de *western blot*. Seus resultados demonstraram que a caspase 3 ativada age em três componentes de

miofilamentos - a α actina, α actinina e troponina T, levando à redução da função sistólica.

Porém, o aumento da expressão de genes relacionados às caspases não garante a ocorrência exacerbada da morte celular, uma vez que genes com atividade antiapoptótica (IAP, Bcl2 e Bcl/XL) também se encontram com expressão aumentada, assim como observado nos estudos em humanos.¹⁷⁶ Os membros pró-apoptóticos e antiapoptóticos da família bcl-2 atuam como reostato na regulação da morte celular programada. A relação entre antagonistas (bcl-2 e bcl-xl) e agonistas (bax, bcl-xs, bad, bid, bnip3) da apoptose é que determina a resposta celular a determinado estímulo nocivo.¹⁷⁷

Injeção intramiocárdica

No presente trabalho, estudou-se o potencial terapêutico da terapia celular utilizando células mesenquimais de medula óssea no modelo de insuficiência cardíaca de origem isquêmica. A injeção intramiocárdica permitiu a melhora da capacidade ergoespirométrica, além de bloquear a progressão da disfunção sistólica e prevenir a dilatação da cavidade ventricular. Associado a essa melhora funcional, as MSC foram capazes de modular o perfil gênico nos animais infartados, no qual 70% dos genes cardíacos tiveram sua expressão normalizada nos animais que receberam a terapia celular.

Neste estudo, até três semanas após a injeção de células-tronco, foi possível observar a presença de células marcadas no tecido hospedeiro. Porém o número total de células marcadas encontradas no coração diminuiu progressivamente com o tempo, de modo que ao fim de seis semanas nenhuma célula marcada pôde ser encontrada nos cortes histológicos examinados. Esse fato pode estar relacionado à morte celular devido ao estresse oxidativo associado ao processo inflamatório local.¹⁷⁸ Devido à raridade do fenômeno, a presença de células marcadas no tecido hospedeiro apesar de corroborar com processos de fusão e/ou transdiferenciação como mecanismo de ação, não justifica por si só o benefício observado da terapia celular sobre o desempenho cardíaco.

A melhora da função ventricular esquerda e a atenuação do remodelamento cardíaco após a injeção de MSC foram observadas em diferentes protocolos experimentais^{179,180} sem necessariamente haver formação de novos cardiomiócitos.

Li e colaboradores realizaram protocolo experimental semelhante ao aqui utilizado, porém administraram as GFP-MSC logo após a indução da lesão isquêmica.¹⁸¹ Ao avaliarem a cavidade ventricular dez dias após o início do protocolo, constataram que os animais que receberam a terapia apresentaram menor dilatação da cavidade ventricular e maior fração de encurtamento. No mesmo trabalho, observou-se que a quantidade de células eGFP era pequena e que se encontravam próximas à borda da região isquêmica. Tal dado é condizente com os resultados do presente estudo que demonstram a redução da quantidade de células marcadas com o decorrer do protocolo. Neste trabalho destaca-se pois a terapia feita na fase crônica do IAM, com a lesão e a disfunção cardíaca claramente estabelecidas.

O fenômeno de plasticidade celular induzido pela terapia com células de medula óssea ainda permanece controverso. A transdiferenciação, capacidade de uma célula-tronco adulta de um determinado tecido se diferenciar em uma célula madura de outro órgão não relacionado a sua origem, ou a fusão do tipo celular injetado com a célula do tecido hospedeiro, inicialmente, foram as hipóteses levantadas para justificar os benefícios da terapia celular.^{182,183} Porém poucos estudos determinam a real participação desses dois processos na eficácia da terapia celular, e sua comprovação é extremamente complicada, esbarrando na grande quantidade de artefatos durante as análises histológicas. O grupo de Murry e colaboradores, em trabalho com células-tronco hematopoiéticas, não demonstrou a ocorrência de transdiferenciação em cardiomiócitos.¹⁸⁴

Alteração da expressão gênica após terapia com MSC

O perfil de expressão gênica foi avaliado sete semanas após a terapia com injeção intramiocárdica em animais infartados por oclusão permanente da DA. Apesar de as análises histológicas demonstrarem ausência de células marcadas no miocárdio, a expressão gênica foi significativamente alterada no grupo tratado. Dezenas de genes que tiveram sua expressão modificada pela lesão isquêmica apresentaram-se normalizadas no grupo tratado, sugerindo que de alguma forma a terapia celular promoveu a interrupção do processo de disfunção miocárdica progressiva, compatível com os dados funcionais aqui encontrados.

Dentre os genes que tiveram a normalização de sua expressão, destacam-se aqueles observados na via de apoptose, principalmente o sistema de caspases. O

fato de os genes envolvidos na inibição desse processo estarem normalizados, associado à expressão também normal dos sinalizadores de hipóxia e ativadores das vias de morte celular, sugere que as células possivelmente atuaram mantendo a homeostase tecidual. Dessa forma, o resultado observado sugere um mecanismo de ação em que a presença das células injetadas não é necessária para a manutenção do efeito.

A melhora da função ventricular em indivíduos tratados com células mesenquimais foi observada por diversos pesquisadores, porém o mecanismo pelo qual essas células atuam ainda permanece obscuro, não tendo sido encontrados na literatura dados sobre a avaliação do perfil de expressão gênica após a terapia com células-tronco. Diferentes grupos sugeriram que a melhora funcional encontrada em seus protocolos é devida ao aumento da vascularização miocárdica pela angiogênese.¹⁸⁵⁻¹⁸⁷ Outra via possível, já constatada histologicamente, é a redução da apoptose, na qual pela técnica de TUNEL, observa-se a diminuição da formação de corpos apoptóticos.^{188,189} Os grupos de Guo¹⁹⁰ e Du¹⁹¹ constataram, após a injeção intramiocárdica de células mesenquimais, a modulação imunoinflamatória como principal mecanismo que justifica a melhora funcional dos animais infartados.

Injeção intravenosa

A utilização da via intravenosa em indivíduos que se recuperam de IAM é uma interessante estratégia de terapia celular que permite a administração repetida de grande número de células. Poucos estudos foram publicados até o momento sobre o efeito da injeção seriada de células mesenquimais. Os principais fatores que influenciam a decisão sobre a escolha dessa via são a capacidade dessas células atravessarem a barreira capilar pulmonar e o potencial de migração dessas células para o sítio lesionado.

Barbash e colaboradores estudaram o potencial de migração de células mesenquimais administradas por via intravenosa em ratos infartados.¹⁹² Células marcadas com tecnécio foram injetadas pela veia jugular e as imagens foram captadas em câmara gamma. Após quatro horas da terapia, a maior parte das células encontrava-se no pulmão, o restante dividido entre coração, fígado, baço e rins. Através de análises histológicas observaram que apenas 1% das células injetadas estava no coração e localizadas na região próxima à cicatriz, não atingindo

o miocárdio intacto. Além disso, foram realizados experimentos com injeção logo após a indução do infarto e duas semanas após a lesão, não sendo observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais.

O grupo de Krause investigou o potencial terapêutico da utilização dessa via.¹¹¹ Porcos infartados receberam 1×10^6 células/kg de peso pela veia auricular 48 horas após a indução da isquemia, e foram avaliados por ecocardiograma e histologia quatro semanas após o início do protocolo, sendo observada maior fração de ejeção e menor área de infarto no grupo tratado com MSC em relação ao grupo-placebo. Halkos e colaboradores, com protocolo semelhante,¹⁹³ testaram três doses diferentes (1, 3 e 10×10^6 células por kg de peso) de MSC e evidenciaram maior expressão de VEGF e vWF (fator de Von Willebrand) na borda da zona de cicatriz, associada à melhor função sistólica avaliada por ventriculografia comparando os grupos tratados com seus respectivos controles. Não observaram, porém, diferença na melhora funcional entre os grupos tratados com diferentes doses. Em contraste, o grupo de Wolf publicou no ano seguinte, com o mesmo modelo experimental, que o efeito da injeção de células mesenquimais é dose-dependente.¹⁹⁴

No protocolo experimental utilizado neste estudo não se observaram, com uma injeção única de células mesenquimais, efeitos na arquitetura ventricular. Entretanto, três injeções seriadas, com intervalo de uma semana entre elas, impediram a progressão do remodelamento cardíaco provocado pela injúria isquêmica. Assim como no protocolo de injeção intramiocárdica, não se observaram células marcadas no coração ao final do estudo. A pesquisa das células foi feita também em fígado, rim, baço e pulmão e não se observou a presença de células em nenhum desses órgãos.

6 CONCLUSÕES

Ao longo dos sete anos de trabalho no Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular foram desenvolvidos dois modelos de lesão miocárdica e testadas duas vias de administração de células mesenquimais de medula óssea. As conclusões do estudo são no modelo de infarto crônico são:

1. Os dois modelos de lesão miocárdica apresentaram padrões eletrocardiográficos, ecocardiográficos e histológicos compatíveis com o tipo de dano induzido por cada modelo.
2. As células utilizadas derivadas de camundongos GFP apresentaram capacidade de indução adipogênica e osteogênica, além de expressarem perfil de antígenos de superfície CD45 e 34 negativos, compatíveis com o padrão das células mesenquimais;
3. A terapia através da injeção intramiocárdica de GFP-MSC alterou significativamente o perfil de expressão gênica dos animais infartados;
4. A terapia celular por via intramiocárdica e seriada por via intravenosa foram capazes de reduzir o remodelamento cardíaco induzido pela lesão isquêmica.

REFERÊNCIAS

1. Braunwald E. Insuficiência cardíaca. In: Braunwald E. Harrison medicina interna. 15 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill; 2002:1396-1406.
2. Ramani GV, Uber PA, Mehra MR. Chronic heart failure: contemporary diagnosis and management. *Mayo Clin Proc.* 2010;85(2):180-195.
3. Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, Carnethon M, Dai S, De Simone G, et al. Heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 2010;121(7):e46-e215.
4. Bocchi EA, Marcondes-Braga FG, Ayub-Ferreira SM, Rohde LE, Oliveira WA, Almeida DR, et al. III Diretriz brasileira de insuficiência cardíaca crônica. *Arq Bras Cardiol.* 2009;93(1 suppl 1):1-71.
5. Ministério da Saúde. [homepage na internet]. Indicadores de mortalidade. Morbidade hospitalar do SUS. 2009. [acesso em 3/3/2010]. Disponível em: <<http://www.datasus.gov.br>>
6. Vasan RS, Benjamin EJ, Levy D. Prevalence, clinical features and prognosis of diastolic heart failure: an epidemiologic perspective. *J Am Coll Cardiol.* 1995;26(7):1565-1574.
7. Angeja BG, Grossman W. Evaluation and management of diastolic heart failure. *Circulation.* 2003;107(5):659-663.
8. Vasan RS, Larson MG, Benjamin EJ, Evans JC, Reiss CK, Levy D. Congestive heart failure in subjects with normal versus reduced left ventricular ejection fraction: prevalence and mortality in a population-based cohort. *J Am Coll Cardiol.* 1999;33(7):1948-1955.
9. He J, Ogden LG, Bazzano LA, Vupputuri S, Loria C, Whelton PK. Risk factors for congestive heart failure in US men and women: NHANES I epidemiologic follow-up study. *Arch Intern Med.* 2001;161(7):996-1002.
10. CONSENSUS Trial Study Group. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the cooperative North Scandinavian enalapril survival study (CONSENSUS). *N Engl J Med.* 1987;316(23):1429-1435.
11. Pfeffer MA, Braunwald E, Moya LA, Basta L, Brown EJ, Jr., Cuddy TE, et al. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. *N Engl J Med.* 1992;327(10):669-677.
12. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med.* 1999;341(10):709-717.
13. Mehra MR, Kobashigawa J, Starling R, Russell S, Uber PA, Parameshwar J, et al. Listing criteria for heart transplantation: International Society for Heart and Lung

Transplantation guidelines for the care of cardiac transplant candidates-2006. *J Heart Lung Transplant*. 2006;25(9):1024-1042.

14. Khan AA, Kazmi K. Risk stratification after acute myocardial infarction. *J Pak Med Assoc*. 2001;51(2):92-94.

15. Michael LH, Entman ML, Hartley CJ, Youker KA, Zhu J, Hall SR, et al. Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *Am J Physiol*. 1995;269(6 Pt 2):H2147-H2154.

16. O'Brien PJ, Gwathmey JK. Myocardial Ca(2+)- and ATP-cycling imbalances in end-stage dilated and ischemic cardiomyopathies. *Cardiovasc Res*. 1995;30(3):394-404.

17. Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, Cubicciotti RS, Sageman WS, Lurie K, et al. Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med*. 1982;307(4):205-211.

18. Sutton MG, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation*. 2000;101(25):2981-2988.

19. Anversa P, Zhang X, Li P, Olivetti G, Cheng W, Reiss K, et al. Ventricular remodeling in global ischemia. *Cardioscience*. 1995;6(2):89-100.

20. Anversa P, Olivetti G, Leri A, Liu Y, Kajstura J. Myocyte cell death and ventricular remodeling. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1997;6(2):169-176.

21. Elahi AW, Vijayakumar AN, Lichstein E, Mokhtarian F. Interplay of antibody and T cell responses in acute myocardial infarction. *J Lab Clin Med*. 2001;138(2):112-118.

22. de Scheerder IK, de Buyzere ML, Delanghe JR, Clement DL, Wieme RJ. Anti-myosin humoral immune response following cardiac injury. *Autoimmunity*. 1989;4(1-2):51-58.

23. Okazaki T, Honjo T. Pathogenic roles of cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy. *Trends Mol Med*. 2005;11(7):322-326.

24. Moraru M, Roth A, Keren G, George J. Cellular autoimmunity to cardiac myosin in patients with a recent myocardial infarction. *Int J Cardiol*. 2006;107(1):61-66.

25. Lim PL, Zouali M. Pathogenic autoantibodies: emerging insights into tissue injury. *Immunol Lett*. 2006;103(1):17-26.

26. Neu N, Beisel KW, Traystman MD, Rose NR, Craig SW. Autoantibodies specific for the cardiac myosin isoform are found in mice susceptible to Coxsackievirus B3-induced myocarditis. *J Immunol*. 1987;138(8):2488-2492.

27. de Scheerder IK, de Buyzere M, Delanghe J, Maas A, Clement DL, Wieme R. Humoral immune response against contractile proteins (actin and myosin) during cardiovascular disease. *Eur Heart J*. 1991;12(suppl D):88-94.

28. Entman ML, Smith CW. Postreperfusion inflammation: a model for reaction to injury in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*. 1994;28(9):1301-1311.

29. Frangogiannis NG, Youker KA, Rossen RD, Gwechenberger M, Lindsey MH, Mendoza LH, et al. Cytokines and the microcirculation in ischemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 1998;30(12):2567-2576.
30. Frangogiannis NG, Youker KA, Entman ML. The role of the neutrophil in myocardial ischemia and reperfusion. *EXS.* 1996;76:263-284.
31. Mehta JL, Li DY. Inflammation in ischemic heart disease: response to tissue injury or a pathogenetic villain? *Cardiovasc Res.* 1999;43(2):291-299.
32. Young HA, Bream JH. IFN-gamma: recent advances in understanding regulation of expression, biological functions, and clinical applications. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2007;316:97-117.
33. Cheng X, Liao YH, Ge H, Li B, Zhang J, Yuan J, et al. TH1/TH2 functional imbalance after acute myocardial infarction: coronary arterial inflammation or myocardial inflammation. *J Clin Immunol.* 2005;25(3):246-253.
34. Kennedy MK, Torrance DS, Picha KS, Mohler KM. Analysis of cytokine mRNA expression in the central nervous system of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis reveals that IL-10 mRNA expression correlates with recovery. *J Immunol.* 1992;149(7):2496-2505.
35. Torre-Amione G, Kapadia S, Benedict C, Oral H, Young JB, Mann DL. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of left ventricular dysfunction (SOLVD). *J Am Coll Cardiol.* 1996;27(5):1201-1206.
36. Frangogiannis NG, Entman ML. Chemokines in myocardial ischemia. *Trends Cardiovasc Med.* 2005;15(5):163-169.
37. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell.* 2003;114(6):763-776.
38. Kajstura J, Zhang X, Reiss K, Szoke E, Li P, Lagrasta C, et al. Myocyte cellular hyperplasia and myocyte cellular hypertrophy contribute to chronic ventricular remodeling in coronary artery narrowing-induced cardiomyopathy in rats. *Circ Res.* 1994;74(3):383-400.
39. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Fletcher PJ, Braunwald E. Ventricular performance in rats with myocardial infarction and failure. *Am J Med.* 1984;76(5B):99-103.
40. Swynghedauw B. Remodeling of the heart in chronic pressure overload. *Basic Res Cardiol.* 1991;86(suppl 1):99-105.
41. Weber KT. Extracellular matrix remodeling in heart failure: a role for de novo angiotensin II generation. *Circulation.* 1997;96(11):4065-4082.
42. Yue P, Long CS, Austin R, Chang KC, Simpson PC, Massie BM. Post-infarction heart failure in the rat is associated with distinct alterations in cardiac myocyte molecular phenotype. *J Mol Cell Cardiol.* 1998;30(8):1615-1630.

43. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation*. 1990;81(4):1161-1172.
44. Lee Y, Gustafsson AB. Role of apoptosis in cardiovascular disease. *Apoptosis*. 2009;14(4):536-548.
45. Pimentel DR, Amin JK, Xiao L, Miller T, Viereck J, Oliver-Krasinski J, et al. Reactive oxygen species mediate amplitude-dependent hypertrophic and apoptotic responses to mechanical stretch in cardiac myocytes. *Circ Res*. 2001;89(5):453-460.
46. Johns TN, Olson BJ. Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals. *Ann Surg*. 1954;140(5):675-682.
47. Goldman S, Raya TE. Rat infarct model of myocardial infarction and heart failure. *J Card Fail*. 1995;1(2):169-177.
48. Michael LH, Ballantyne CM, Zachariah JP, Gould KE, Pocius JS, Taffet GE, et al. Myocardial infarction and remodeling in mice: effect of reperfusion. *Am J Physiol*. 1999;277(2 Pt 2):H660-H668.
49. Gehrman J, Frantz S, Maguire CT, Vargas M, Ducharme A, Wakimoto H, et al. Electrophysiological characterization of murine myocardial ischemia and infarction. *Basic Res Cardiol*. 2001;96(3):237-250.
50. Gao XM, Dart AM, Dewar E, Jennings G, Du XJ. Serial echocardiographic assessment of left ventricular dimensions and function after myocardial infarction in mice. *Cardiovasc Res*. 2000;45(2):330-338.
51. Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett*. 1997;407(3):313-319.
52. Jacob S, Laury-Kleintop L, Lanza-Jacoby S. The select cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib reduced the extent of atherosclerosis in Apo E^{-/-} mice. *J Surg Res*. 2007;146(1):135-142.
53. Liehn EA, Merx MW, Postea O, Becher S, Talab YD, Shagdarsuren E, et al. Ccr1 deficiency reduces inflammatory remodeling and preserves left ventricular function after myocardial infarction. *J Cell Mol Med*. 2008; 12(2):496-506.
54. Kumar D, Hacker TA, Buck J, Whitesell LF, Kaji EH, Douglas PS, et al. Distinct mouse coronary anatomy and myocardial infarction consequent to ligation. *Coron Artery Dis*. 2005;16(1):41-44.
55. Boden WE, Eagle K, Granger CB. Reperfusion strategies in acute ST-segment elevation myocardial infarction: a comprehensive review of contemporary management options. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50(10):917-929.
56. Nossuli TO, Lakshminarayanan V, Baumgarten G, Taffet GE, Ballantyne CM, Michael LH, et al. A chronic mouse model of myocardial ischemia-reperfusion: essential in cytokine studies. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;278(4):H1049-H1055.

57. Rodrigues AC, Hataishi R, Ichinose F, Bloch KD, Derumeaux G, Picard MH, et al. Relationship of systolic dysfunction to area at risk and infarction size after ischemia-reperfusion in mice. *J Am Soc Echocardiogr.* 2004;17(9):948-953.
58. Scherrer-Crosbie M, Steudel W, Ullrich R, Hunziker PR, Liel-Cohen N, Newell J, et al. Echocardiographic determination of risk area size in a murine model of myocardial ischemia. *Am J Physiol.* 1999;277(3 Pt 2):H986-H992.
59. Azhar G, Gao W, Liu L, Wei JY. Ischemia-reperfusion in the adult mouse heart influence of age. *Exp Gerontol.* 1999;34(5):699-714.
60. Tadel-Kocjancic S, Zorman S, Jazbec A, Gorjup V, Zorman D, Noc M. Effectiveness of primary percutaneous coronary intervention for acute ST-elevation myocardial infarction from a 5-year single-center experience. *Am J Cardiol.* 2008;101(2):162-168.
61. Cox DA, Stone GW, Grines CL, Stuckey T, Zimetbaum PJ, Tchong JE, et al. Comparative early and late outcomes after primary percutaneous coronary intervention in ST-segment elevation and non-ST-segment elevation acute myocardial infarction (from the CADILLAC trial). *Am J Cardiol.* 2006;98(3):331-337.
62. Fath-Ordoubadi F, Huehns TY, Al Mohammad A, Beatt KJ. Significance of the thrombolysis in myocardial infarction scoring system in assessing infarct-related artery reperfusion and mortality rates after acute myocardial infarction. *Am Heart J.* 1997;134(1):62-68, 1997.
63. Maxwell SR, Lip GY. Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. *Int J Cardiol.* 1997;58(2):95-117.
64. Buja LM. Myocardial ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc Pathol.* 2005;(4):170-175.
65. Kaminski KA, Bonda TA, Korecki J, Musial WJ. Oxidative stress and neutrophil activation--the two keystones of ischemia/reperfusion injury. *Int J Cardiol.* 2002;86(1):41-59.
66. Moreira LF, Stolf NA, Bocchi EA, Bacal F, Pego-Fernandes PM, Jatene AD. Cardiomyoplasty perspectives in the treatment of heart failure. *Arq Bras Cardiol.* 1994;63(3):261-266.
67. Ezekowitz JA, Kaul P. The epidemiology and management of elderly patients with myocardial infarction or heart failure. *Heart Fail Rev.* 2010;
68. Kannel WB. Incidence and epidemiology of heart failure. *Heart Fail Rev.* 2000;5(2):167-173.
69. Moreira LP, Stolf NA, Bacal F, Bocchi EA, Oliveira SA. Long-term outcomes of dynamic cardiomyoplasty: what we learned and challenges for future applications. *J Heart Lung Transplant.* 2001;20(2):189.
70. Luckraz H, Sharples LD, Charman SC, Tsui SS, Wallwork J, Parameshwar J, et al. Does heart transplantation confer survival benefit in all risk groups? *J Heart Lung Transplant.* 2005;24(9):1231-1234.

71. Korewicki J. Cardiac transplantation is still the method of choice in the treatment of patients with severe heart failure. *Cardiol J.* 2009;16(6):493-499.
72. Coughlin SS, Comstock GW, Baughman KL. Descriptive epidemiology of idiopathic dilated cardiomyopathy in Washington County, Maryland, 1975-1991. *J Clin Epidemiol.* 1993;46(9):1003-1008.
73. Tousoulis D, Briasoulis A, Antoniadis C, Stefanadi E, Stefanadis C. Heart regeneration: what cells to use and how? *Curr Opin Pharmacol.* 2008;8(2):211-218.
74. Bocchi EA, Bacal F, Guimaraes G, Mendroni A, Mocelin Filho AE, et al. Granulocyte-colony stimulating factor or granulocyte-colony stimulating factor associated to stem cell intracoronary infusion effects in non ischemic refractory heart failure. *Int J Cardiol.* 2010;138(1):94-97.
75. Vilas-Boas F, Feitosa GS, Soares MB, Mota A, Pinho-Filho JA, Almeida AJ, et al. Early results of bone marrow cell transplantation to the myocardium of patients with heart failure due to Chagas disease. *Arq Bras Cardiol.* 2006;87(2):159-166.
76. Dohmann HF, Silva SA, Sousa AL, Braga AM, Branco RV, Haddad AF, et al. Multicenter double blind trial of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation through intracoronary injection post acute myocardium infarction - MiHeart/AMI study. *Trials.* 2008;9:41.
77. George JC. Stem cell therapy in acute myocardial infarction: a review of clinical trials. *Transl Res.* 2010;155(1):10-19.
78. Nichols JE, Niles J, Walls S, Cortiella J. In vitro human bone marrow analog: clinical potential. *Regen Med.* 2010;5(2):289-298.
79. Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science.* 1988;241(4861):58-62.
80. Battiwalla M, Hematti P. Mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Cytotherapy.* 2009;11(5):503-515.
81. Iscove NN, Nawa K. Hematopoietic stem cells expand during serial transplantation in vivo without apparent exhaustion. *Curr Biol.* 1997;7(10):805-808.
82. Blank U, Karlsson G, Karlsson S. Signaling pathways governing stem-cell fate. *Blood.* 2008;111(2):492-503.
83. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science.* 1997;276(5309):71-74.
84. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol.* 1976;4(5):267-274.
85. Piersma AH, Ploemacher RE, Brockbank KG. Transplantation of bone marrow fibroblastoid stromal cells in mice via the intravenous route. *Br J Haematol.* 1983;54(2):285-290.

86. Piersma AH, Brockbank KG, Ploemacher RE. Regulation of in vitro myelopoiesis by a hemopoietic stromal fibroblastic cell line. *Exp Hematol*. 1984;12(8):617-623.
87. Piersma AH, Brockbank KG, Ploemacher RE, van Vliet E, Brakel-van Peer KM, Visser PJ. Characterization of fibroblastic stromal cells from murine bone marrow. *Exp Hematol*. 1985;13(4):237-243.
88. Owen M. Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci*. 1988;(suppl 10):63-76.
89. Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp*. 1988;136:42-60.
90. Wakitani S, Saito T, Caplan AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve*. 1995;18(12):1417-1426.
91. Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, et al. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*. 1994;76(4):579-592.
92. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet*. 1987;20(3):263-272.
93. Luria EA, Owen ME, Friedenstein AJ, Morris JF, Kuznetsow SA. Bone formation in organ cultures of bone marrow. *Cell Tissue Res*. 1987;248(2):449-454.
94. Rogers JJ, Young HE, Adkison LR, Lucas PA, Black AC., Jr. Differentiation factors induce expression of muscle, fat, cartilage, and bone in a clone of mouse pluripotent mesenchymal stem cells. *Am Surg*. 1995;61(3):231-236.
95. Pittenger MF, Mosca JD, McIntosh KR. Human mesenchymal stem cells: progenitor cells for cartilage, bone, fat and stroma. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2000;251:3-11.
96. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991;9(5):641-650.
97. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-317.
98. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005;7(5):393-395.
99. Perin EC, Lopez J. Methods of stem cell delivery in cardiac diseases. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2006;3(suppl 1):S110-S113.
100. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet*. 2004;364(9429):141-148.

101. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, et al. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2006;355(12):1210-1221.
102. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, et al. Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial. *Eur Heart J*. 2006;27(23):2775-2783.
103. Hasegawa H, Takano H, Shiraishi H, Ueda K, Niitsuma Y, Tadokoro H, et al. Intracoronary injection of granulocyte colony-stimulating factor ameliorates the progression of left ventricular remodeling after myocardial ischemia/reperfusion in rabbits. *Circ J*. 2006;70(7):942-944.
104. Sato T, Suzuki H, Kusuyama T, Omori Y, Soda T, Tsunoda F, et al. G-CSF after myocardial infarction accelerates angiogenesis and reduces fibrosis in swine. *Int J Cardiol*. 2008;127(2):166-173.
105. Werneck-de-Castro JP, Costa-e-Sousa RH, Oliveira PF, Pinho-Ribeiro V, Mello DB, Pecanha R, et al. G-CSF does not improve systolic function in a rat model of acute myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*. 2006;101(6):494-501.
106. Louzada RA, Oliveira PF, Cavalcanti-de-Albuquerque JP, Cunha-Carvalho L, Baldanza MR, Kasai-Brunswick TH, et al. Granulocyte-colony stimulating factor treatment of chronic myocardial infarction. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2010.
107. Zohlnhofer D, Ott I, Mehilli J, Schomig K, Michalk F, Ibrahim T, et al. Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2006;295(9):1003-1010.
108. Ripa RS, Jorgensen E, Wang Y, Thune JJ, Nilsson JC, Sondergaard L, et al. Stem cell mobilization induced by subcutaneous granulocyte-colony stimulating factor to improve cardiac regeneration after acute ST-elevation myocardial infarction: result of the double-blind, randomized, placebo-controlled stem cells in myocardial infarction (STEMMI) trial. *Circulation*. 2006;113(16):1983-1992.
109. Engelmann MG, Theiss HD, Hennig-Theiss C, Huber A, Wintersperger BJ, Werle-Ruedinger AE, et al. Autologous bone marrow stem cell mobilization induced by granulocyte colony-stimulating factor after subacute ST-segment elevation myocardial infarction undergoing late revascularization: final results from the G-CSF-STEMI (Granulocyte Colony-Stimulating Factor ST-Segment Elevation Myocardial Infarction) trial. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48(8):1712-1721.
110. Ellis SG, Penn MS, Bolwell B, Garcia M, Chacko M, Wang T, et al. Granulocyte colony stimulating factor in patients with large acute myocardial infarction: results of a pilot dose-escalation randomized trial. *Am Heart J*. 2006;152(6):1051-e9-14.
111. Krause U, Harter C, Seckinger A, Wolf D, Reinhard A, Bea F, et al. Intravenous delivery of autologous mesenchymal stem cells limits infarct size and improves left ventricular function in the infarcted porcine heart. *Stem Cells Dev*. 2007;16(1):31-37.

112. Price MJ, Chou CC, Frantzen M, Miyamoto T, Kar S, Lee S, et al. Intravenous mesenchymal stem cell therapy early after reperfused acute myocardial infarction improves left ventricular function and alters electrophysiologic properties. *Int J Cardiol.* 2006;111(2):231-239.
113. Institute of Laboratory Animal Resources. National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals. 7th ed. Washington, DC. 1996.
114. Klocke R, Tian W, Kuhlmann MT, Nikol S. Surgical animal models of heart failure related to coronary heart disease. *Cardiovasc Res.* 2007;74(1):29-38.
115. Carneiro EF. As síndromes isquêmicas. In: Carneiro EF. O eletrocardiograma. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu;1977:209-276.
116. Deccache W. Cardiopatia isquêmica. In: Deccache W. Eletrocardiograma revistado e facilitado. Rio de Janeiro: Revinter; 2006:103-136.
117. Moffa PJ. O eletrocardiograma nas perturbações da irrigação do miocárdio: infarto do miocárdio, vetores de necrose, lesão e isquemia. In: Moffa PJ. Tranches: eletrocardiograma normal e patológico. 7a ed. São Paulo: Roca; 1999:463-490.
118. Iacobas DA, Urban-Maldonado M, Iacobas S, Scemes E, Spray DC. Array analysis of gene expression in connexin-43 null astrocytes. *Physiol Genomics.* 2003;15(3):177-190.
119. Iacobas DA, Iacobas S, Urban-Maldonado M, Spray DC. Sensitivity of the brain transcriptome to connexin ablation. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1711(2):183-196.
120. Iacobas DA, Iacobas S, Li WE, Zoidl G, Dermietzel R, Spray DC. Genes controlling multiple functional pathways are transcriptionally regulated in connexin43 null mouse heart. *Physiol Genomics.* 2005;20(3):211-223.
121. 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.* 1987;10(11):641-652.
122. Lachtermacher S, Esporcatte BLB, Montalvao F, Costa PC, Rodrigues DC, Belem L, et al. Cardiac gene expression and systemic cytokine profile are complementary in a murine model of post-ischemic heart failure. *Braz J Med Biol Res.* 2010. 43(4):377-89.
123. Michael MA, El Masry H, Khan BR, Das MK. Electrocardiographic signs of remote myocardial infarction. *Prog Cardiovasc Dis.* 2007;50(3):198-208.
124. Brady WJ, Syverud SA, Beagle C, Perron AD, Ullman EA, Holstege C, et al. Electrocardiographic ST-segment elevation: the diagnosis of acute myocardial infarction by morphologic analysis of the ST segment. *Acad Emerg Med.* 2001;8(10):961-967.
125. Lemos JA. ST-Segment resolution as a marker of epicardial and myocardial reperfusion after thrombolysis: insights from the TIMI 14 and in TIME-II trials. *J Electrocardiol.* 2000;33(suppl):67-72.

126. Kumar S, Sivagangabalan G, Hsieh C, Ryding AD, Narayan A, Chan H, et al. Predictive value of ST resolution analysis performed immediately versus at ninety minutes after primary percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol.* 2010;105(4):467-474.
127. Harkness JR, Sabatine MS, Braunwald E, Morrow DA, Sloan S, Wiviott SD, et al. Extent of ST-segment resolution after fibrinolysis adds improved risk stratification to clinical risk score for ST-segment elevation myocardial infarction. *Am Heart J.* 2010;159(1):55-62.
128. Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation.* 2001;104(3):365-372.
129. Lee KT, Jarmolych J, Kim DN, Grant C, Krasney JA, Thomas WA, et al. Production of advanced coronary atherosclerosis, myocardial infarction and "sudden death" in swine. *Exp Mol Pathol.* 1971;15(2):170-190.
130. Wilson RB. Thromboembolism in the pathogenesis of myocardial infarcts in rats fed a thrombogenic diet. *Atherosclerosis.* 1985;54(3):347-349.
131. Bond MG, Bullock BC, Bellinger DA, Hamm TE. Myocardial infarction in a large colony of nonhuman primates with coronary artery atherosclerosis. *Am J Pathol.* 1980;101(3):675-692.
132. van den Bos EJ, Mees BM, de Waard MC, de Crom R, Duncker DJ. A novel model of cryoinjury-induced myocardial infarction in the mouse: a comparison with coronary artery ligation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289(3):H1291-H1300.
133. Bayat H, Swaney JS, Ander AN, Dalton N, Kennedy BP, Hammond HK, et al. Progressive heart failure after myocardial infarction in mice. *Basic Res Cardiol.* 2002;97(3):206-213.
134. Sam F, Sawyer DB, Chang DL, Eberli FR, Ngoy S, Jain M, et al. Progressive left ventricular remodeling and apoptosis late after myocardial infarction in mouse heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;279(1):H422-H428.
135. Gehrman J, Frantz S, Maguire CT, Vargas M, Ducharme A, Wakimoto H, et al. Electrophysiological characterization of murine myocardial ischemia and infarction. *Basic Res Cardiol.* 2001;96(3):237-250.
136. Kumashiro H, Kusachi S, Moritani H, Ohnishi H, Nakahama M, Uesugi T, et al. Establishment of a long-surviving murine model of myocardial infarction: qualitative and quantitative conventional microscopic findings during pathological evolution. *Basic Res Cardiol.* 1999;94(2):78-84.
137. Malacrida R, Genoni M, Maggioni AP, Spataro V, Parish S, Palmer A, et al. A comparison of the early outcome of acute myocardial infarction in women and men. The third international study of infarct survival collaborative group. *N Engl J Med.* 1998;338(1):8-14.
138. Vaccarino V, Parsons L, Every NR, Barron HV, Krumholz HM. Sex-based differences in early mortality after myocardial infarction. National Registry of myocardial infarction 2 participants. *N Engl J Med.* 1999;341(4):217-225.

139. Simon T, Mary-Krause M, Funck-Brentano C, Jaillon P. Sex differences in the prognosis of congestive heart failure: results from the Cardiac insufficiency bisoprolol study (CIBIS II). *Circulation*. 2001;103(3):375-380.
140. Lucia P, Coppola A, Manetti LL, Sebastiani ML, Colliardo A, Cerroni F, et al. Cardiac troponin I in acute coronary ischemic syndromes. Epidemiological and clinical correlates. *Int J Cardiol*. 2001;77(2-3):215-222.
141. Antman EM, Tanasijevic MJ, Thompson B, Schactman M, McCabe CH, Cannon CP, et al. Cardiac-specific troponin I levels to predict the risk of mortality in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. 1996;335(18):1342-1349.
142. Ohman EM, Armstrong PW, Christenson RH, Granger CB, Katus HA, Hamm CW, et al. Cardiac troponin T levels for risk stratification in acute myocardial ischemia. GUSTO IIA Investigators. *N Engl J Med*. 1996;335(18):1333-1341.
143. Wagner I, Mair J, Fridrich L, Artner-Dworzak E, Lechleitner P, Morass B, et al. Cardiac troponin T release in acute myocardial infarction is associated with scintigraphic estimates of myocardial scar. *Coron Artery Dis*. 1993;4(6):537-544.
144. Ricchiuti V, Sharkey SW, Murakami MM, Voss EM, Apple FS. Cardiac troponin I and T alterations in dog hearts with myocardial infarction: correlation with infarct size. *Am J Clin Pathol*. 1998;110(2):241-247.
145. Remppis A, Ehlermann P, Giannitsis E, Greten T, Most P, Muller-Bardorff M, et al. Cardiac troponin T levels at 96 hours reflect myocardial infarct size: a pathoanatomical study. *Cardiology*. 2000;93(4):249-253.
146. Fishbein MC, Wang T, Matijasevic M, Hong L, Apple FS. Myocardial tissue troponins T and I. An immunohistochemical study in experimental models of myocardial ischemia. *Cardiovasc Pathol*. 2003;12(2):65-71.
147. Alpert JS, Thygesen K, Antman E, Bassand JP. 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*. 2000;36(3):959-969.
148. Metzler B, Hammerer-Lercher A, Jehle J, Dietrich H, Pachinger O, Xu Q, et al. Plasma cardiac troponin T closely correlates with infarct size in a mouse model of acute myocardial infarction. *Clin Chim Acta*. 2002;325(1-2):87-90.
149. Okamoto Y, Chaves A, Chen J, Kelley R, Jones K, Weed HG, et al. Transgenic mice with cardiac-specific expression of activating transcription factor 3, a stress-inducible gene, have conduction abnormalities and contractile dysfunction. *Am J Pathol*. 2001;159(2):639-650.
150. London B, Jeron A, Zhou J, Buckett P, Han X, Mitchell GF, et al. Long QT and ventricular arrhythmias in transgenic mice expressing the N terminus and first transmembrane segment of a voltage-gated potassium channel. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95(6):2926-2931.

151. Tamaddon HS, Vaidya D, Simon AM, Paul DL, Jalife J, Morley GE. High-resolution optical mapping of the right bundle branch in connexin40 knockout mice reveals slow conduction in the specialized conduction system. *Circ Res*. 2000;87(10):929-936.
152. Xu H, Barry DM, Li H, Brunet S, Guo W, Nerbonne JM. Attenuation of the slow component of delayed rectification, action potential prolongation, and triggered activity in mice expressing a dominant-negative Kv2 alpha subunit. *Circ Res*. 1999;85(7):623-633.
153. Chu V, Otero JM, Lopez O, Morgan JP, Amende I, Hampton TG. Method for non-invasively recording electrocardiograms in conscious mice. *BMC Physiol*. 2001;1:6.
154. Maguire CT, Bevilacqua LM, Wakimoto H, Gehrman J, Berul CI. Maturational atrioventricular nodal physiology in the mouse. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2000;11(5):557-564.
155. Chaves AA, Dech SJ, Nakayama T, Hamlin RL, Bauer JA, Carnes CA. Age and anesthetic effects on murine electrocardiography. *Life Sci*. 2003;72(21):2401-2412.
156. Bonnemeier H, Ortak J, Wiegand UK, Eberhardt F, Bode F, Schunkert H, et al. Accelerated idioventricular rhythm in the post-thrombolytic era: incidence, prognostic implications, and modulating mechanisms after direct percutaneous coronary intervention. *Ann Noninvasive Electrocardiol*. 2005;10(2):179-187.
157. Gorenek B. Tachyarrhythmias in percutaneous coronary interventions. *J Electrocardiol*. 2006;39(4):412-415.
158. Gorcsan J, III, Lang RM, Picard MH, Zoghbi WA, Frommelt PC, Gillam LD. Proceedings of the 15th Annual Scientific Sessions of the American Society of Echocardiography; 2004 Jun 26-30; Pittsburgh, USA. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44(11):2111-2116.
159. Suehiro K, Takuma S, Cardinale C, Hozumi T, Shimizu J, Yano H, et al. Assessment of segmental wall motion abnormalities using contrast two-dimensional echocardiography in awake mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280(4):H1729-H1735.
160. Rodrigues AC, Hataishi R, Ichinose F, Bloch KD, Derumeaux G, Picard MH, et al. Relationship of systolic dysfunction to area at risk and infarction size after ischemia-reperfusion in mice. *J Am Soc Echocardiogr*. 2004;17(9):948-953.
161. Schaefer A, Klein G, Brand B, Lippolt P, Drexler H, Meyer GP. Evaluation of left ventricular diastolic function by pulsed Doppler tissue imaging in mice. *J Am Soc Echocardiogr*. 2003;16(11):1144-1149.
162. Kostuk WJ, Kazamias TM, Gander MP, Simon AL, Ross J, Jr. Left ventricular size after acute myocardial infarction. Serial changes and their prognostic significance. *Circulation*. 1973;47(6):1174-1179.
163. Collins KA, Korcarz CE, Lang RM. Use of echocardiography for the phenotypic assessment of genetically altered mice. *Physiol Genomics*. 2003;13(3):227-239.

164. Patten RD, Aronovitz MJ, Deras-Mejia L, Pandian NG, Hanak GG, Smith JJ, et al. Ventricular remodeling in a mouse model of myocardial infarction. *Am J Physiol*. 1998;274(5 Pt 2):H1812-H1820.
165. Boyle MP, Weisman HF. Limitation of infarct expansion and ventricular remodeling by late reperfusion. Study of time course and mechanism in a rat model. *Circulation*. 1993;88(6):2872-2883.
166. Hirayama A, Adachi T, Asada S, Mishima M, Nanto S, Kusuoka H, et al. Late reperfusion for acute myocardial infarction limits the dilatation of left ventricle without the reduction of infarct size. *Circulation*. 1993;88(6):2565-2574.
167. Devaux Y, Azuaje F, Vausort M, Yvorra C, Wagner DR. Integrated protein network and microarray analysis to identify potential biomarkers after myocardial infarction. *Funct Integr Genomics*. 2010.
168. Lee SH, Wolf PL, Escudero R, Deutsch R, Jamieson SW, Thistlethwaite PA. Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N Engl J Med*. 2000;342(9):626-633.
169. Asakura M, Kitakaze M. Global gene expression profiling in the failing myocardium. *Circ J*. 2009;73(9):1568-1576.
170. Oka T, Xu J, Kaiser RA, Melendez J, Hambleton M, Sargent MA, et al. Genetic manipulation of periostin expression reveals a role in cardiac hypertrophy and ventricular remodeling. *Circ Res*. 2007;101(3):313-321.
171. Katsuragi N, Morishita R, Nakamura N, Ochiai T, Taniyama Y, Hasegawa Y, et al. Periostin as a novel factor responsible for ventricular dilation. *Circulation*. 2004;110(13):1806-1813.
172. Mocanu MM, Baxter GF, Yellon DM. Caspase inhibition and limitation of myocardial infarct size: protection against lethal reperfusion injury. *Br J Pharmacol*. 2000;130(2):197-200.
173. Huang JQ, Radinovic S, Rezaiefar P, Black SC. In vivo myocardial infarct size reduction by a caspase inhibitor administered after the onset of ischemia. *Eur J Pharmacol*. 2000;402(1-2):139-142.
174. Chandrashekar Y, Sen S, Anway R, Shuros A, Anand I. Long-term caspase inhibition ameliorates apoptosis, reduces myocardial troponin-I cleavage, protects left ventricular function, and attenuates remodeling in rats with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43(2):295-301.
175. Communal C, Sumandea M, de Tombe P, Narula J, Solaro RJ, Hajjar RJ. Functional consequences of caspase activation in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(9):6252-6256.
176. Haider N, Arbustini E, Gupta S, Liu H, Narula N, Hajjar R, et al. Concurrent upregulation of endogenous proapoptotic and antiapoptotic factors in failing human hearts. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2009;6(3):250-261.

177. Sorenson CM. Bcl-2 family members and disease. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1644(2-3):169-177.
178. Suzuki K, Murtuza B, Beauchamp JR, Smolenski RT, Varela-Carver A, Fukushima S, et al. Dynamics and mediators of acute graft attrition after myoblast transplantation to the heart. *FASEB J*. 2004;18(10):1153-1155.
179. Mazhari R, Hare JM. Advances in cell-based therapy for structural heart disease. *Prog Cardiovasc Dis*. 2007;49(6):387-395.
180. Amado LC, Saliaris AP, Schuleri KH, St John M, Xie JS, Cattaneo S, et al. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(32):11474-11479.
181. Li Q, Turdi S, Thomas DP, Zhou T, Ren J. Intra-myocardial delivery of mesenchymal stem cells ameliorates left ventricular and cardiomyocyte contractile dysfunction following myocardial infarction. *Toxicol Lett*. 2010;195(2-3):119-126.
182. Rota M, Kajstura J, Hosoda T, Bearzi C, Vitale S, Esposito G, et al. Bone marrow cells adopt the cardiomyogenic fate in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(45):17783-17788.
183. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001;410(6829):701-705.
184. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature*. 2004;428(6983):664-668.
185. Li Q, Turdi S, Thomas DP, Zhou T, Ren J. Intra-myocardial delivery of mesenchymal stem cells ameliorates left ventricular and cardiomyocyte contractile dysfunction following myocardial infarction. *Toxicol Lett*. 2010.
186. Tang J, Wang J, Zheng F, Kong X, Guo L, Yang J, et al. Combination of chemokine and angiogenic factor genes and mesenchymal stem cells could enhance angiogenesis and improve cardiac function after acute myocardial infarction in rats. *Mol Cell Biochem*. 2010.
187. Huang NF, Lam A, Fang Q, Sievers RE, Li S, Lee RJ. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in fibrin augment angiogenesis in the chronically infarcted myocardium. *Regen Med*. 2009;4(4):527-538.
188. He A, Jiang Y, Gui C, Sun Y, Li J, Wang JA. The antiapoptotic effect of mesenchymal stem cell transplantation on ischemic myocardium is enhanced by anoxic preconditioning. *Can J Cardiol*. 2009;25(6):353-358.
189. Li W, Ma N, Ong LL, Nesselmann C, Klopsch C, Ladilov Y, et al. Bcl-2 engineered MSCs inhibited apoptosis and improved heart function. *Stem Cells*. 2007;25(8):2118-2127.
190. Guo J, Lin GS, Bao CY, Hu ZM, Hu MY. Anti-inflammation role for mesenchymal stem cells transplantation in myocardial infarction. *Inflammation*. 2007;30(3-4):97-104.

191. Du YY, Zhou SH, Zhou T, Su H, Pan HW, Du WH, et al. Immuno-inflammatory regulation effect of mesenchymal stem cell transplantation in a rat model of myocardial infarction. *Cytotherapy*. 2008;10(5):469-478.
192. Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, Feinberg MS, Etzion S, Tessone A, et al. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation*. 2003;108(7):863-868.
193. Halkos ME, Zhao ZQ, Kerendi F, Wang NP, Jiang R, Schmarkey LS, et al. Intravenous infusion of mesenchymal stem cells enhances regional perfusion and improves ventricular function in a porcine model of myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*. 2008;103(6):525-536.
194. Wolf D, Reinhard A, Seckinger A, Katus HA, Kuecherer H, Hansen A. Dose-dependent effects of intravenous allogeneic mesenchymal stem cells in the infarcted porcine heart. *Stem Cells Dev*. 2009;18(2):321-329.



BRAZILIAN JOURNAL
OF MEDICAL AND BIOLOGICAL RESEARCH

www.bjournal.com.br

ISSN 0100-879X

Volume 43 (04) 325-408 April 2010

BIOMEDICAL SCIENCES
AND
CLINICAL INVESTIGATION

Braz J Med Biol Res, March 2010, Volume 43(4) 377-389

Cardiac gene expression and systemic cytokine profile are complementary in a murine model of post-ischemic heart failure

S. Lachtermacher, B.L.B. Esporcatte, F. Montalvão, P.C. Costa, D.C. Rodrigues, L. Belem, A. Rabischoffsky, H.C.C. Faria Neto, R. Vasconcellos, S. Iacobas, D.A. Iacobas, H.F.R. Dohmann, D.C. Spray, R.C.S. Goldenberg and A.C. Campos-de-Carvalho

The Brazilian Journal of Medical and Biological Research is partially financed by



Ministério
da Ciência e Tecnologia



Ministério
da Educação



Institutional Sponsors



GE Healthcare

Cardiac gene expression and systemic cytokine profile are complementary in a murine model of post-ischemic heart failure

S. Lachtermacher^{1*}, B.L.B. Esporcatte^{1*}, F. Montalvão¹, P.C. Costa¹,
D.C. Rodrigues¹, L. Belem², A. Rabischoffsky², H.C.C. Faria Neto³,
R. Vasconcelos⁴, S. Iacobas⁵, D.A. Iacobas⁵, H.F.R. Dohmann²,
D.C. Spray⁵, R.C.S. Goldenberg¹ and A.C. Campos-de-Carvalho^{1,5}

¹Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

²PROCEP, Centro de Ensino e Pesquisa, Hospital Pró-Cardíaco, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

³Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

⁴Departamento de Imunobiologia, Instituto de Imunologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil

⁵Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY, USA

Abstract

After myocardial infarction (MI), activation of the immune system and inflammatory mechanisms, among others, can lead to ventricular remodeling and heart failure (HF). The interaction between these systemic alterations and corresponding changes in the heart has not been extensively examined in the setting of chronic ischemia. The main purpose of this study was to investigate alterations in cardiac gene and systemic cytokine profile in mice with post-ischemic HF. Plasma was tested for IgM and IgG anti-heart reactive repertoire and inflammatory cytokines. Heart samples were assayed for gene expression by analyzing hybridization to AECOM 32k mouse microarrays. Ischemic HF significantly increased the levels of total serum IgM (by 5.2-fold) and total IgG (by 3.6-fold) associated with a relatively high content of anti-heart specificity. A comparable increase was observed in the levels of circulating pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β (3.8X) and TNF- α (6.0X). IFN- γ was also increased by 3.1-fold in the MI group. However, IL-4 and IL-10 were not significantly different between the MI and sham-operated groups. Chemokines such as MCP-1 and IL-8 were 1.4- and 13-fold increased, respectively, in the plasma of infarcted mice. We identified 2079 well annotated unigenes that were significantly regulated by post-ischemic HF. Complement activation and immune response were among the most up-regulated processes. Interestingly, 21 of the 101 quantified unigenes involved in the inflammatory response were significantly up-regulated and none were down-regulated. These data indicate that post-ischemic heart remodeling is accompanied by immune-mediated mechanisms that act both systemically and locally.

Key words: Experimental post-ischemic heart failure; Anti-heart antibodies; Cytokines; Immunoarray; RNAm - Microarray

Introduction

Myocardial infarction (MI) is the most frequent cause of heart failure (HF), and the leading cause of death in Western countries (1). Several factors, including inflammation, apoptosis and immune-mediated mechanisms, culminate in adaptive changes of ventricular size, shape and function known as ventricular remodeling, which leads to HF (2,3). The inflammatory reaction after acute MI (AMI) is coordinated by the activity of a series of cytokines, which is a prerequisite for healing and scar formation (4-6). IFN- γ ,

a typical cytokine involved in the Th1-type response (7), is significantly increased in patients after AMI (8). The pro-inflammatory cytokines IL-1 (9) and TNF- α (10) have also been implicated in the inflammatory response after AMI. Chemokine expression is markedly up-regulated in AMI and may play an important role in regulating leukocyte infiltration and activity and in modulating infarct angiogenesis as well as fibrous tissue deposition (11). Although the immune-inflammatory response has been well characterized after AMI

Correspondence: A.C. Campos-de-Carvalho, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, CCS, Bloco G, 21949-900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Fax: +55-21-2280-8193. E-mail: acarlos@biof.ufrj.br

*These authors contributed equally to this study.

Received April 28, 2009. Accepted February 18, 2010. Available online March 5, 2010. Published April 12, 2010.

(12), far fewer studies have examined this response in the setting of healed myocardial infarctions leading to chronic heart failure (13,14). Furthermore, there have been few publications correlating the systemic immune-inflammatory response to changes in gene expression in the chronically ischemic myocardium. Therefore, in the present study, we have characterized the immune and inflammatory profile persisting 7 weeks after the induction of ischemic heart failure in mice by determining serum levels of cytokines and of the anti-heart reactive IgM and IgG antibody repertoire and by concomitantly determining the cardiac gene activation profile by microarray analysis.

Material and Methods

This investigation conforms to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Institute of Laboratory Animal Research, Commission on Life Science, National Research Council, USA) and was approved by the Animal Committee of UFRJ.

Animals

Male and female C57BL/6 mice aged 8-10 weeks (20.5-25.5 g) were obtained from the Animal Facility of the Federal University of Rio de Janeiro. Mice were housed at controlled temperature (23°C) with a 12:12-h light-dark cycle and received standard mouse chow and water *ad libitum*.

Ischemic heart failure

Permanent myocardial infarcts were produced by ligation of the descending branch of the left coronary artery. Animals were anesthetized by an intraperitoneal injection of ketamine (40 mg/kg) and xylazine (80 mg/kg), placed in the supine position and intubated. Mice were ventilated with a volume-cycled ventilator (100 cycles/min; Harvard Apparatus, USA) with a volume sufficient to adequately expand but not overexpand the lungs. After a left anterior thoracotomy, the heart was exposed and the suture (8-0 mononylon) was passed under the artery at a position ~1 mm from the tip of the normally positioned left auricle. The chest was then closed and the skin sutured with 5-0 nylon. Sham operations were carried out by the same method but without tying the suture on the left anterior descending artery (15).

Electrocardiography

Briefly, 24 h before infarction mice were anesthetized and electrodes were implanted subcutaneously in each limb and extended to the back of the animal where a three-prong lead was exteriorized in order to obtain a ventral plane 3-lead ECG in awake animals. ECG were recorded continuously (Power Laboratory, ADInstruments, USA), and the parameters analyzed were: heart rate, ECG intervals [PR, QRS, QT, and QTc using Bazett's methods ($QTc = QT/RR^{1/2}$)], ECG wave amplitude and duration (P, QRS, T,

ST amplitude, and presence of Q wave in L1, which were recorded starting 24 h after surgery and thereafter.

Myocardial damage markers

Blood was obtained from the caudal vein before and 3 days after surgery. The distal one-half centimeter of the tail was clipped and a capillary pipette was used to collect two samples of 80 μ L each from the bleeding surface. Immediately after collection, the cut surface of the tail was cauterized with styptic powder. Serum cardiac troponin I (cTnI) was measured using the ADVIA Centaur[®] immunoassay (Bayer Diagnostics, Germany), which has a sensitivity and assay range of 0.1-50 ng/mL. Serum creatine kinase isoenzyme MB (CK-MB) was measured by chemiluminescence immunoassay using the IMMULITE System (Diagnostic Products Corporation, Germany).

Echocardiography

We used an echocardiography color-system (GE vivid 7 Megas) equipped with a 12-MHz electronic-phased-array transducer at a rate of 100 frames/s. All images were acquired at a depth setting of 6 mm using direct chest contact. Under ketamine and xylazine anesthesia, the animal's chest was shaved and the animal was maintained either in left lateral decubitus or in the supine position. Subcutaneous electrodes were taped to the mice allowing ECG for observation of heart rate. Images were obtained from the left parasternal window. Short-axis 2-dimensional views of the left ventricle (LV) were taken at the level of the papillary muscles to obtain the M-mode recordings. Anterior and posterior end-diastolic and end-systolic wall thickness, LV, left atrium and aorta internal dimensions, and shortening fraction were measured according to the leading-edge method of the American Society of Echocardiography (ASE) (16). Transmitral and aortic flow pulsed Doppler measurements were acquired in the parasternal long-axis view. Mice were followed sequentially by comparing pre- and post-procedure measurements in the same animal. Normalization for anthropometric measures did not show significant differences. All post-infarction analyses were performed at 49 days after surgery by the same echocardiographer, who was blind to group allocation (sham-operated or MI).

Evaluation of serum immunoglobulin (Ig) concentrations

Briefly, 96-well flat-bottom plates were coated overnight at 4°C with 3 μ g/mL purified goat anti-mouse IgM or IgG (Southern Biotech, USA), diluted in 50 mM phosphate buffer, pH 8.0. After blocking nonspecific binding sites with 0.5% gelatin-PBS (Sigma Chemical Company, USA), serum samples were plated in serial dilutions and incubated for 2 h at 37°C. Following extensive washing with 0.1% Tween 20 PBS, the plates were incubated with horseradish peroxidase-labeled goat anti-mouse IgM or IgG (Southern Biotech) for 1 h at 37°C. After several washes in PBS-0.1%

Tween 20, the reaction was developed with 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine substrate (Sigma). The enzymatic reaction was stopped with H₂SO₄ and the plates were read at 450 nm on a microplate spectrophotometer (SOFTmax Pro; Molecular Devices, USA). Unlabeled purified IgM and IgG (Southern Biotech) were used as standards. Serum IgM or IgG concentrations are reported as µg/mL.

Assessment of serum anti-heart Ig repertoire

Murine hearts (at least 5 hearts per group) were mechanically disrupted with a homogenizer (Polytron; Brinkmann Instruments, USA) with appropriate buffer (2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol and 62.5 mM Tris/HCl, pH 6.8) on ice, as described previously (17). The extract was sonicated at maximum power for 2 min and then boiled for 10 min. The samples were cooled to 4°C and centrifuged, the supernatant was collected and filtered (5-µm pores), and protein concentration was measured by spectrophotometry at 280/260 nm. Aliquots of heart extract were stored at -80°C and defrosted only once, prior to use. Heart extract (600 µg) was submitted to electrophoresis on 10% polyacrylamide gels under reducing conditions in a Mighty Small II SE 250 apparatus (Hoefer Scientific Instruments, USA). Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes (0.2 µm; Schleicher and Schull, Germany) using a Semi-Dry Electroblotter B (Ancos, Denmark) and blocked overnight with PBS-0.2% Tween 20. Incubation of sera from infarcted, sham-operated and control mice (50 µL 1:20 dilution in PBS-0.2% Tween 20) with the blotted membrane was performed using a 28-channel Miniblot System (Immunitics Inc., USA). After 4-h incubation at room temperature, the membranes were extensively washed and incubated with the secondary antibodies coupled to alkaline phosphatase specific for mouse IgM or IgG antibodies (Southern Biotech) for 90 min. After washings, immunoreactivities were revealed with nitroblue tetrazolium/bromo-chloro-indolyl phosphate substrate (Promega, USA) in appropriate buffer (100 mM Tris/HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) and the reaction was stopped after 3-5 min with distilled water. Immunoreactivities were quantified by optical scanning of the membranes in the reflective mode, followed by computer-based densitometry. Total protein profiles were acquired after staining of the blotted proteins with colloidal gold (Protogold), and then submitted to a second densitometric quantitation. Data analysis was done on Macintosh computers (Apple Computer Inc., USA) with the IGOR software (Wavemetrics, USA) and special macros written for the analysis of Western blots. Protein and immunoreactivity profiles were superimposed after migration distortions were corrected to allow the semi-quantitative comparison of immunoreactivity by multivariate statistics - principal component analysis (PCA) (18).

Cytokine analysis

Blood samples were collected (from at least 5 animals

per group) between 10:00 and 12:00 am 49 days after surgery as described for the myocardial damage markers. Blood was placed on ice and plasma was collected by centrifugation at 800 g for 15 min at 4°C, aliquoted and stored at -80°C until the day of analysis. A Multiplex cytokine kit [IFN-γ, TNF-α, IL-1β, IL-4, IL-6, KC (IL-8), IL-10, IL-12 (p40), MCP-1] was used and the assay performed according to manufacturer instructions (Bio-Rad, USA). Briefly, the appropriate cytokine standards and samples (50 µL) diluted in plasma dilution buffer were added to the wells of a filtered plate. The samples were incubated with 50 µL of the antibody-coupled microsphere set (2000 beads/well) at room temperature for 30 min on a plate shaker (set to 300 rpm) in the dark and filter washed three times with 100 µL wash buffer. Freshly diluted secondary/detection antibody (25 µL/well) was added to the wells and then incubated at room temperature on a plate shaker for 30 min in the dark and filter washed three times with 100-µL wash buffer. Fifty microliters of streptavidin-phycoerythrin (16 µg/mL in assay buffer) was added to the wells and incubation at room temperature continued for the first 10 min on a plate shaker. Unbound analytes were filtered through the wells using the vacuum manifold and the bound beads washed three times with 100-µL wash buffer. Following the last wash step, 125-µL assay buffer was added to each well and the plate placed for 1 min on a plate shaker set at 500 rpm, followed by reduced speed to 300 rpm for 3 min. Fifty microliters of sample was analyzed on the Bio-Plex system (Bio-Rad) according to manufacturer instructions. Data analyses of all assays were performed with the Bio-Plex Manager software (19).

Microarray analysis

We compared RNA samples extracted from whole hearts of control (N = 4) and healed infarcted (N = 4) mice by analyzing hybridization to AECOM 32k mouse microarrays (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GPL5371>) spotted with Operon version 3.0 70-mer oligonucleotides. The hybridization protocol, the slide type and the scanner settings were uniform throughout the entire experiment to minimize the technical noise. Thirty micrograms total RNA extracted in Trizol from each heart was reverse transcribed in the presence of fluorescent Alexa Fluor® 647-aha-dUTPs to obtain "red"-labeled cDNA. Eight samples, each consisting of 30 µg total RNA, of our universal reference (20) prepared from 10 adult mouse tissues (aorta, brain, heart, kidney, liver, lung, ovary/testicle, spleen, and stomach - equal amounts from males and females) were reverse transcribed in the presence of fluorescent Alexa Fluor® 555-aha-dUTPs to obtain "green"-labeled cDNA. On each microarray slide, co-hybridization of a red-labeled heart sample and a green-labeled reference sample was performed overnight at 50°C. After washing (0.1% SDS and 1% SSC) to remove the non-hybridized cDNAs, each array was scanned at 750 V (635 nm) and 670 V (532 nm) with

an Axon 4000B dual-laser scanner. Locally corrupted and saturated spots, as well as those for which the foreground median fluorescence did not exceed double the median local background fluorescence on one slide, were eliminated from the analysis of all slides, with four independent measurements (in biological replicates) thus being obtained for each gene in each condition. Microarray data were processed as indicated in previous studies (20,21). Thus, we used a normalization algorithm that alternated intra-chip and inter-chip normalization until the residual error was below 5% in subsequent steps. The spots probing the same gene were organized into redundancy groups to which we applied Bonferroni adjustment. Considering variance among the 4 control and 4 MI hearts (using the Student heteroscedastic *t*-test of equality of the means of the distributions with a Bonferroni-type adjustment), all target genes that showed statistically significant ($P < 0.05$) changes of at least 1.5-fold were considered to be differentially expressed. GenMapp (22) and MappFinder softwares (www.genmapp.org) (23) and databases were used to identify the most affected Gene Ontology categories.

Real-time RT-PCR

The level of mRNA expression of control (N = 4) and infarcted (N = 4) mouse hearts was measured by real-time RT-PCR (qRT-PCR) to validate the microarray experiment. Genes involved in the inflammatory response, *Hif1a*, *Ifnar1*, *Nos2*, *Mmp23*, and *Tlr4*, were chosen. The same total RNA preparation was used in the microarray and real-time experiments. The cDNA was prepared using a High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, USA) following manufacturer instructions. The forward and reverse primer sequences used in the qRT-PCR assay are listed below. qRT-PCR amplifications were performed in a 96-well plate of the ABI Prism 7500 Fast Sequence Detector (Applied Biosystems) in a reaction mixture of 25 μ L, which contained 1 μ L 100X diluted cDNA, 12.5 μ L 2X Power SYBR Master Mix (Applied Biosystems) and 150 nM of each primer. *Actb* (Gene bank accession number NC_000071): Forward (5'-3') CATCACTATTggCAACgAgCg, Reverse (5'-3') ATGGATGCCACAGGATCCCA. *Hif1a* (Gene bank accession number NM_010431): Forward (5'-3') TCAAgTC AgCAACgTggAAg, Reverse (5'-3') TATCgAggCTgTgTCg ACTg. *Ifnar1* (Gene bank accession number NC_000082): Forward (5'-3') TCCCCgCgATgATgAgT, Reverse (5'-3') CTggTCTgTgAgCTgTACTT. *Mmp23* (Gene bank accession number NC_00070.5): Forward (5'-3') CCAC GGTGGCATTCACTTTGATGA, Reverse (5'-3') CAATg TggCATTgAggTgCATgAg. *Nos2* (Gene bank accession number NM_010927): Forward (5'-3') TCCCTgATgACATT CCTTCTT, Reverse (5'-3') CATTggAAgTgAAgCgTTTCg. *Tlr4* (Gene bank accession number NM_021297): Forward (5'-3') CAgCTgggCTgTACAAACCTT, Reverse (5'-3') TgAg CCACATTgAgTTTCTTTA.

The amplification program was 55°C for 2 min, 95°C

for 10 min, followed by 40 cycles at 95°C for 15 s and annealing at 60°C for 1 min. The qRT-PCR melting curve data were collected to check PCR specificity. Each cDNA sample was tested in triplicate, and a corresponding non-reverse transcriptase reaction was included as a control for DNA contamination. In addition, the expression of the chosen genes was normalized to that of β -actin as an internal control.

The relative quantities of gene-specific mRNA expression were determined by the comparative CT method expressed by the formula $2^{-\Delta Ct}$ where Ct refers to the "threshold cycle" and is determined for each plate with 7500 real-time PCR System Sequence Detection Software (Applied Biosystems). ΔCt is the difference between the Ct of the target mRNA and the Ct of the endogenous control (β -actin). The fold-change in the expression of the target genes in response to the infarct was calculated as follows: mean \pm SD of $2^{-\Delta Ct}$ for each group followed by the determination of the ratio between infarcted and normal.

Statistical analysis

Animals were divided into three experimental groups: non-operated control (N = 25), sham-operated (N = 7), and infarcted mice (N = 30). All groups were analyzed together by investigators blind to which animals were sham-operated or infarcted. All data are reported as means \pm SD. Differences between the values obtained for control, sham-operated and infarcted groups were evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni post-test. Nonparametric variables were evaluated by the Kruskal-Wallis test and the Dunn post-test. Statistical significance was defined by $P < 0.05$.

Results

Myocardial infarction and assessment of heart failure

Surgical mortality was 23% (7/30) and during the first 2 weeks post-infarction 43% (10/23) of the animals died, with no further death until the end of the study at 7 weeks. No sham-operated mice (N = 7) died during the same period. Interruption of left anterior coronary perfusion led to the development of ST-segment elevation and "Q" waves after 24 h (data not shown). Infarcted mice also developed atrial and ventricular conduction alterations such as widened P, QRS complex and longer rate-corrected QT intervals (Table 1). Myocardial infarction was confirmed by CK-MB and cTnI levels (data not shown), which showed a significant increase 3 days after surgery compared to sham-operated and control groups ($P < 0.001$). cTnI levels (>0.3 ng/mm³) were increased in 95% of these animals. No sham-operated animal had a cTnI concentration above 0.3 ng/mm³ after surgery.

There was a significant impairment of global LV function measured 7 weeks after MI (Table 2). The shortening fraction decreased from 36 to 22% ($P < 0.05$) and diastolic LV diameters increased by 11%. A representative M-mode image

of the LV of an MI mouse (Figure 1B) shows anterior wall thinning associated with hypokinesia when compared with sham-operated and control groups and with the posterior intact wall. The HF group developed diastolic dysfunction confirmed by an elevated E/A ratio (4.51 ± 1.09 for HF vs 3.25 ± 0.78 for control animals). There was no significant difference in heart rate (HR) under a ketamine/xylazine anesthesia regimen (Table 2). Myocardial infarction sizes were about 20 to 30% of the LV in the chronic state (data not shown). During sacrifice the majority of infarcted mice exhibited pleural effusion consistent with HF.

Post-ischemic heart failure results in a sustained increase in serum IgM and IgG reactivities directed at heart auto-antigens

Sera of post-ischemic HF mice were analyzed for total IgM and IgG levels by quantitative ELISA. While non-manipulated or sham-operated mice presented comparable levels of both IgM (Figure 2A) and IgG (Figure 2B), a dramatic increase in both immunoglobulin isotypes was identified in the serum of infarcted mice 7 weeks later. To evaluate the impact of post-ischemic HF on the serum levels of anti-heart reactive antibodies we applied a semi-quantitative immunoblot technique. When serum IgM and IgG from individual mice were assayed for reactivity against syngeneic heart extracts we observed that the reactive patterns were similar in all animals of the same experimental group. As expected, both control and sham-operated mice exhibited comparable anti-heart serum IgM or IgG repertoires, characterized by a natural antibody repertoire weakly reactive to heart antigens. In contrast, mice submitted to experimental post-ischemic HF exhibited remarkably higher levels of anti-heart reactive IgM and IgG in their sera 7 weeks after surgical intervention (Figure 3).

Western blot densitometry profiles displayed extensive increases in the anti-heart profiles of both IgM and IgG reactivities. This alteration reflects not only the enhancement of existing natural antibody specificities, but also the emergence of new IgM and IgG anti-heart specificities in the serum of HF mice (Figure 3). When the scores obtained from densitometry profiles of anti-heart reactivity were subdivided taking into account individual reactivity for each mouse from control and HF groups and submitted to a classical multivariate statistical treatment, i.e., PCA, the differences between these groups were prominent. The first two principal components of both IgM and IgG reactivities clearly segre-

gated HF and control mice into non-overlapping areas of the two-dimensional space defined by the first two PCA factors. These principal components are related to the impressive increase of serum IgM and IgG specificities for heart antigens occurring and persisting after the establishment of HF (Figure 3B, inset). There were no significant differences between control and sham-operated groups (data not shown).

Table 1. Electrocardiographic analysis of C57BL/6 mice.

	Control (N = 25)	Sham-operated (N = 7)	Myocardial infarction (N = 10)
Heart rate (bpm)	592 ± 105	679 ± 80	532 ± 78 ⁺
Amplitude			
P wave (mV)	0.088 ± 0.033	0.118 ± 0.036	0.147 ± 0.068
Q wave (mV)	0.003 ± 0.014	0.031 ± 0.045	0.221 ± 0.276 ⁺⁺
QRS complex (mV)	0.608 ± 0.254	0.760 ± 0.392	0.357 ± 0.316 ⁺
ST segment (mV)	0.004 ± 0.003	0.084 ± 0.087	0.397 ± 0.363 ⁺⁺
T wave (mV)	0.106 ± 0.063	-0.024 ± 0.200	-0.140 ± 0.270 [*]
Duration			
P wave (ms)	11 ± 2	12 ± 1	14 ± 2 [*]
PR interval (ms)	34 ± 7	32 ± 5	37 ± 6
QRS (ms)	11 ± 2	14 ± 3	15 ± 2 [*]
QT interval (ms)	22 ± 6	39 ± 13	68 ± 49 ⁺⁺
QTc	71 ± 13	177 ± 147	201 ± 143 [*]

Data are reported as means ± SD. QTc = QT corrected interval. *P < 0.05 vs control; **P < 0.05 vs sham-operated (one-way ANOVA).

Table 2. Echocardiographic analysis of mice with myocardial infarction.

	Control (N = 25)	Sham-operated (N = 7)	Myocardial infarction (N = 10)
Heart rate (bpm)	250 ± 31	298 ± 56	249 ± 41
Flux			
Peak A (m/s)	0.14 ± 0.05	0.12 ± 0.02	0.13 ± 0.02
Peak E (m/s)	0.43 ± 0.09	0.39 ± 0.07	0.53 ± 0.13 ⁺⁺
E/A	3.25 ± 0.78	3.29 ± 0.67	4.51 ± 1.09 ⁺⁺
Mct (ms)	158 ± 43	96 ± 43	149 ± 68
Ajt (ms)	94 ± 18	90 ± 22	80 ± 7 [*]
Diameters			
Awthd (cm)	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.02	0.06 ± 0.01 ⁺⁺
Pwthd (cm)	0.09 ± 0.01	0.11 ± 0.03	0.08 ± 0.04 ⁺
LVDd (cm)	0.36 ± 0.03	0.32 ± 0.11	0.40 ± 0.05 ⁺⁺
LVDs (cm)	0.23 ± 0.03	0.21 ± 0.11	0.32 ± 0.05 ⁺⁺
FS (%)	36 ± 6	37 ± 12	22 ± 7 ⁺⁺

Data are reported as means ± SD. A = transmitral late filling velocity; E = transmitral early filling velocity; Mct = mitral closure time; Ajt = aortic ejection time; Awthd = diastolic anterior wall thickness; Pwthd = diastolic posterior wall thickness; LVDd = diastolic left ventricle (LV) dimension; LVDs = systolic LV dimension; FS% = fractional shortening. *P < 0.05 vs control; **P < 0.05 vs sham-operated (one-way ANOVA).

Effect of ischemic heart failure on circulating cytokine profile

In an independent time course experiment, we observed a slight but significant increase in plasma concentrations of all cytokines tested shortly after MI or sham surgery (data not shown), reflecting alterations induced by the surgical procedures. When the assessment was performed 7 weeks post-surgery we observed that most cytokines had returned to control levels in the sham-operated group. One exception was IL-12, which showed persistent elevation in the serum of the sham-operated mice even after 7 weeks. In contrast, post-ischemic HF mice exhibited persistently elevated levels of circulating cytokines (Figure 4). IL-1 β ($P = 0.033$) and TNF- α ($P = 0.004$), pro-inflammatory cytokines, were significantly higher in plasma 7 weeks after MI compared to control. Moreover, INF- γ , a typical Th1 response mediator, was higher ($P = 0.031$) in the MI group than in the other

groups. In contrast, the anti-inflammatory cytokines IL-4 ($P = 0.17$) and IL-10 ($P = 0.19$) did not differ significantly among groups (Figure 4B). Importantly, a highly significant increase was observed in the plasma levels of the chemokines KC (IL-8 murine ortholog) ($P = 0.008$) and MCP-1 (Ccl2; $P = 0.018$) in the infarcted group compared to control.

Differential gene expression profile in post-ischemic heart failure mouse hearts

Whole heart tissues from HF (7 weeks post-MI) or control mice were sampled to examine changes in gene expression associated with the disease. The experiment was performed according to Minimum Information about a Microarray Experiment (MIAME) standards and the results were deposited in <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=geo> as series GSE18703. A total of 14,755 distinct genes with known protein products were probed

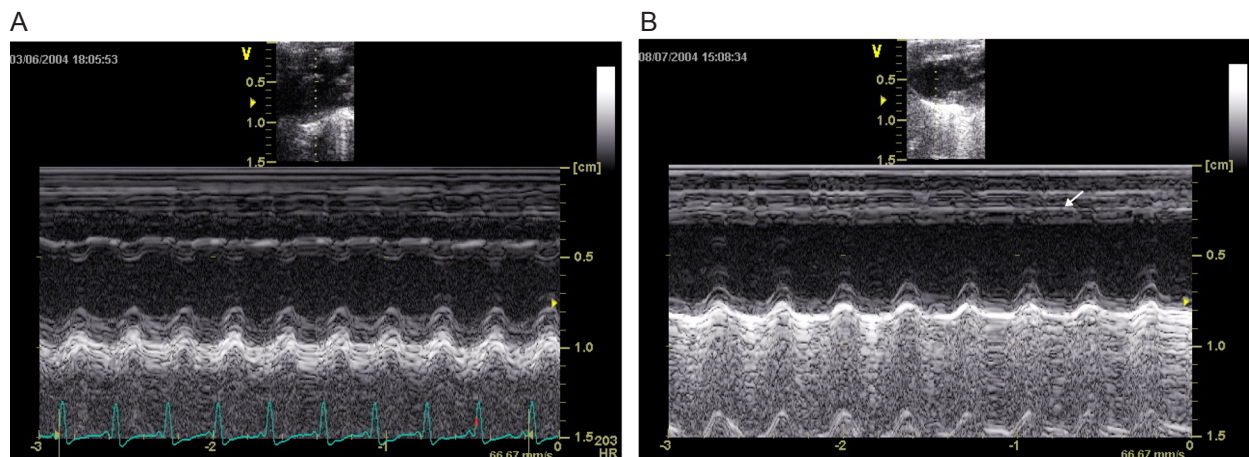


Figure 1. M-mode echocardiography. Representative parasternal short axis views 3 weeks after surgery of sham-operated (A) and infarcted (B) mice. Observe the wall thinning and decrease in anterior wall motion (arrow) in the infarcted mouse.

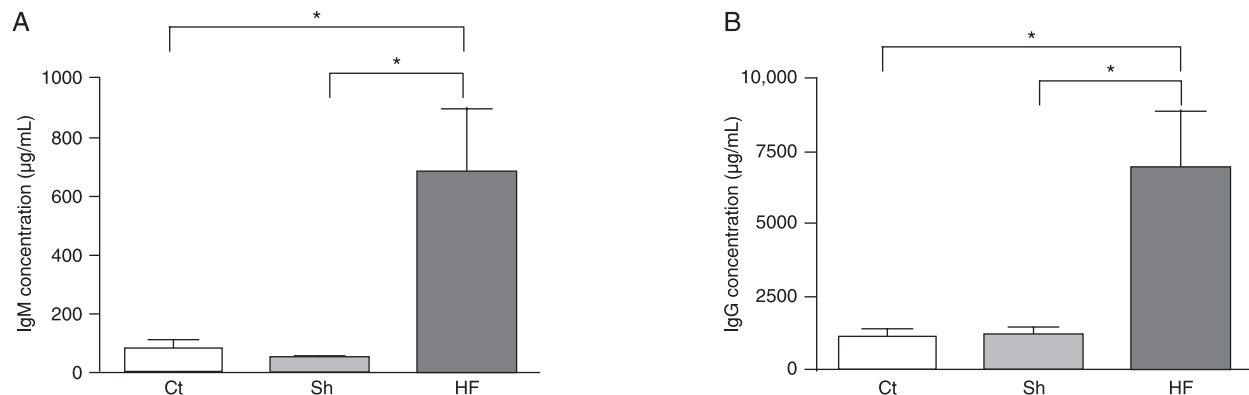


Figure 2. Increased levels of serum IgM and IgG in mice with post-ischemic heart failure. Serum IgM (A) and IgG (B) concentrations in post-ischemic heart failure (HF) or sham-operated (Sh) mice were tested by ELISA 7 weeks after surgery. Data for non-manipulated age-matched control C57BL/10 mice are also presented (Ct). Data are reported as means \pm SD for at least 5 mice per group. * $P < 0.0001$, HF mice vs Ct and Sh mice (Kruskal-Wallis test).

in this experiment. Of these, 1989 (13.48%) were significantly up-regulated and 90 (0.61%) were down-regulated in post-ischemic HF hearts. Using the GenMapp software to categorize Gene Ontology terms, we examined whether certain cellular pathways encoded by altered genes were prominently affected in the infarcted myocardium. Down-regulated genes predominantly represented G-protein signaling, cell communication, respiratory chain complex IV, regulation of secretion, z disc, sarcomere and sarcoplasmic reticulum, gluconeogenesis, and voltage gated chloride channel gene products. Up-regulated genes predominantly encoded molecules involved in complement activation, immune response, protein degradation (cysteine-type

and ubiquitin protease as well as aminopeptidase activity, modification-dependent protein catabolism), tumor necrosis factor binding, Ca^{2+} transport, β -catenin binding, cytoskeleton organization, and biogenesis gene products. Known genes were sorted on the basis of their functions such as immune and inflammatory response, apoptosis, cell proliferation and differentiation. We validated by real-time PCR five of the genes that were found by the microarray analysis to be either up- (*Hif1a*, *Ifnar1*, *Mmp23*, and *Tlr4*) or not regulated (*Nos2*). These results, which quantitatively agreed with those of the microarray analysis, are illustrated in Figure 5.

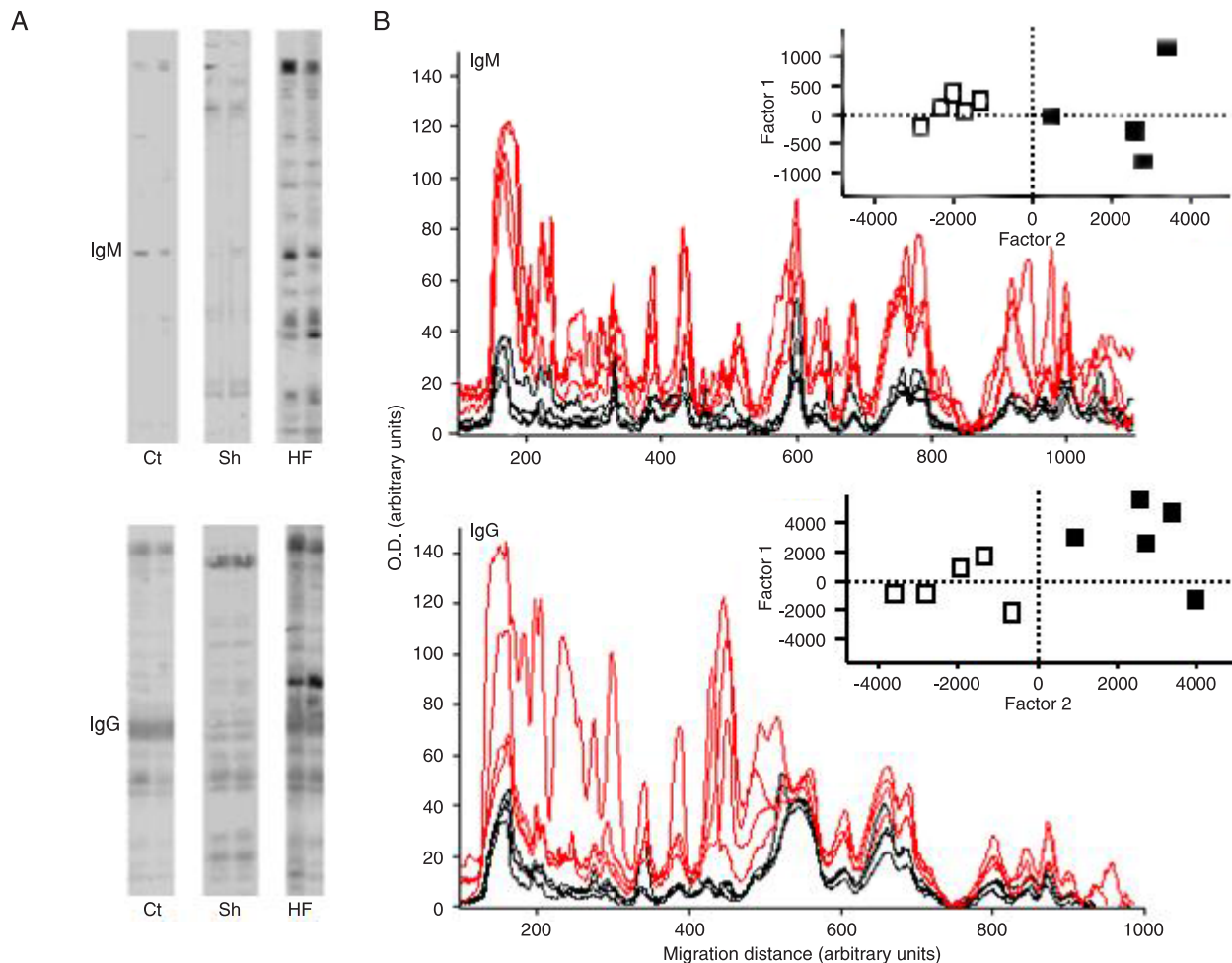


Figure 3. Increased anti-heart antibodies in mice with post-ischemic heart failure. **A**, Semi-quantitative immunoblot of IgM and IgG reactivity to autologous heart extract was scored for individual control (Ct), sham-operated (Sh) and heart failure (HF) mice 7 weeks after surgery. **B**, Densitometric profiles of serum IgM and IgG immunoreactivities of individual control (black lines) and HF (red lines) mice to heart extracts are shown. Reactivity intensities (absorbance) and migration distances are reported as arbitrary units. The values of the individual IgM or IgG immunoreactivity intensity (peak value) were submitted to principal component analysis. Scores of the resulting first two principal components of the individual Ct and HF mice are shown in two-dimensional plots in the insets: control (open squares) and heart failure mice (black squares). Data are reported as means \pm SD of at least 5 mice per group. $P < 0.05$, HF mice vs control mice (Kruskal-Wallis test).

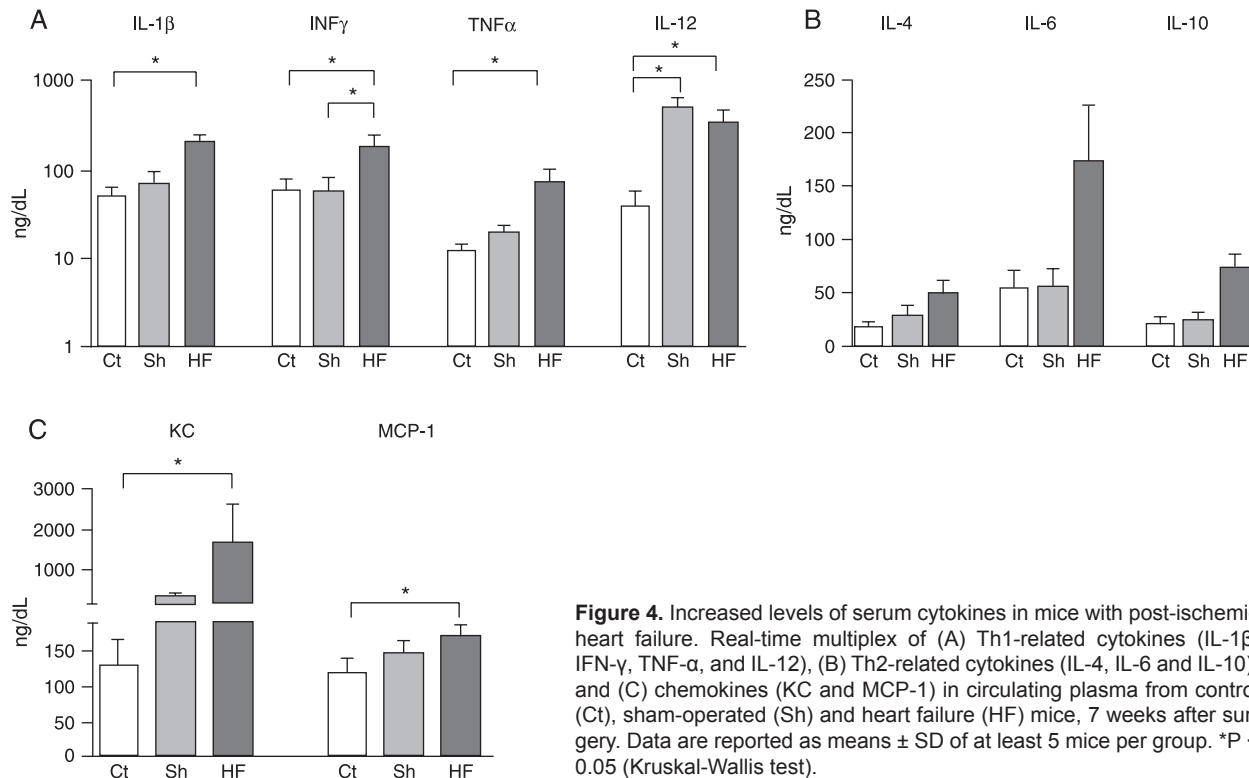


Figure 4. Increased levels of serum cytokines in mice with post-ischemic heart failure. Real-time multiplex of (A) Th1-related cytokines (IL-1 β , INF- γ , TNF- α , and IL-12), (B) Th2-related cytokines (IL-4, IL-6 and IL-10), and (C) chemokines (KC and MCP-1) in circulating plasma from control (Ct), sham-operated (Sh) and heart failure (HF) mice, 7 weeks after surgery. Data are reported as means \pm SD of at least 5 mice per group. *P < 0.05 (Kruskal-Wallis test).

Gene expression patterns indicative of an immune inflammatory response

A specific objective of this study was to identify late changes in myocardial transcription of immune-mediated inflammatory response genes after the establishment of post-ischemic HF. Of the 184 quantified genes known to be related to the inflammatory/immune/defense response (see Table 3 and Supplementary Tables 1A and 1B for all quantified genes in this category), we found that 38 (20.7%; Table 3) were significantly (>1.5-fold, P < 0.05) up-regulated after chronic MI. In addition, 37 other genes had a change exceeding 1.5-fold but increases were not significant (P > 0.05; see Supplementary Table 1A), so that 41% of all sampled genes related to the inflammatory/immune/defense response showed >1.5-fold up-regulation. Among the significantly up-regulated genes there were 3 chemokines (Ccl8, Ccl9, and Cxcl14) and a chemokine-like receptor, 3 interferon receptors (Ifnar1, Ifngr1, Ifngr2), 6 interferon activated genes (Ifi204, Ifi205, Isg20, Icsbp1, Ifih1, Ifi1), 2 interleukins (Il13, Il1f9), 4 interleukin receptors (Il1r1, Il13ra1, Il2rg, Il22ra1), 4 interleukin-1 receptor-associated kinases (Irak1, Irak2, Irak3, Irak4), and 7 tumor necrosis factor receptors (Tnfrsf1a, Tnfrsf1b, Tnfrsf10b, Tnfrsf12a, Tnfrsf19l, Tnfrsf22, Tnfrsf25). As expected, no inflammation-related gene was found to be significantly down-regulated, although the change in the expression of 5 (i.e., <3%) of them (Cklfsf2a, Cxcl12, Il17e, Il17f, Tnfsf15) exceeded 1.5-

fold. The fact that several cytokine and chemokine genes were transcriptionally elevated indicates pro-inflammatory properties within chronically injured myocardial tissue.

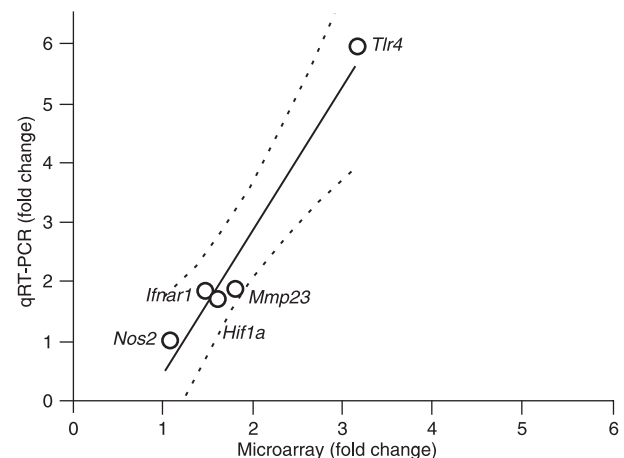


Figure 5. Real-time PCR validation of changes in the expression of five genes that were found to be altered in microarray analysis (*Hif1a*, *Ifnar1*, *Mmp23*, *Nos2*, and *Tlr4*). Fold changes for each gene indicate that expression changes determined by each method are positively correlated for these sampled genes. Linear regression curve with dotted line as 95% confidence interval (Pearson R = 0.968, P = 0.0066).

Table 3. Significant regulation of genes involved in the inflammatory/immune defense response of infarcted mice.

Name	Symbol	X	P
Chemokine (c-c motif) ligand 8	Ccl8	9.70	0.024
Chemokine (c-c motif) ligand 9	Ccl9	2.31	0.040
Chemokine (c-x-c motif) ligand 14	Cxcl14	2.31	0.027
Chemokine-like receptor 1	Cmklr1	1.82	0.004
Complement component 3	C3	2.68	0.015
Gamma-glutamyltransferase-like activity 1	Ggta1	2.16	0.026
Immunity-related gtpase family, m	Irgm	1.81	0.009
Interferon (alpha and beta) receptor 1	Ifnar1	1.51	0.016
Interferon activated gene 204	Ifi204	3.21	0.000
Interferon activated gene 205	Ifi205	5.06	0.001
Interferon consensus sequence binding protein 1	Icsbp1	1.55	0.025
Interferon gamma receptor 1	Ifngr1	2.02	0.013
Interferon gamma receptor 2	Ifngr2	2.01	0.015
Interferon induced with helicase c domain 1	Ifih1	1.58	0.006
Interferon-induced protein 35	Ifi35	1.54	0.039
Interferon-stimulated protein	Isg20	1.58	0.012
Interleukin 1 family, member 9	Il1f9	1.69	0.018
Interleukin 1 receptor, type 1	Il1r1	2.53	0.024
Interleukin 13	Il13	2.11	0.017
Interleukin 13 receptor, alpha 1	Il13ra1	1.93	0.005
Interleukin 2 receptor, gamma chain	Il2rg	1.91	0.047
Interleukin 22 receptor, alpha 1	Il22ra1	2.17	0.047
Interleukin 6 signal transducer	Il6st	2.71	0.018
Interleukin-1 receptor-associated kinase 1	Irak1	1.57	0.038
Interleukin-1 receptor-associated kinase 2	Irak2	3.27	0.000
Interleukin-1 receptor-associated kinase 3	Irak3	2.95	0.030
Interleukin-1 receptor-associated kinase 4	Irak4	1.61	0.015
Nuclear factor of activated t-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 4	Nfatc4	1.94	0.015
Toll interacting protein	Tollip	1.50	0.048
Toll-like receptor 2	Tlr2	1.65	0.005
Toll-like receptor 4	Tlr4	3.15	0.001
Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	Tnfrsf10b	1.68	0.043
Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a	Tnfrsf12a	2.37	0.001
Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 19-like	Tnfrsf19l	1.61	0.010
Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a	Tnfrsf1a	1.52	0.008
Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1b	Tnfrsf1b	1.92	0.006
Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 22	Tnfrsf22	1.80	0.039
Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25	Tnfrsf25	1.80	0.025

X = fold difference (negative for down-regulation). The Student heteroscedastic *t*-test was used for the comparison of heart failure with control.

The majority of receptor genes regulated after chronic MI were related to TNF- α , which has a critical role in diverse cellular events, including cell proliferation, differentiation and apoptosis. In agreement with systemic measurements of protein levels, we did not observe transcriptional regulation of expression of IL-4, IL-6 or IL-10 or their receptors in cardiac tissue 7 weeks after MI. In contrast, other in-

terleukin and interleukin receptors and Toll-like receptors were up-regulated in the post-ischemic healed heart tissue. We also identified a significant up-regulation of IgG Fc receptor (Fc γ R3), related to antibody-dependent cellular cytotoxicity ($x = 2.70$, $P = 0.02$). In addition, chemokine monocyte chemo-attractant protein (Ccl8), also known as monocyte chemo-attractant protein-2 (MCP-2), was highly

expressed in the post-ischemic heart tissue, achieving a 9.7-fold increase (Table 3).

Discussion

After myocardial necrosis, sequestered cardiac antigens are exposed and presented to the immune system. This triggers both cellular and humoral immune responses consisting of activation of cytotoxic T cells and production of anti-heart antibodies (5,24-26). We report here that C57BL/6 mice submitted to MI surgery presented remarkably higher levels of circulating IgMs and IgGs with increased auto-reactivity towards heart proteins, which persisted during the chronic stage of the disease. In acute MI, various proteins have been identified as targets of antibodies, including myosin (27), troponin I (16) and actin (28).

We report that a broad array of anti-heart antibody specificities are increased in the serum of post-ischemic HF mice. Our data suggest that cardiac-specific antigens may trigger the expansion and differentiation of disease-related auto-reactive B cells, which are still active even after the healing process has occurred. However, the relationship between the specificity of the secreted antibodies and the outcome of heart disease remains to be determined. Remarkably, the increased expression of FcγR3 genes in the healed heart was also identified. This suggests an active function of antibodies mediating myocyte destruction by cytotoxicity and/or apoptosis, even 7 weeks after MI.

Sensitization to heart antigens after acute MI can be correlated with the increase in plasma cytokines and chemokines. These alterations can play an active role in the initiation, progression and maintenance of inflammatory responses by promoting cell activation and influx into the injured tissue, which lead to myocardial dysfunction (29). We demonstrated that persistently increased levels of circulating cytokines/chemokines course with concomitant up-regulation of cardiac genes encoding cytokine/chemokine receptors after the establishment of post-ischemic HF. The imbalance between pro- and anti-inflammatory cytokines may determine the outcome of the healing and cardiac remodeling after acute MI. Pro-inflammatory cytokines such as IL-1 and TNF-α are increased in plasma after AMI (12) and we have now shown that these cytokines remain elevated even 7 weeks after MI when HF has developed. At first, these cytokines are determinant for the healing process and restoration of cardiac function through activation of matrix metalloproteinases, inhibition of collagen formation, and promotion of cell differentiation (30). However, these cytokines can also promote unfavorable events leading to chronic dilation, and finally lethal HF (14). The increase in serum INF-γ and its cardiac receptor gene suggests that the Th1 response plays a significant role in the evolution of HF. Anti-inflammatory cytokines such as IL-10 and TGF-β would provide the counter-activation signals restricting the excessive inflammatory response. In our study, however, cardiac gene expression of these cytokines did

not show significant differences among the experimental groups. Indeed, altered expression of either anti-inflammatory cytokines or their receptor genes could not be detected in the heart after MI.

The evaluation of cardiac gene expression profile in response to myocardial ischemic dysfunction highlighted the activation of damage-repair and remodeling processes, as reflected by overexpression of several heat shock protein and Toll-like receptor-related genes. In addition, our analysis revealed an increase of pro-apoptotic signaling-related genes in the healed infarcted heart in agreement with published data (31). Thus, the response to chronic ischemic insult is associated with altered repair and remodeling processes, metabolic reprogramming and enhanced apoptosis, as previously observed by others in acute MI (32).

Furthermore, we showed that immune/inflammatory process-related gene receptors are up-regulated in the chronic infarction model, emphasizing that remodeling leading to HF is accompanied by alterations in immune-mediated processes. The importance of immune-mediated inflammation in heart disease has been demonstrated in cardiotropic viral infections, immunization with cardiac antigens or exposure to other pathogens. Under these circumstances, cardiomyocyte injury occurs leading to cardiomyopathy, with the concomitant development of cardiac antibodies and cytotoxic T cell mediators (33-36), which are independent predictors of fatal cardiac events (37). In the present study, we demonstrated that in post-ischemic heart failure changes in the expression of cardiac genes occur along with robust and persistent cytokine and antibody systemic responses.

Although the observed alterations have been associated with cardiac impairment in the setting of acute MI, our results suggest that persistence of the systemic and local pro-immune/inflammatory repertoire may be important for the development of post-ischemic heart failure. Future experiments involving knockout mice are expected to reveal a more mechanistic view of the involvement of these immune/inflammatory processes in the cardiac remodeling leading to heart failure after ischemia.

Acknowledgments

This study is part of the MD-PhD Program of the Federal University of Rio de Janeiro. The authors are grateful to Edson Rondinelli (IBCCF, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) for discussing qRT-PCR experiments, to Roberto Esporcatte (Hospital Pró-Cardíaco) for helpful comments after reading the manuscript, and to Debora Ornellas (Universidade Federal do Rio de Janeiro) and Marcia Urban Maldonado (Albert Einstein College of Medicine) for excellent technical support. Research supported by grants from FAPERJ, Instituto do Milênio de Bioengenharia Tecidual-MCT, NIH (RO1 HL73732-01), CAPES/MEC, Ministerio da Saúde/Decit and CNPq.

References

- Volpe M, Tocci G. Integrated cardiovascular risk management for the future: lessons learned from the ASCOT trial. *Aging Clin Exp Res* 2005; 17: 46-53.
- Anversa P, Li P, Zhang X, Olivetti G, Capasso JM. Ischaemic myocardial injury and ventricular remodelling. *Cardiovasc Res* 1993; 27: 145-157.
- Sutton MG, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation* 2000; 101: 2981-2988.
- Entman ML, Smith CW. Postreperfusion inflammation: a model for reaction to injury in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 1994; 28: 1301-1311.
- Frangogiannis NG, Youker KA, Rossen RD, Gwechenberger M, Lindsey MH, Mendoza LH, et al. Cytokines and the microcirculation in ischemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30: 2567-2576.
- Mehta JL, Li DY. Inflammation in ischemic heart disease: response to tissue injury or a pathogenetic villain? *Cardiovasc Res* 1999; 43: 291-299.
- Williams JG, Jurkovich GJ, Maier RV. Interferon-gamma: a key immunoregulatory lymphokine. *J Surg Res* 1993; 54: 79-93.
- Cheng X, Liao YH, Ge H, Li B, Zhang J, Yuan J, et al. TH1/TH2 functional imbalance after acute myocardial infarction: coronary arterial inflammation or myocardial inflammation. *J Clin Immunol* 2005; 25: 246-253.
- Byrne CE, Fitzgerald A, Cannon CP, Fitzgerald DJ, Shields DC. Elevated white cell count in acute coronary syndromes: relationship to variants in inflammatory and thrombotic genes. *BMC Med Genet* 2004; 5: 13.
- Torre-Amione G, Kapadia S, Benedict C, Oral H, Young JB, Mann DL. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *J Am Coll Cardiol* 1996; 27: 1201-1206.
- Frangogiannis NG, Entman ML. Chemokines in myocardial ischemia. *Trends Cardiovasc Med* 2005; 15: 163-169.
- Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2002; 53: 31-47.
- Mari D, Di Berardino F, Cugno M. Chronic heart failure and the immune system. *Clin Rev Allergy Immunol* 2002; 23: 325-340.
- Jahns R, Boivin V, Krapf T, Wallukat G, Boege F, Lohse MJ. Modulation of beta1-adrenoceptor activity by domain-specific antibodies and heart failure-associated autoantibodies. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36: 1280-1287.
- Gould KE, Taffet GE, Michael LH, Christie RM, Konkol DL, Pocius JS, et al. Heart failure and greater infarct expansion in middle-aged mice: a relevant model for postinfarction failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282: H615-H621.
- Gao XM, Dart AM, Dewar E, Jennings G, Du XJ. Serial echocardiographic assessment of left ventricular dimensions and function after myocardial infarction in mice. *Cardiovasc Res* 2000; 45: 330-338.
- Eriksson S, Halenius H, Pulkki K, Hellman J, Pettersson K. Negative interference in cardiac troponin I immunoassays by circulating troponin autoantibodies. *Clin Chem* 2005; 51: 839-847.
- Nobrega A, Stransky B, Nicolas N, Coutinho A. Regeneration of natural antibody repertoire after massive ablation of lymphoid system: robust selection mechanisms preserve antigen binding specificities. *J Immunol* 2002; 169: 2971-2978.
- Szodoray P, Alex P, Brun JG, Centola M, Jonsson R. Circulating cytokines in primary Sjogren's syndrome determined by a multiplex cytokine array system. *Scand J Immunol* 2004; 59: 592-599.
- Iacobas DA, Iacobas S, Urban-Maldonado M, Spray DC. Sensitivity of the brain transcriptome to connexin ablation. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1711: 183-196.
- Iacobas DA, Iacobas S, Li WE, Zoidl G, Dermietzel R, Spray DC. Genes controlling multiple functional pathways are transcriptionally regulated in connexin43 null mouse heart. *Physiol Genomics* 2005; 20: 211-223.
- Dahlquist KD, Salomonis N, Vranizan K, Lawlor SC, Conklin BR. GenMAPP, a new tool for viewing and analyzing microarray data on biological pathways. *Nat Genet* 2002; 31: 19-20.
- Doniger SW, Salomonis N, Dahlquist KD, Vranizan K, Lawlor SC, Conklin BR. MAPPFinder: using Gene Ontology and GenMAPP to create a global gene-expression profile from microarray data. *Genome Biol* 2003; 4: R7.
- Lange LG, Schreiner GF. Immune mechanisms of cardiac disease. *N Engl J Med* 1994; 330: 1129-1135.
- Smith SC, Allen PM. The role of T cells in myosin-induced autoimmune myocarditis. *Clin Immunol Immunopathol* 1993; 68: 100-106.
- Varda-Bloom N, Leor J, Ohad DG, Hasin Y, Amar M, Fixler R, et al. Cytotoxic T lymphocytes are activated following myocardial infarction and can recognize and kill healthy myocytes *in vitro*. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32: 2141-2149.
- Matache C, Stefanescu M, Ivanov D, Szegli G, Popescu P, Filip Z. Presence and significance of some antibodies/autoantibodies in patients with acute myocardial infarction and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Roum Arch Microbiol Immunol* 1992; 51: 197-203.
- Melguizo C, Prados J, Velez C, Aranega AE, Marchal JA, Aranega A. Clinical significance of antiheart antibodies after myocardial infarction. *Jpn Heart J* 1997; 38: 779-786.
- Hosenpud JD, Campbell SM, Mendelson DJ. Interleukin-1-induced myocardial depression in an isolated beating heart preparation. *J Heart Transplant* 1989; 8: 460-464.
- Siwik DA, Chang DL, Colucci WS. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts *in vitro*. *Circ Res* 2000; 86: 1259-1265.
- Lyn D, Liu X, Bennett NA, Emmett NL. Gene expression profile in mouse myocardium after ischemia. *Physiol Genomics* 2000; 2: 93-100.
- Nanni L, Romualdi C, Maseri A, Lanfranchi G. Differential gene expression profiling in genetic and multifactorial cardiovascular diseases. *J Mol Cell Cardiol* 2006; 41: 934-948.
- Alvarez FL, Neu N, Rose NR, Craig SW, Beisel KW. Heart-specific autoantibodies induced by Coxsackievirus B3: identification of heart autoantigens. *Clin Immunol Immunopathol* 1987; 43: 129-139.
- Matsui S, Fu ML, Katsuda S, Hayase M, Yamaguchi N, Teraoka K, et al. Peptides derived from cardiovascular G-protein-coupled receptors induce morphological cardiomyopathic changes in immunized rabbits. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 641-655.

35. Matsumori A, Kawai C. An experimental model for congestive heart failure after encephalomyocarditis virus myocarditis in mice. *Circulation* 1982; 65: 1230-1235.
36. Neu N, Rose NR, Beisel KW, Herskowitz A, Gurri-Glass G, Craig SW. Cardiac myosin induces myocarditis in genetically predisposed mice. *J Immunol* 1987; 139: 3630-3636.
37. Rupprecht HJ, Blankenberg S, Bickel C, Rippin G, Hafner G, Prellwitz W, et al. Impact of viral and bacterial infectious burden on long-term prognosis in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001; 104: 25-31.

Supplementary Table 1A. Genes involved in the inflammatory/immune defense response of mice whose absolute difference exceeds 1.5-fold but with $P > 0.05$.

Name	Symbol	X	P
CD276 antigen (Cd276)	Cd276	1.58	0.053
Chemokine (C-C motif) ligand 17	Ccl17	1.67	0.061
Chemokine (C-C motif) ligand 5	Ccl5	1.63	0.172
Chemokine (C-C motif) ligand 6	Ccl6	3.29	0.085
Chemokine (C-C motif) receptor 2	Ccr2	1.81	0.100
Chemokine (C-C motif) receptor-like 1	Ccr11	2.28	0.134
Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	Cx3cl1	1.67	0.133
Chemokine (C-X-C motif) ligand 12, transcript variant 1	Cxcl12	-1.93	0.196
Chemokine (C-X-C motif) ligand 16	Cxcl16	1.69	0.139
Chemokine (C-X-C motif) ligand 7	Cxcl7	3.31	0.144
Chemokine-like factor superfamily 2A	Cklfsf2a	-1.72	0.238
Cytokine receptor-like factor 1	Crif1	1.77	0.135
Duffy blood group	Dfy	2.16	0.062
Fas (TNF receptor superfamily member)	Fas	2.13	0.056
Interferon gamma inducible protein 47	lfi47	1.53	0.179
Interferon induced 203 protein	lfi203	1.92	0.096
Interferon induced transmembrane protein 1	lfitm1	1.77	0.146
Interferon regulatory factor 1	lrf1	1.54	0.128
Interferon-related developmental regulator 1	lfrd1	1.83	0.106
Interleukin 1 beta	Il1b	2.07	0.127
Interleukin 1 receptor accessory protein, transcript variant 1	Il1rap	1.97	0.067
Interleukin 10 receptor, alpha	Il10ra	1.64	0.083
Interleukin 15 receptor, alpha chain, transcript variant 1	Il15ra	1.73	0.102
Interleukin 17 receptor	Il17r	1.99	0.059
Interleukin 17 receptor B	Il17rb	2.01	0.064
Interleukin 17 receptor E	Il17re	3.53	0.224
Interleukin 17E	Il17e	-1.85	0.354
Interleukin 17F	Il17f	-1.50	0.428
Interleukin 18 receptor 1	Il18r1	2.31	0.097
Interleukin 2 receptor, alpha chain	Il2ra	1.82	0.134
Interleukin 31	Il31	1.58	0.179
Interleukin 4 receptor, alpha, transcript variant 2	Il4ra	2.15	0.066
Lymphocyte antigen 86	Ly86	1.56	0.092
Peroxisome proliferator activated receptor gamma	Pparg	2.06	0.143
Replication initiator 1	Repin1	1.72	0.095
Toll-like receptor 3	Tlr3	1.79	0.052
Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13	Tnfsf13	1.94	0.074
Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 15	Tnfsf15	-1.56	0.348
Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 23	Tnfrsf23	1.57	0.137
Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2	Tnfaip2	1.60	0.052
Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8-like 2	Tnfaip8l2	1.86	0.140
Uveal autoantigen with coiled-coil domains and ankyrin repeats	Uaca	1.58	0.074

X = fold difference (negative values indicate down-regulation of the transcript). The Student heteroscedastic *t*-test was used for the comparison of myocardial infarction with control.

Supplementary Table 1B. Non-regulated genes involved in the inflammatory/immune defense response of mice.

Name	Symbol	X	P	Name	Symbol	X	P
Allograft inflammatory factor 1	Aif1	1.36	0.152	Interferon, alpha-inducible protein	G1p2	-1.17	0.518
Arachidonate 5-lipoxygenase	Alox5	1.28	0.494	Interferon, alpha-inducible protein 27	lfi27	-1.07	0.750
Attractin	Atrn	-1.11	0.475	Interferon-activatable protein 203	N/A	1.08	0.715
CD180antigen	Cd180	1.18	0.252	Interferon-induced protein 44	lfi44	-1.21	0.431
Chemokine ligand 12	Ccl12	-1.07	0.803	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	lfit1	1.04	0.868
Chemokine ligand 2	Ccl2	1.03	0.882	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	lfit2	1.28	0.332
Chemokine ligand 22	Ccl22	-1.13	0.715	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	lfit3	-1.02	0.862
Chemokine ligand 24	Ccl24	1.09	0.678	Interferon-lambda2	lfnl2	-1.46	0.047
Chemokine ligand 25	Ccl25	1.25	0.126	Interferon-related developmental regulator 2	lfrd2	1.21	0.312
Chemokine ligand 3	Ccl3	1.03	0.959	Interleukin 1 receptor-like 1, transcript variant 1	l1r1	1.30	0.329
Chemokine receptor 5	Ccr5	1.31	0.163	Interleukin 10	l10	1.18	0.720
Chemokine receptor-like 2	Ccr12	1.10	0.639	Interleukin 10 receptor, beta	l10rb	1.34	0.211
Chemokine ligand 1	Cxcl1	1.42	0.282	Interleukin 12b	l12b	1.24	0.507
Chemokine ligand 4	Cxcl4	1.30	0.252	Interleukin 15	l15	1.23	0.239
Chemokine ligand 9	Cxcl9	1.00	0.990	Interleukin 16	l16	1.49	0.048
Chemokine receptor 4	Cxcr4	1.49	0.079	Interleukin 17	l17	1.14	0.720
Chemokine receptor 6	Cxcr6	-1.42	0.407	Interleukin 17 receptor c	l17rc	1.50	0.015
Chemokine binding protein 2	Ccbp2	1.29	0.272	Interleukin 17 receptor d	l17rd	1.13	0.704
Chemokine-like factor 5, complete cds	CKLF5	1.02	0.915	Interleukin 17d	l17d	1.02	0.851
Chemokine-like factor superfamily 2B	Ck1fsf2b	1.31	0.170	Interleukin 18	l18	1.46	0.124
Chemokine-like factor superfamily 3	Ck1fsf3	1.31	0.066	Interleukin 18 binding protein	l18bp	1.36	0.171
Chemokine-like factor superfamily 4	Ck1fsf4	1.22	0.292	Interleukin 21	N/A	1.28	0.391
Chemokine-like factor superfamily 5	Ck1fsf5	-1.28	0.577	Interleukin 21 receptor	l21r	1.20	0.549
Chemokine-like factor superfamily 6	Ck1fsf6	1.49	0.072	Interleukin 4 induced 1	l4i1	-1.45	0.217
Chemokine-like factor superfamily 7	Ck1fsf7	1.19	0.018	Interleukin 6 receptor, alpha	l6ra	1.46	0.220
Chemokine-like factor superfamily 8	Ck1fsf8	-1.01	0.924	Interleukin 7	l7	1.29	0.174
Chemokine-like factor, transcript variant 1	Cklf	1.22	0.305	Interleukin 7 receptor	l7r	-1.50	0.724
Chitinase 3-like 4	Chi3l4	1.06	0.808	Interleukin enhancer binding factor 3	l3	1.36	0.134
Cytokine induced apoptosis inhibitor 1	Ciapin1	1.25	0.231	Interleukin-1 receptor associated kinase 1 splice form 1	lra1	1.37	0.055
Cytokine inducible SH2-containing protein	Cish	-1.02	0.921	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1 binding protein 1	lra1bp1	1.06	0.830
Cytokine-like 1	Cyt1	1.37	0.039	Myeloid differentiation primary response gene 88	lmyd88	-1.01	0.916
Cytokine receptor-like factor 3	Crif3	1.21	0.521	Pyd and card domain containing	lpycard	-1.04	0.806
Endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 3	Edg3	1.49	0.175	Regenerating islet-derived 3 gamma	lreg3g	1.33	0.299
Hemolytic complement	Hc	1.14	0.558	Signal transducer and activator of transcription 5b	lstat5b	1.21	0.385
Interferon receptor 2	lfnar2	1.20	0.347	Tachykinin 1	ltac1	1.08	0.839
Interferon-activated gene 203	lfi203	1.17	0.195	Toll-like receptor 1	ltlr1	-1.31	0.316
Interferon alpha responsive gene	lfrg15	1.25	0.487	Toll-like receptor 9	ltlr9	1.32	0.096
Interferon-dependent positive acting transcription factor 3 gamma	lsgf3g	-1.22	0.821	Transforming growth factor, beta 1	ltgfb1	1.35	0.062
Interferon gamma-induced gtpase	lgtp	1.20	0.292	Tumor necrosis factor superfamily, member 12	ltnfsf12	1.43	0.099
Interferon gamma-inducible protein 30	lfi30	1.18	0.517	Tumor necrosis factor superfamily, member 13b	ltnfsf13b	1.32	0.385
Interferon-induced transmembrane protein 2	lfitm2	1.29	0.051	Tumor necrosis factor superfamily, member 9	ltnfsf9	1.38	0.353
Interferon-induced transmembrane protein 3	lfitm3	-1.12	0.301	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 19	ltnfrsf19	1.24	0.191
Interferon-inducible gtpase 2	liip2	1.32	0.123	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21	ltnfrsf21	1.29	0.392
Interferon-inducible gtpase family member 5	liip5	-1.02	0.936	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4	ltnfrsf4	1.02	0.914
Interferon regulatory factor 2	lrf2	1.31	0.219	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 5	ltnfrsf5	1.28	0.035
Interferon regulatory factor 2 binding protein 1	lrf2bp1	1.01	0.956	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9	ltnfrsf9	-1.11	0.724
Interferon regulatory factor 2 binding protein 2	lrf2bp2	1.12	0.682	Tumor necrosis factor superfamily, member 5-induced protein 1	ltnfsf5ip1	1.26	0.155
Interferon regulatory factor 5	lrf5	1.35	0.194	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 1	ltnfai1	1.31	0.037
Interferon regulatory factor 6, transcript variant 1	lrf6	-1.14	0.732	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	ltnfai3	1.43	0.152
Interferon regulatory factor 7	lrf7	-1.03	0.875	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8	ltnfai8	1.19	0.197
Interferon stimulated exonuclease gene 20-like 1	lsg20l1	1.22	0.414	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8-like 1	ltnfai8l1	1.19	0.409

X = fold difference (negative values indicate down-regulation of the transcript). The Student heteroscedastic *t*-test was used for the comparison of heart failure with control.

Artigo Original

Ecocardiograma de Alta Resolução e o Modelo de Infarto do Miocárdio em Camundongos*High Resolution Echocardiography and the Myocardial Infarction Model in Mice*Bruno Leonardo Barranco Esporcate¹, Nazareth Novaes Rocha^{1, 2}, Debora Bastos Mello¹, Karina Dutra Asensi¹, Stephan Lachtermacher¹, Regina Coeli dos Santos Goldenberg¹, Antonio Carlos Campos de Carvalho¹**RESUMO**

Objetivo: Avaliação do infarto do miocárdio (IM), induzido por isquemia e reperfusão em camundongos, por meio de análises ecocardiográficas, em equipamento específico para pequenos roedores. **Metodologia:** Camundongos machos e fêmeas C57BL/6 (oito semanas), pesando entre 20 e 25g, foram submetidos à indução do IM pelo protocolo isquemia e reperfusão (n=19), com um período de isquemia de 90 minutos e comparados a animais não infartados (n=10). Foram realizadas avaliações ecocardiográficas, antes do infarto e 8, 20 e 60 dias após a cirurgia com transdutor de alta resolução (30 MHz) específico para camundongos. Foram avaliados os diâmetros cavitários, fração de encurtamento pelo modo unidimensional e tempo de relaxamento isovolumétrico pelo Doppler, além da fração de ejeção calculada pelo método de Simpson, pelo modo bidimensional. **Resultados:** Já na primeira análise, após o infarto do miocárdio, é possível evidenciar a dilatação do ventrículo esquerdo, em sístole (controle 2,10±0,43 mm *versus* infartado 2,83±0,46 mm, p< 0,001) e diástole (controle 3,26±0,33 mm *versus* infartado 3,83±0,48 mm, p < 0,01) e redução da fração de ejeção pelo método de Simpson (controle 74,63±8,29 *versus* infartado 62,58±11,62, p<0,05). Além disso, foi observado redução do tempo de relaxamento isovolumétrico (controle 26,61±6,41 vs infartado 20,94±2,65, p<0,05), compatível com disfunção diastólica. **Conclusão:** O uso do equipamento de alta resolução, específico para camundongos, permitiu a observação de alterações, precocemente, ao contrário das medidas feitas em aparelhos desenvolvidos para humanos e adaptados para pequenos roedores. A qualidade da imagem reduz a margem de erro nas aferições, permitindo maior fidedignidade dos resultados.

Descritores: Ecocardiografia, Infarto do Miocárdio, Camundongos

SUMMARY

Objective: Valuation of myocardial infarction induced by ischemia and reperfusion in mice using echocardiographic analyses performed in specific equipment for small rodents. **Methods:** C57BL/6 male and female mice (8-12 weeks-old), 20 to 25g of weight, were submitted to myocardial infarction using the ischemia and reperfusion protocol (n=19), with a period of 90 minutes of ischemia and the infarcted animals were compared with non-infarcted animals (n=10). Echocardiography analyses were done before and at 8, 20, and 60 days after surgery using a high resolution transducer (30MHz, Vevo 770, Visual Sonics) specific for mice. We evaluated the following parameters: cavitary diameter, shortening fraction by M-Mode and isovolumetric relaxing time by Echo Doppler. Ejection fraction was also measured using Simpson method using the bidimensional mode. **Results:** It was possible to evidence a left ventricular dilatation in systole (control 2.10±0.43 mm vs infarcted 2.83±0.46 mm, p< 0.001), diastole (control 3.26±0.33 mm vs infarcted 3.83±0.48 mm, p < 0.01) and reduction of ejection fraction by Simpson method (control 74.63±8.29 vs infarcted 62.58±11.62, p<0.05) in the first analysis after myocardial infarction. In addition, it was observed reduction of isovolumetric relaxing time (control 26.61±6.41 vs infarcted 20.94±2.65, p<0.05), which is compatible with diastolic dysfunction. **Conclusion:** The use of specific high resolution equipment in mice allowed the observation of early alterations, unlike of the measurements done with equipments developed for humans and adapted to small rodents. The quality of the image reduces possible mistakes of the measurements, giving a more trusted result to the exam.

Descriptors: Echocardiography; Myocardial Infarction; Mice

Instituição

Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - Centro de Ciências da Saúde - Cidade Universitária - Ilha do Fundão, Rio de Janeiro -RJ

Correspondência

Antonio Carlos Campos de Carvalho
Avenida Carlos Chagas Filho nº 373 - Bloco G - 2º andar - Sl. 53
21941-900 Rio de Janeiro - RJ
Fax +552122808193
acarlos@biof.ufrj.br

Recebido em: 22/10/2009 - Aceito em: 22/10/2009

1. Médicos do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro-RJ
2. Médica da Universidade Federal Fluminense - Rio de Janeiro-RJ

Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho.

Trabalho apresentado no Congresso Brasileiro de Ecocardiografia de 2008. Rio de Janeiro-RJ

Financiamento: CAPES-MEC, FAPERJ, CNPq e NIH (RO1 HL73732-01).

Introdução

As doenças do aparelho circulatório são a maior causa de mortalidade no Brasil, segundo o banco de dados do sistema único de saúde (DATASUS), sendo a principal responsável por internações a partir da quinta década de vida. Dentre esses agravos, o infarto agudo do miocárdio (IAM) responde por, aproximadamente, 35 óbitos a cada 100.000 habitantes¹. Apesar do progresso considerável no entendimento e tratamento das cardiopatias isquêmicas, a incidência, prevalência e impacto socioeconômico continuam aumentando.

O conhecimento dos detalhes fisiopatológicos e o desenvolvimento de novas terapias, que possam reduzir a morbi-mortalidade das principais doenças que afligem a sociedade, são justificativas importantes para o uso de modelos experimentais. Inúmeras são as patologias que já foram reproduzidas em animais, entre elas, a esclerose múltipla², cirrose hepática³, glaucoma⁴, doença de Chagas⁵, infarto agudo do miocárdio⁶ e insuficiência cardíaca⁷.

A indução cirúrgica do infarto do miocárdio em roedores é um modelo com resultados reprodutíveis e precisos, quanto ao tempo e localização do evento isquêmico, e amplamente utilizado e indispensável na pesquisa cardiovascular. O desenvolvimento de camundongos transgênicos, que expressam proteínas fluorescentes ubiquamente ou sobre controle de promotores específicos⁸, ou ainda que apresentam manipulação seletiva de genes^{9,10}, tornam os camundongos, animais de escolha entre os modelos experimentais de IM.

A principal desvantagem do uso de camundongos como modelo experimental de IM é o seu tamanho¹¹⁻¹⁵, o que exige uma grande habilidade cirúrgica para a indução do infarto, especialmente, pelo protocolo de isquemia e reperfusão (IR) e equipamentos adequados para a análise da função cardíaca desses animais.

A ecocardiografia sempre foi importante ferramenta para os estudos pré-clínicos das cardiomiopatias e os aparelhos hospitalares eram, inicialmente, adaptados para o uso laboratorial^{16,17}, o que nem sempre permitia a melhor análise do desempenho cardíaco de camundongos. Recentemente, novos

ecocardiogramas, com transdutores de alta frequência e melhor resolução de imagem, foram especialmente desenvolvidos para o uso em experimentação animal¹⁸.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a função cardíaca de animais infartados pelo protocolo de IR, por meio da ecocardiografia de alta resolução.

Materiais e métodos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas Animais, do Centro de Ciências da Saúde, conforme Protocolo N° 026/2008, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho.

Animais experimentais

Camundongos machos e fêmeas C57BL/6 de oito semanas, pesando entre 20 e 25g, fornecidos pelo biotério do Programa de Bioengenharia e Biotecnologia Animal, foram utilizados para experimentos de indução do IM.

Registro eletrocardiográfico

Foram fixados dois eletrodos no tecido subcutâneo dos animais, na linha axilar posterior, três dias antes da cirurgia. Isso possibilitou a análise eletrocardiográfica da derivação convencional D1, de forma contínua, durante o procedimento cirúrgico. Foram utilizados o aparelho BIO AMP da *ADInstrument*, calibrado para a velocidade de 50 mm/s e voltagem de 20 mm = 1mV e o programa *Chart*, versão 5.0, para as análises subsequentes.

Indução do infarto do miocárdio

O animal, após pesagem, foi anestesiado, utilizando-se Cloridrato de Xilazina (Anasedan®), na dose de 20mg/kg, e Cloridrato de Quetamina (Dopalen®), na dose de 80 mg/kg, por via intraperitoneal. Um pequeno acesso foi realizado 5mm acima da fúrcula esternal. Divulsionamos as estruturas, anatômicas, de forma a visualizar-se a traqueia e a cartilagem cricótireóide, o que permitiu a sua punção com um dispositivo de cateter sobre agulha ca-

libre 24, mimetizando uma cricotireoideostomia e possibilitando o acoplamento do animal a um ventilador (*Harvard Apparatus; Holliston, MA*), previamente ajustado (ar comprimido / fluxo de 0,2ml / FR: 90 até 14irpm).

Após a instalação do suporte ventilatório, o acesso à cavidade torácica foi realizado na região paraesternal, na altura do 4º espaço intercostal esquerdo, com o auxílio de um bisturi (nº15). Divulsionamos a musculatura torácica (peitoral maior e menor), de forma a visualizar o 4º e 5º espaço intercostal à esquerda. Com auxílio de uma tesoura de ponta fina, acessamos o espaço acima daquele em que melhor observa-se o *ictus cordis*.

A ligadura foi feita a dois milímetros da aurícula esquerda, com fio 7-0 *mononylon* (prolene). O protocolo de IR é realizado mediante a instalação do ponto cirúrgico sobre um aparato de polietileno (PE10), o que permite a remoção da sutura após 90 minutos de isquemia. O animal foi desmamado do suporte ventilatório, gradualmente, mediante o retorno dos reflexos de retirada. Durante o período de isquemia, o animal permaneceu em plano anestésico, com o acesso respiratório e uma sutura provisória, feita para evitar exposição do coração. Terminado o período de isquemia, a sutura da pele foi desfeita e a cavidade torácica exposta novamente, tornando-a visual. Abaixo da ligadura, sobre o

aparato de polietileno, o miocárdio apresentou-se esbranquiçado.

Com o auxílio de uma pinça e uma lâmina de bisturi, o ponto simples foi desfeito, permitindo a reperfusão do tecido. A sutura definitiva da pele foi concluída e o animal retornou à gaiola, após o retorno dos reflexos posturais.

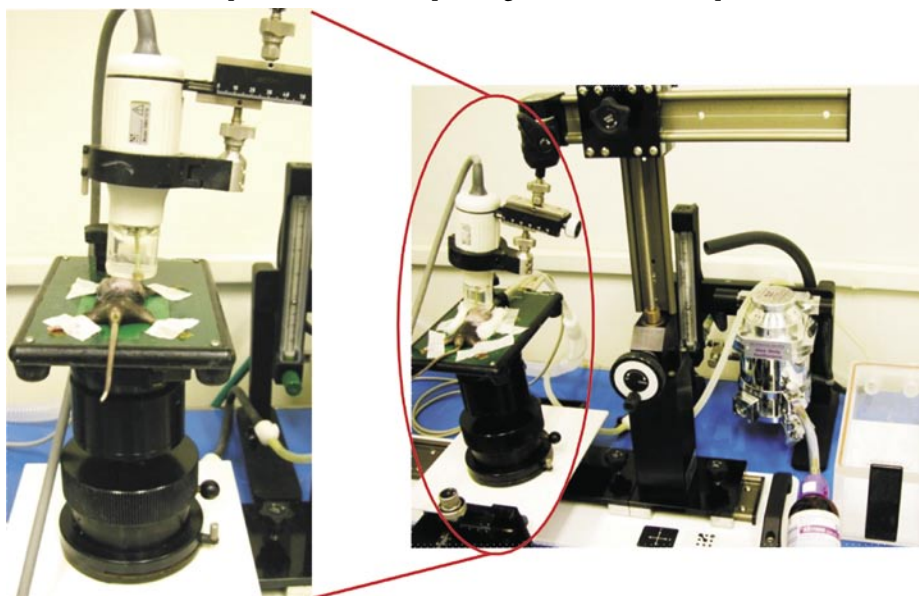
Estudo ecocardiográfico

Para a realização do ecocardiograma (ECO), os animais foram anestesiados por inalação, com isoflurano 1,5% (Cristália), tricotomizados na região torácica anterior e fixados a uma plataforma aquecida. Durante todo o protocolo, foram monitoradas a frequência cardíaca, respiratória e temperatura corporal dos camundongos. Foi utilizado o aparelho Vevo 770 (*Visual Sonics, Toronto - Canadá*), específico para roedores. Para o presente estudo, foi empregado um transdutor eletromecânico setorial de 30,0 MHz, para a obtenção de imagens fundamentais. Após a tricotomia da parede torácica anterior, uma camada de gel (Carbogel) foi colocada sobre o tórax dos animais, servindo de interface entre o transdutor e o tórax do animal (Figura 1). Todas as imagens foram adquiridas a uma profundidade de 6mm. O frame médio de aquisição foi de 70 a 100 por segundo.

A geometria cardíaca foi analisada utilizando o modo unidimensional (Modo-M), para avaliar os seguintes parâmetros: diâmetro ventricular em sístole e diástole (em mm), fração de encurtamento, tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) pelo Doppler. A fração de ejeção foi avaliada pelo método de Simpson, por meio do modo bidimensional.

O TRIV foi empregado por meio da imagem, em cinco câmaras, pegando o Doppler da mitral, juntamente com o Doppler da via de saída

Figura 1 - Equipamento específico para pequenos roedores. O aparelho possui transdutor de 30 MHz acoplado a alavanca regulável, câmara de indução de anestesia, mesa com controle de temperatura e sensores para registro de ECG e frequência cardíaca.



da aorta. O cálculo foi feito analisando-se o tempo em milissegundos, do final do Doppler aórtico até o início do Doppler do fluxo mitral.

O mesmo operador realizou os exames de todos os grupos nos mesmos dias, desconhecendo a procedência dos animais, quanto aos grupos experimentais a que pertenciam.

Análise estatística

Os resultados são mostrados sobre a forma de média \pm desvio padrão. As análises estatísticas foram feitas pelo teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni e os resultados foram considerados significativos, quando $p < 0,05$.

Figura 2 - ECG durante a cirurgia: A primeira alteração observada é o aparecimento da elevação do segmento ST (triângulo) aos 10 minutos, que denota a presença de isquemia. Aos 45 minutos, surge a onda Q (seta), patognomônica de lesão irreversível. 30 minutos após o início da reperfusão observamos apenas a onda Q patológica sem a presença de supra desnivelamento do segmento ST, já que o estímulo isquêmico foi abolido.

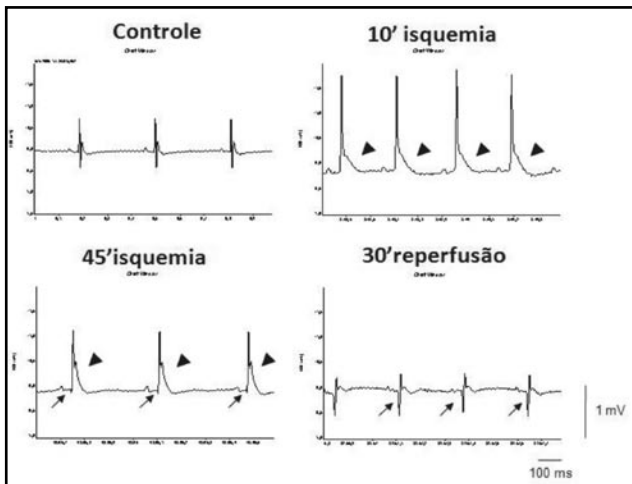
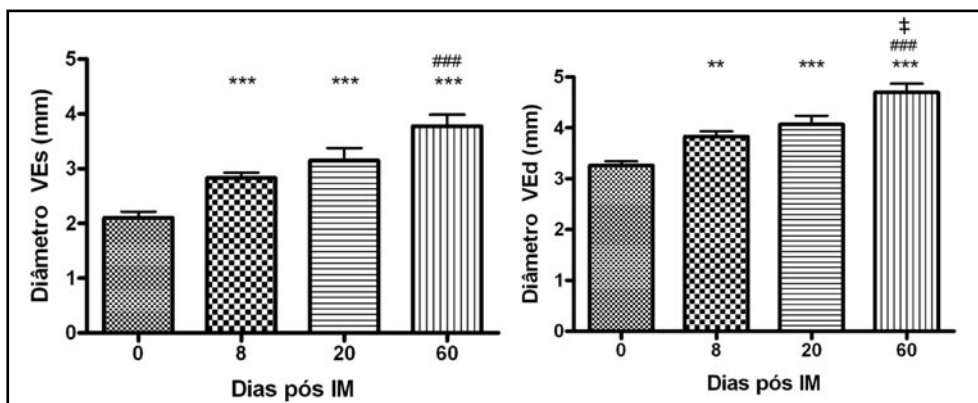


Figura 3 - Diâmetro ventricular em sístole e diástole. Detecção da dilatação da cavidade ventricular foi possível já aos oito dias após o procedimento cirúrgico. * vs 0 $p < 0,05$, *** vs 0 $p < 0,001$, ** vs 0 $p < 0,01$, * vs 0 $p < 0,05$, ### vs 8 dias $p < 0,001$, ## vs 8 dias $p < 0,01$, ‡ vs 20 dias $p < 0,05$.



Resultados

Durante a cirurgia os camundongos foram monitorados por eletrocardiograma (Figura 2). A interrupção abrupta do fluxo sanguíneo gerou o supradesnivelamento do segmento ST, já aos 10 minutos de isquemia e, aos 45 minutos, surgiu uma onda Q denotando o início da lesão tecidual irreversível. Após a reperfusão miocárdica, cessa o estímulo isquêmico, determinando, assim, o retorno do segmento ST à linha de base e, ao ECG, observa-se apenas a presença de uma onda negativa profunda (Q patológica). Animais, que foram submetidos à oclusão permanente da artéria descendente anterior ou não reperfundidos adequadamente, apresentaram, além da onda Q, a manutenção do supradesnivelamento do segmento ST.

Análise ecocardiográfica seriada

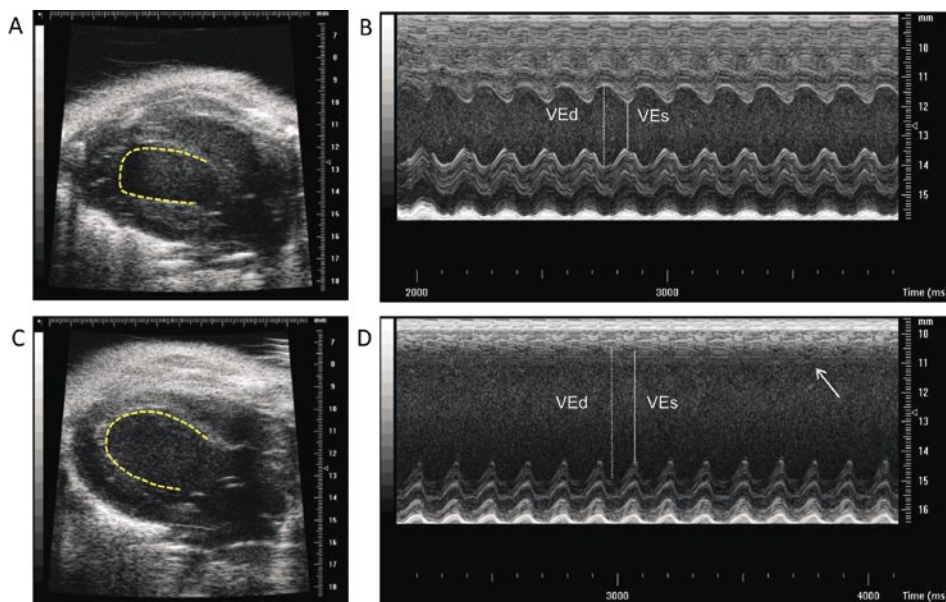
Os animais normais e falso-operados foram acompanhados ao longo do estudo e não foram observadas, em nenhum momento, alterações significativas em relação às medidas de cavidade nos dois grupos. A frequência cardíaca foi monitorada ao longo de todo o exame, permanecendo em torno de 350 a 400 batimentos por minuto.

A utilização de um equipamento específico para o uso laboratorial, em pequenos roedores, permitiu a detecção precoce das alterações estruturais induzidas pela injúria isquêmica. Ao final da primeira semana (Figura 3), já é possível notar o aumento da cavidade ventricular em sístole (controle

2,10 \pm 0,43mm versus 8 dias 2,83 \pm 0,46mm, $p < 0,001$) e, em diástole, (controle 3,26 \pm 0,33mm vs 8 dias 3,83 \pm 0,48mm, $p < 0,01$), o que não era evidenciado com o uso de aparelhos de humanos, adaptados para animais (dados não apresentados).

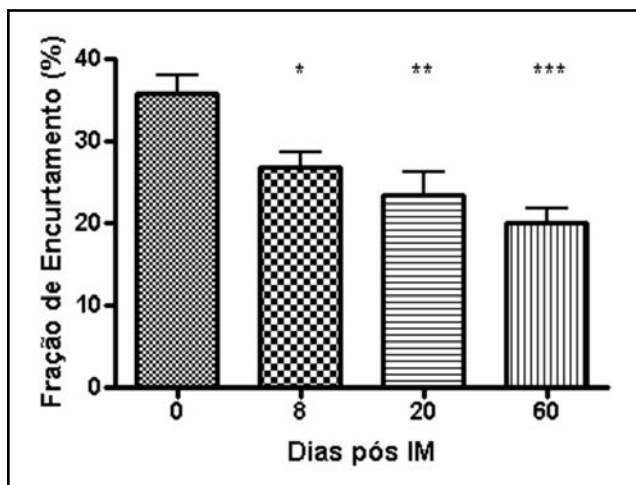
Com o aumento da cavidade ventricular, seu

Figura 4: Representativos animais normais (A e B) vs infartados (C e D). observamos a alteração da conformação ventricular, na qual os corações infartados apresentam dilatação da cavidade e conformação globosa. Além disso, nota-se acinesia da parede anterior indicada pela seta em D.



processo de remodelamento e acinesia da parede anterior (Figura 4), observou-se, ainda, a redução da fração de encurtamento (controle $35,86 \pm 8,64$ vs 8 dias $26,92 \pm 7,78$, $p < 0,05$; vs 20 dias $23,39 \pm 8,75$, $p < 0,01$; vs 60 dias $19,96 \pm 5,56$, $p < 0,001$), avaliada pelo modo bidimensional, mantendo-se assim ao longo do estudo. (Figura 5) Para avaliação da função diastólica, foi realizada a medida do tempo de relaxamento isovolumétrico. A deficiência diastólica foi constatada pela redução do TRIV (Figura 6), presente logo na primeira avaliação (controle $26,8 \text{ ms} \pm 6,25$ vs. 8 dias $21,7 \text{ ms} \pm 3,86$ $p < 0,001$). Pela

Figura 5: Fração de encurtamento. Medida feita pelo modo m na altura dos músculos papilares. *** *versus day 0* $p < 0,001$, ** *versus day 0* $p < 0,01$, * *versus day 0* $p < 0,05$.



frequência cardíaca, elevada nos camundongos, não foi possível avaliar a relação E/A do fluxo transmitral.

Devido à maior sensibilidade do aparelho, foi possível aferir a fração de ejeção pelo método de Simpson (Figura 7), pela obtenção de cortes transversais em diferentes alturas associados a um corte longitudinal. Por essa medida, é possível inferir, de forma global, a disfunção cardíaca progressiva desses animais, desde o seu valor basal de $74,63 \pm 8,29\%$ para $62,58$

Figura 6: Tempo de relaxamento isovolumétrico. Avaliação da função diastólica já alterada aos oito dias após IM. ** *versus 0* $p < 0,01$, * *versus 0* $p < 0,05$.

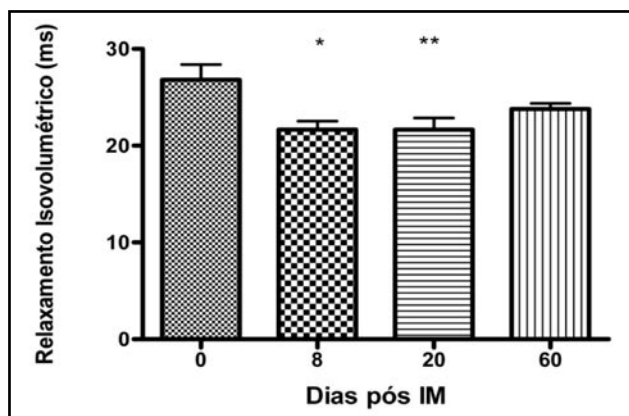
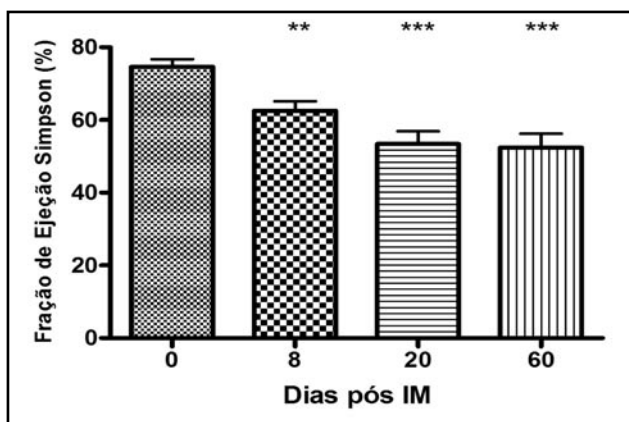


Figura 7: Fração de ejeção pelo método de Simpson. Avaliação mais fidedigna da disfunção cardíaca progressiva e permanentemente provocada pela injúria isquêmica. *** *versus 0* $p < 0,001$, ** *versus 0* $p < 0,01$.



$\pm 11,62\%$ aos oito dias, ($p < 0,01$), $53,41 \pm 10,41\%$ aos 20 dias ($p < 0,001$ vs controle) e para $52,42 \pm 10,41\%$ aos 60 dias, após o procedimento ($p < 0,001$ vs controle).

Discussão

A avaliação da função cardíaca de camundongos é limitada pelo pequeno tamanho do coração e sua frequência de batimentos elevada. Transdutores de frequência baixa, quando utilizados para adquirir imagens em campo próximo, realizam essa avaliação de maneira deficiente¹⁹, impedindo a apresentação de sensibilidade suficiente para detectar pequenas disfunções.

O uso de camundongo para a indução do infarto do miocárdio apresenta grandes vantagens, como a possibilidade de utilização de diferentes animais transgênicos, o que permite a melhor investigação dos mecanismos moleculares de lesão e remodelamento cardíaco subsequente. Porém, sua utilização demanda grande habilidade cirúrgica e a necessidade de equipamentos específicos para a avaliação cardiovascular.

Ecocardiogramas convencionais equipados com transdutores de até 15 MHz, utilizados em hospitais, foram adaptados para a avaliação da função cardíaca em camundongos²⁰. Apesar de extensamente utilizados e provendo informações importantes, em outros modelos de doenças cardíacas, tais equipamentos não apresentam sensibilidade suficiente para inferir a função cardíaca no modelo de injúria por IR.

O modelo de infarto do miocárdio, induzido por IR, provoca disfunção ventricular dependente do tempo ao qual o animal é submetido à restrição de aporte sanguíneo^{21,22}. Michael et al²³ compararam a disfunção miocárdica de diferentes períodos de isquemia à oclusão permanente da artéria descendente anterior, por meio da análise perimetria da área infartada do ventrículo esquerdo. A oclusão temporária de 30 e 60 minutos geraram lesões muito pequenas, possivelmente não detectáveis ao ecocardiograma. Entretanto, o insulto isquêmico de 120 minutos levou a uma lesão sem diferença estatística, quando comparada a animais infartados

pela oclusão permanente da artéria em questão.

Em vista disso, adotamos 90 minutos, como protocolo de isquemia, com o intuito de gerar lesões evidenciáveis ao ecocardiograma, sem provocar a mesma disfunção cardíaca que a oclusão permanente da artéria descendente anterior.

O ecocardiograma específico para camundongos foi, extremamente, útil para a caracterização do modelo de infarto do miocárdio induzido por IR. Esse modelo mimetiza mais precisamente a situação clínica, na qual o paciente diagnosticado com infarto é submetido a alguma terapia de revascularização. Apesar de extensamente utilizada, a oclusão permanente da artéria coronária descendente anterior não é um modelo indicado para teste de administração de células, moléculas ou drogas que atuem diretamente na região isquêmica.

No modelo de isquemia, durante 90 minutos seguidos de reperfusão, foi possível detectar alterações precoces provocadas pela injúria, logo na primeira semana após o procedimento. Devido à alta sensibilidade do sistema, foi também possível avaliar a fração de ejeção pelo método de Simpson. Tal avaliação permite inferir com mais segurança a função cardíaca global. Além disso, a evolução do remodelamento cardíaco pode ser acompanhada, ao longo dos dois meses de estudo.

Conclusão

O infarto do miocárdio induzido por IR gerou disfunção cardíaca progressiva, precocemente evidenciada pelo ecocardiograma de alta resolução, específico para pequenos roedores. A dilatação da cavidade ventricular, redução da FE, FS e TRIV representam critérios para a disfunção sistólica e diastólica. Tais parâmetros mostraram-se alterados já na primeira avaliação, oito dias após a indução do infarto.

Referências

1. Ministério da Saúde. Datasus. Morbidade.[Acesso em 2008 dez 10]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br>
2. Thessen HM, Gillett A, Olsson T, Jagodic M, Harris RA. Characterization of Multiple Sclerosis candidate gene expression kinetics in rat experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 2009;210:30-9.
3. Dias JV, Paredes BD, Mesquita LF, Carvalho AB, Kozłowski EO, Lessa AS, et al. An ultrasound and histomorphological analysis of experimental liver cirrhosis in rats. *Braz J Med Biol Res.* 2008;41:992-9.
4. McKinnon SJ, Schlamp CL, Nickells RW. Mouse models of retinal ganglion cell death and glaucoma. *Exp Eye Res.* 2009;88(4):816-24.
5. Rocha NN, Garcia S, Gimenez LE, Hernandez CC, Senra JF, Lima RS, et al. Characterization of cardiopulmonary function and cardiac muscarinic and adrenergic receptor density adaptation in C57BL/6 mice with chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitology.* 2006;133:729-37.
6. Michael LH, Entman ML, Hartley CJ, Youker KA, Zhu J, Hall SR, et al. Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *Am J Physiol.* 1995;269:H2147-H2154.
7. Klocke R, Tian W, Kuhlmann MT, Nikol S. Surgical animal models of heart failure related to coronary heart disease. *Cardiovasc Res.* 2007;74:29-38.
8. Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett.* 1997;407:313-9.
9. Jacob S, Laury-Kleintop L, Lanza-Jacoby S. The Select cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib reduced the extent of atherosclerosis in Apo E-/- mice. *J Surg Res.* 2008;146(1):135-42.
10. Liehn EA, Merx MW, Postea O, Becher S, Talab YD, Shagdarsuren E, et al. Ccr1 deficiency reduces inflammatory remodelling and preserves left ventricular function after myocardial infarction. *J Cell Mol Med.* 2008;12(2):496-506.
11. Gehrman J, Frantz S, Maguire CT, Vargas M, Ducharme A, Wakimoto H, et al. Electrophysiological characterization of murine myocardial ischemia and infarction. *Basic Res Cardiol.* 2001;96:237-50.
12. Gonder JC. Introduction: recent studies, new approaches, and ethical challenges in animal research. *ILAR J.* 2007;48:1-2.
13. Gonder JC, Laber K. A renewed look at laboratory rodent housing and management. *ILAR J.* 2007;48:29-36.
14. Johns TN, Olson BJ. Experimental myocardial infarction. I: a method of coronary occlusion in small animals. *Ann Surg.* 1954;140:675-82.
15. Michael LH, Ballantyne CM, Zachariah JP, Gould KE, Pocius JS, Taffet GE, et al. Myocardial infarction and remodeling in mice: effect of reperfusion. *Am J Physiol.* 1999;277:H660-H668.
16. Youn HJ, Rokosh G, Lester SJ, Simpson P, Schiller NB, Foster E. Two-dimensional echocardiography with a 15-MHz transducer is a promising alternative for in vivo measurement of left ventricular mass in mice. *J Am Soc Echocardiogr.* 1999;12:70-5.
17. Gardin JM, Siri FM, Kitsis RN, Edwards JG, Leinwand LA. Echocardiographic assessment of left ventricular mass and systolic function in mice. *Circ Res.* 1995;76:907-14.
18. Okajima K, Abe Y, Fujimoto K, Fujikura K, Girard EE, Asai T, et al. Comparative study of high-resolution microimaging with 30-MHz scanner for evaluating cardiac function in mice. *J Am Soc Echocardiogr.* 2007;20:1203-10.
19. Collins KA, Korcarz CE, Lang RM. Use of echocardiography for the phenotypic assessment of genetically altered mice. *Physiol Genomics.* 2003;13:227-39.
20. Patten RD, Aronovitz MJ, Deras-Mejia L, Pandian NG, Hanak GG, Smith JJ, et al. Ventricular remodeling in a mouse model of myocardial infarction. *Am J Physiol.* 1998;274:H1812-H1820.
21. Boyle MP, Weisman HF. Limitation of infarct expansion and ventricular remodeling by late reperfusion. Study of time course and mechanism in a rat model. *Circulation.* 1993;88:2872-83.
22. Hirayama A, Adachi T, Asada S, Mishima M, Nanto S, Kusuoka H, et al. Late reperfusion for acute myocardial infarction limits the dilatation of left ventricle without the reduction of infarct size. *Circulation.* 1993;88:2565-74.
23. Michael LH, Ballantyne CM, Zachariah JP, Gould KE, Pocius JS, Taffet GE, et al. Myocardial infarction and remodeling in mice: effect of reperfusion. *Am J Physiol.* 1999;277:H660-H668.

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](#)