ÉRIKA BRANCO

**Uso da via transpericárdica para infusão de células
mononucleares de medula óssea em suínos induzidos ao infarto
agudo do miocárdio**

**São Paulo
2007**

ÉRIKA BRANCO

**Uso da via transpericárdica para infusão de células
mononucleares de medula óssea em suínos induzidos ao infarto
agudo do miocárdio**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo, para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Maria Angelica Miglino

**São Paulo
2007**

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1912
FMVZ

Branco, Érika

Uso da via transpericárdica para infusão de células mononucleares de medula óssea em suínos induzidos ao infarto agudo do miocárdio / Érika Branco. -- São Paulo: E. Branco, 2007.
98 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2007.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Maria Angélica Miglino.

1. Via transpericárdica. 2. Infarto agudo do miocárdio. 3. Células Mononucleares de Medula Óssea. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

PARECER

Interessado: Érika Renata Branco

Assunto: Protocolo de experimentação adotado em experimento animal.

A Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, após analisar o projeto sob o número 750/2005, intitulado: "Terapia celular: infusão de células tronco mononucleares via transpericárdica em suínos (*Sus scrofa domesticus*) portadores de isquemia cardíaca", no qual foram utilizados 12 (doze) suínos, sob responsabilidade da Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, constatou que o mesmo foi realizado de acordo com os princípios de bioética, adotados por esta Comissão.

São Paulo, 17 de novembro de 2005.

ERRATA

BRANCO, E. **Uso da via transpericárdica para infusão de células mononucleares de medula óssea em suínos induzidos ao infarto agudo do miocárdio.** [Use of the transpericardic route for infusion of bone marrow mononuclear cells in acute infarct of the myocardium in induced swines]. 2007. 98 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Página	Parágrafo	Onde se lê	Leia-se
Ficha catalográfica	2	98 f.	96 f.
Resumo	1	98	96
Abstract	1	98 f.	96 f.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BRANCO, Érika

Título: Uso da Via transpericárdica para infusão de células mononucleares de medula óssea em suínos induzidos ao infarto agudo do miocárdio

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

“Onde não há igualdade, a amizade não perdura”.

(Platão)

DEDICATÓRIA

A meus pais José Carlos Branco e Elisabete Maciel Branco, irmãs Wanessa Branco e Gilda Pedroso e avós Vicente Maciel e Esmeralda Maciel por estarem sempre me orientando e me conduzindo ao fim de mais uma jornada.

DEDICATÓRIA

*A minha grande amiga Alessandra Vialôgo, por toda dedicação e paciência durante mais
essa etapa da minha vida.*

DEDICATÓRIA

*As minhas “filhas” **Lua** e **Sol**, que seguramente, e mesmo sem saberem me ajudaram da maneira mais especial possível, todas as vezes que findava um dia difícil, dando-me muito carinho e amor.*

AGRADECIMENTO

A Deus

“Mil cairão ao teu lado, e dez mil à tua direita, mas tú não serás atingido. Somente com os teus olhos contemplarás, e verás o castigo dos ímpios, porque tú, ó Senhor, és meu refúgio”.

(Salmo 91)

AGRADECIMENTO

Ao grupo de Terapia Celular em Suínos, hoje formada por grandes amigos: Rosa Cabral (Fia), Guilherme Ferreira (Mamão), Vivian Samoto (Neusa), Guilherme Buzzon (Buzolino), Walkiria Ferreira (Carrerinha), Carlos Sarmiento (Gatão) e Emerson Fioretto (Gorda), que estiveram comigo em todos os momentos, dedicando-se ao máximo e não medindo esforços para a realização de um sonho.

Muito obrigada queridos amigos!!!

AGRADECIMENTOS

À Profª. Drª. Maria Angelica Miglino, minha eterna orientadora, que acompanha meus passos à quase 2 décadas, e que nunca mediu esforços para alicerçar meu aprendizado, estendendo-me a mão, principalmente nos árduos momentos.

À Profª. Drª. Ana Flávia de Carvalho, á quem tenho o orgulho de chamar de amiga, pois participou de minha formação e mesmo á distância acompanhou meus passos.

Ao Prof. Dr. Radovan Borojevi, Profª. Drª. Christina Maeda Takiya, e Prof. Dr. Alex Balduino de Souza os quais tive o enorme prazer de conhecer, trabalhar junto e que me mostraram por diversas vezes o caminho certo á seguir.

Ao Dr. Hans Fernando Dohmann, Dr. André Luis Sousa e demais Membros do Hospital Pró Cardíaco no Rio de Janeiro, por toda dedicação dispensada no auxílio da realização deste trabalho.

Aos Professores da FMVZ/USP: Prof. Dr. Ângelo João Stopiglia (LCT), Prof. Dr. José Roberto Kfoury (LTIAM), Profª. Drª. Andréia Micke Moreno (VPS), Prof. Dr. Paulo César Maiorka (VPT) por acreditarem em nosso trabalho e nos cederem espaço em seus laboratórios.

À Profª. Drª. Mariz Vainzof e Profª. Drª. Mayana Zatz do Centro de Estudos do Genoma Humano pela atenção dedicada a mim durante a realização deste trabalho.

Aos colegas de Pós-Graduação que direta ou indiretamente ajudaram em algum momento na realização deste trabalho: Daniele dos Santos Martins, Carlos Eduardo Ambrósio, Adriana Morini, André Francioli, Cristiane Wenceslau, Ana Rita de Lima, Janaina Munuera Monteiro, Rose Viola Bosch, Lílian Jesus de Oliveira, Phelipe Favaron, Tatiana Carlesso dos Santos.

À equipe de técnicos, funcionários e professores do setor de Anatomia de Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pela ajuda nos procedimentos da Pós-Graduação.

As instituições CNPq (Projeto Células-Tronco / Processo: 552210/2005-6) e a FAPESP (Processo 05/50081-0) pelo apoio financeiro.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Prof. Dr. José Antônio Franchini Ramires, Prof. Dr. Pedro Alves Lemos Neto, Prof. Carlos A. Homem Campos, Prof. Dr. Celso Takimura do Instituto do Coração - INCOR, por terem abraçado este trabalho com tanto carinho e dedicação em tão curto espaço de tempo tornado possível à realização de um sonho.

A Leonora Loppnow, Dário Ribeiro, Anderson de O. Brisquilhari, Renato Gomes, Vicente Ribeiro, Pedro Noiri, Nelson Domingues, Henrique Vieira, membros do Biotério do Instituto do Coração - INCOR, que nos ajudaram durante todos os procedimentos executados, dispensando atenção e carinho não somente a nossa equipe como também aos animais.

RESUMO

BRANCO, E. **Uso da via transpericárdica para infusão de células mononucleares de medula óssea em suínos induzidos ao infarto agudo do miocárdio.** [Use of the transpericardic route for infusion of bone marrow mononuclear cells in acute infarct of the myocardium in induced swines]. 2007. 98 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

As doenças cardiovasculares continuam sendo a primeira causa de morte no Brasil (32%) representando a terceira maior causa de internação hospitalar. Apesar dos avanços terapêuticos das últimas décadas, estudos epidemiológicos consideram o infarto agudo do miocárdio (AMI) uma das maiores causas de morbidade e mortalidade, sendo a maioria, ligados a realização de terapias não adequadas, dos quais 50% das mortes ocorrem nas primeiras 2 horas do ocorrido e 14% morrem antes de receber atendimento médico. O objetivo deste estudo foi de avaliar a técnica de infusão transpericárdica de células mononucleares de medula óssea (CMMO) em suínos. Três suínos fêmeas, pesando 25Kg foram induzidas ao AMI, com auxílio de cateter balão colocado no 1º ramo diagonal da artéria coronária interventricular por 45 minutos, seguido por infusão de 1×10^8 CMMO marcadas com Hoechst® pela via transpericárdica. O grupo controle foi composto por 3 animais, os quais receberam infusão de 1×10^8 CMMO marcadas com Hoechst® através da mesma técnica. Os resultados revelaram distribuição homogênea das CMMO no miocárdio, concentrando-se especialmente na área infartada, enquanto que o grupo controle apresentou distribuição homogênea ao

longo do miocárdio. Nós concluímos que a técnica transpericárdica é viável para infusão de CMMO em processos de isquemia cardíaca.

Palavras-chave: Via transpericárdica. Infarto agudo do miocárdio. Células Mononucleares de Medula Óssea.

ABSTRACT

BRANCO, E. Use of the transpericardic route for infusion of bone marrow mononuclear cells in acute infarct of the myocardium in induced swines. [**Uso da via transpericárdica para infusão de células mononucleares de medula óssea em suínos induzidos ao infarto agudo do miocárdio**]. 2007. 98 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Cardiovascular illnesses continue to be the first cause of death in Brazil (32%), representing the third major reason of hospital internment. Although the therapeutics advances in the last decades, epidemiologic studies considered the acute myocardium infarct (AMI) to be one of the most causes of morbidity and mortality (30%), most of, related to the institution of non-adequate therapy, thereby 50% of deaths in the early two hours of the event and 14% dying before any medical assistance. Currently therapies include stent angioplasty, thrombolytic medication and aortic-coronary venous grafting; while in experimental area the cellular therapy has been largely investigated being the cells infusion technique investigation the most enthusiastic issue. This study aimed to evaluate the transepiaicardic infusion technique of bone marrow mononuclear cells (BMMC) in swine. Three female swine, averaging 25 kg, were induced to AMI, with the aid of a balloon catheter displaced on the first interventricular diagonal branch of the coronary artery for 45 minutes, following to the infusion of 1×10^8 BMMC stained with Hoescht[®] by the transepiaicardic technique. Sham operation was carried out in three animals (Control group), which received infusion of 1×10^8 BMMC stained with Hoescht[®] by the same technique. The results revealed an inhomogeneous

distribution of the BMMC in the myocardium, being more concentrated in the infarcted area, while the control group presented a homogeneous distribution along the myocardium. We concluded the transpericardic technique would be acceptable to the infusion of BMMC in cardiac ischemic processes.

Key word: Transpericardic route. Acute myocardium infarct. Bone marrow mononuclear cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Animais alojados em baias apropriadas, na FMVZ-USP	50
Figura 2 – Acesso à veia periférica da orelha para fluidoterapia e indução anestésica (A). Aparelho de anestesia inalatória Shoogun Evolution 2700® (Takaoka)	51
Figura 3 - Punho twist lock (A) e Ponta tipo “Double Diamond” (seta vermelha) com cânula cortante “Twin Peaks” (seta azul) (B) e seringa Luer-lock. Sistema de rosqueamento (seta verde)	52
Figura 4 - Coleta da medula óssea, por pressão negativa, com auxílio da agulha de punção de medula e seringa Luer-Lock	52
Figura 5 – Artéria femoral (seta) isolada com auxílio de fitas cardíacas (*) (A). Posicionamento da bainha (seta) no interior do vaso, para auxiliar na passagem do fio guia e cateter balão (B)	53
Figura 6 - Cateter guia, flexível, utilizado para alcançar a coronária e guiar outro cateter	54
Figura 7 - Bainha, utilizada para facilitar a entrada da guia no vaso	54
Figura 8 - Cateter balão (A), com balão localizado na extremidade (seta) (B) e Bomba insufladora utilizada para inflar o cateter balão (C)	54
Figura 9 - Fluoroscópio Philips BV Pulsera com capacidade de aquisição de 30 pulsos/segundo (A). Estação de Visão Móvel avançada (monitores) (B).	55
Figura 10 – Imagem radiográfica por fluoroscopia do ramo descendente da artéria coronária esquerda em destaque (seta) devido à infusão de contraste iodado (A) e o mesmo ramo interrompido pós colocação do cateter balão (seta) (B)	55

Figura 11 - Esquema de agulha Peridural Tuohy utilizada para perfurar o saco pericárdico.	55
Figura 12 - Perfuração da região mediana pré-umbilical com agulha epidural para infusão das células mononucleares da medula óssea.....	57
Figura 13 - Local de infusão das células mononucleares da medula óssea (espaço pericárdico - asterisco) conforme visualização pela fluoroscopia. Agulha peridural (seta vermelha) e contraste iodado (β)	57
Figura 14 - Esquema do processo de separação das células mononucleares da medula óssea	59
Figura 15 - Esquema de coleta dos 17 segmentos cardíacos e da nomenclatura recomendada para a imagem tomográfica do coração. Fonte: CERQUEIRA et al., 2002, <i>Circulation</i> , 105;539-542	61
Figura 16 – Esquema adaptado de CERQUEIRA et al., 2002 de coleta dos 17 segmentos cardíacos e da nomenclatura recomendada para a imagem tomográfica do coração de acordo com o posicionamento do coração nos animais	61
Figura 17 – Fotografia e fotomicrografia da região crânio apical do ventrículo esquerdo com área de isquemia (círculo) pós indução de infarto agudo do miocárdio Barra: 1cm (A). Fotomicrografia do coração de animal com 24 horas pós-infarto agudo do miocárdio(B). Observar área com processo inicial de remodelamento cardíaco com intenso infiltrado inflamatório mononuclear entremeado ao tecido conjuntivo (❶). Coloração: Tricromo de Masson. Escala de Barra: 20µm	69
Figura 18 - Fotomicrografia do coração de animal com 3 dias pós-infarto agudo do miocárdio. (A, B e C) Observar maior deposição de colágeno e	

grande quantidade de células inflamatórias (❶), bem como degeneração das fibras (❷). Coloração: Tricromo de Masson. Escala de Barra: (A) 10µm, (B e C) 100µm69

Figura 19 - Identificação de reação positiva para fator VIII nas paredes de vasos sanguíneos (setas) da porção crânio baso lateral (A e D); Reação positiva para marcação com Hoechst® (B e E) e Controle negativo para fator VIII (C e F). Animais com 21 dias (A-C) e 3 dias (D-F) pós terapia com infusão de células mononucleares da medula óssea pós infarto agudo do miocárdio. Barras: (A e B) 20 µm e (C – F) 10µm. Coloração: Azul de Evans.....71

Figura 20 - Identificação reação positiva para fator VIII nas paredes de vasos sanguíneos (setas) da porção crânio médio lateral (A e D); Reação positiva para marcação com Hoechst® (B e E) e Controle negativo para fator VIII (E e F). Animais com 24 horas (A-C) e 7 dias (D-F) pós terapia com infusão de células mononucleares da medula óssea pós infarto agudo do miocárdio. Barras 10µm. Coloração: Azul de Evans.....72

Figura 21 - Identificação de reação positiva para Ki 67 (setas) da porção crânio apical (A e D); Reação positiva para marcação com Hoechst® (B e E) e Controle negativo para Ki 67 (C e F). Animais com 21 dias (A-C) e 3 dias (D-F) pós terapia com infusão de células mononucleares da medula óssea pós infarto agudo do miocárdio. Barras: (A e B) 20 µm e (C – F) 10µm. Coloração: Azul de Evans.....73

Figura 22 - Identificação de reação positiva para Ki 67 (setas) da porção caudo médio medial (A e D); Reação positiva para marcação com

Hoechst® (B e E) e Controle negativo para Ki 67 (C e F). Animais com 24 horas (A-C) e 7 dias (D-F) pós terapia com infusão de células mononucleares da medula óssea pós infarto agudo do miocárdio. Barras: (A -F) 10µm. Coloração: Azul de Evans74

Figura 23 - Marcação positiva para Hoechst® mostrando que algumas células mononucleares da medula óssea foram capazes de sair da região do espaço pericárdico e invadir o epicárdio (seta) (A) no espaço intersticial (B e D) e próximo à parede de vasos (seta) (C). Animais controles com 21 dias de infusão de células mononucleares da medula óssea não induzidos ao infarto agudo do miocárdio. Barras (A-C) 10µm e (D) 20 µm. Coloração: Azul de Evans. 74

Figura 24 - Marcação positiva para Hoechst® mostrando que algumas células mononucleares da medula óssea foram capazes de sair da região do espaço pericárdico e invadir miocárdio (setas) no espaço intersticial (A-C) e aglomerar-se ao redor de vasos (D). Animais com 21 dias de infusão de células mononucleares da medula óssea pós infarto agudo do miocárdio. Barras (A e C) 20µm e (B e D) 10 µm. Coloração: Azul de Evans..... 76

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Atm - Atmosferas	ml - Mililitros
CD – Sítio de designação	ml/Kg – Mililitros por quilograma
Cm – Centímetros	mM -Milimolar
CMMO – Células Mononucleares de Medula Óssea	MSCs – Células-tronco mesenquimais
CONEP - Comitê de Ética em Pesquisa	NH ₄ CL – Cloreto de amônio
DAB - Diaminobenzina	°C – Graus Celcius
DNA – Ácido desoxirribonucleico	PA – Puro absoluto
FE – Fração de Ejeção	PBS – Salina livre de fosfato
g - Grama	PBS-BSA – Salina livre de fosfato – Solução básica de bloqueio
GM-CSF - Granulocyte - Fator estimulador de colônia – macrófago granulocítico	PEEP – Pressão expiratoria final positiva
HCL – Ácido clorídrico	Ph - Potencial hidrogeniônico
HSCs – Células-tronco hematopoiéticas	RPM – Rotação por minuto
IAM – Infarto agudo do miocárdio	SBF – Soro fetal bovino
IM - Intramuscular	SF – Solução fisiológica
IOT - Intubação oro-traqual	SNG – Soro normal de cabra
IV - Intravenoso	VEGF – Fator de crescimento de endotélio vascular
Kg - Quilogramas	® - Marca Registrada
LCCT – Laboratório de cirurgia cardiotorácica	μl - Microlitro
mg/Kg – Miligramas por quilograma	μm – Micrômetro
	% - Porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
2 OBJETIVO	26
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	30
3.1 DEFINIÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO	31
3.2 CLASSIFICAÇÕES DAS CÉLULAS-TRONCO DE ACORDO COM SUA CAPACIDADE DE AUTO-RENOVAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO...	32
3.2.1 Células Toti-potentes	32
3.2.2 Células Pluripotentes	32
3.2.3 Células Multi-potentes	32
3.3 FONTES DE OBTENÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO	33
3.3.1 Células-Tronco Embrionárias	33
3.3.2 Células Germinativas Embrionárias	33
3.3.3 Transferência de Núcleo Somático – Clonagem	33
3.3.4 Células-Tronco Adultas	34
3.3.4.1 Medula Óssea	34
3.3.4.2 Sangue Periférico	35
3.3.4.3 Sangue de Placenta ou de Cordão Umbilical	35
3.3.4.4 Células-Tronco Adultas Cultivadas	35
3.4 PLASTICIDADE DAS CÉLULAS-TRONCO	36
3.5 FONTES DE CÉLULAS-TRONCO CAPAZES DE FORMAR TECIDO CARDÍACO	36
3.6 USO DAS CÉLULAS-TRONCO ADULTAS NA CARDIOLOGIA – TRANSPLANTE AUTÓLOGO	37
3.6.1 Formação de Cardiomiócitos	38
3.6.2 Formação de Novos Vasos	42
3.7 VIAS DE INFUSÃO DAS CÉLULAS-TRONCO NO CORAÇÃO	42
3.7.1 Via Intracoronariana	41
3.7.2 Via Intramiocárdica (Transendocárdica / Transepicárdica)	44
3.7.3 Via Retrógrada	46
4 MATERIAL E MÉTODO	48

4.1 FASE I (ESTUDO PILOTO)	49
4.2 FASE II (ESTUDO CLÍNICO).....	49
4.3 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS	50
4.3.1 Obtenção das Células Mononucleares da Medula Óssea	50
4.3.2 Indução do Infarto Agudo do Miocárdio (IAM).	53
4.3.3 Infusão via Transpericárdica	56
4.4 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS	57
4.4.1 Separação das Células Mononucleares da Medula Óssea	57
4.4.2 Marcação do DNA Celular com Hoechst®	59
4.5 COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL	60
4.5.1 Material Processado em Paraplast®	62
4.5.2 Material Criopreservado	62
4.5.3 Cortes para Epifluorescência	63
4.5.4 Imunohistoquímica Indireta em Cortes Congelados	63
4.5.4.1 Imunohistoquímica Indireta com Ki67 e Fator VIII Policlonal Rabbit.....	63
4.5.4.2 Imunoperoxidase para Fator VIII	65
5 RESULTADOS	66
5.1 ANÁLISE MACROSCÓPICA	67
5.2 MICROSCOPIA ÓPTICA DE LUZ	68
5.3 CRIOSCOPIA E IMUNOHISTOQUÍMICA	67
6 DISCUSSÃO	77
7 CONCLUSÕES	82
8 PERSPECTIVAS FUTURAS	86
REFERÊNCIAS	92

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Desde o início do século 21, o transplante de células-tronco tem emergido como uma potente modalidade para o tratamento de doenças cardiovasculares com possível habilidade para induzir neovascularização e formação de tecido (TATEISHI-YUYAMA et al., 2002; HEESCHEN et al., 2004). Muitos avanços no entendimento da biologia das células-tronco tem ocorrido *in vitro* e em modelos animais (ASAHARA et al., 1997; TOMITA et al., 1999).

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

Os transplantes de células-tronco tem sido realizados a partir da utilização de 3 vias, consideradas até então as mais comuns, sendo a intracoronariana, Intramiocárdica (transendocárdica / transepicárdica) e via retrógrada, a qual ainda é pouco empregada, apesar de ser uma via segura e de fácil acesso (KALKA et al., 1999; CARMELIET; LUTTUN et al., 2001; FUCHS et al., 2001; AL-KLALDI et al., 2003; KAWAMOTO et al., 2003; TSE et al., 2003, MURAD-NETTO et al., 2004, SAMOTO et al., 2005 , SAMOTO, 2006). A via transpericárdica utilizada por Kornowski et al. (2000), Mannam et al. (2002) e Kolettis et al. (2005) teve como objetivo somente a administração de drogas e fatores de crescimento, e é exatamente por este motivo a que testamos para estudar a possibilidade da sua aplicabilidade na terapia celular.

O B J E T I V O

2 OBJETIVO

Avaliar a eficácia da via transpericárdica para infusão de células mononucleares da medula óssea (células-tronco), em suínos induzidos à doença cardíaca isquêmica aguda.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Apesar da grande diversidade de células que podem ser reconhecidas em tecidos adultos, todas derivam de uma única célula-ovo, após a fecundação de um óvulo por um espermatozóide. Essa única célula tem, pois, a propriedade de formar todos os tecidos do indivíduo adulto. Inicialmente, essa célula totipotente divide-se formando células idênticas, mas, muito precocemente na formação do embrião, os diferentes grupos celulares vão adquirindo características especializadas e, ao mesmo tempo, vão restringindo sua capacidade de diferenciação.

No entanto, na maioria dos tecidos adultos existem reservas de células com capacidade de multiplicar-se, diferenciando-se e ao mesmo tempo mantendo esta própria reserva de células indiferenciadas, as quais são as responsáveis pela manutenção da integridade dos tecidos adultos, pelo reparo de tecidos lesados e pela remodelação dos tecidos e órgãos (ZAGO; COVAS, 2006).

3.1 DEFINIÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO

Para se definir uma célula como uma célula-tronco, pesquisadores têm usado três critérios: 1) capacidade de se auto-regenerar em múltiplas e seqüenciais divisões (exemplo são as células-tronco hematopoiéticas, que dão origem a toda linhagem sanguínea, e as célula-tronco mesenquimais, que geram fibroblastos, osteoblastos, condroblastos e adipócitos); 2) capacidade de gerar diferentes tipos celulares; 3) capacidade de renovar o tecido original quando transplantadas em um receptor (BOCCHI; ISSA, 2003).

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

3.2 CLASSIFICAÇÕES DAS CÉLULAS-TRONCO DE ACORDO COM SUA CAPACIDADE DE AUTO-RENOVAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO

Estas células podem ser classificadas da seguinte forma:

3.2.1 Células Toti-potentes

Células que têm a capacidade de gerar sozinhas um novo embrião (SARMENTO-LEITE E DOHMANN, 2004).

3.2.2 Células Pluripotentes

Células que podem proliferar-se indefinidamente *in vitro* sem se diferenciar, mas também pode diferenciar-se em diferentes linhagens celulares se as condições de cultivo das células forem modificadas. São tipicamente as células-tronco embrionárias. Recentemente várias evidências indicam que algumas células-tronco adultas também possuem esta propriedade (SARMENTO-LEITE; DOHMANN, 2004).

3.2.3 Células Multi-potentes

Células que têm a capacidade mais reduzida para diferenciação, estando destinada a linhagens celulares específicas (SARMENTO-LEITE; DOHMANN, 2004).

3.3 FONTES DE OBTENÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO

As células-tronco apresentam as seguintes fontes:

3.3.1 Células-Tronco Embrionárias

São advindas de um estágio anterior ao do comprometimento com a gênese de tecidos específicos do organismo; por isso, células-tronco embrionárias, oriundas do estágio de blastocisto, têm maior versatilidade que células-tronco de organismos adultos e mesmo quando transplantadas em tecido diferenciados, podem se desenvolver em outros tecidos que não o receptor (BOCCHI; ISSA, 2003). Elas têm sido isoladas em ratos por mais de 20 anos, mas somente durante os últimos cinco anos é que as “*stem cells*” humanas foram isoladas com sucesso, sendo que a maioria dos laboratórios que o fazem, encontram-se nos Estados Unidos, Austrália e Suíça (MINKOWSKI, 2003).

3.3.2 Células Germinativas Embrionárias

Extraídas numa fase mais avançada do desenvolvimento fetal (5ª a 10ª semana), da região da prega gonadal (ZAGO; COVAS, 2006).

3.3.3 Transferência de Núcleo Somático – Clonagem

Criação de uma célula pluripotencial a partir de uma célula somática (ZAGO; COVAS, 2006).

3.3.4 Células-Tronco Adultas

Com raras exceções, as células-tronco de tecidos adultos estão comprometidas com a gênese de um número limitado de células e tecidos. Esse tipo de limitação, dado por estrito controle da expressão gênica, é importante para a manutenção da integridade tecidual durante a renovação celular normal e após injúria tecidual. Assim, esse tipo de controle garante, por exemplo, que, quando a pele seja ferida, não se forme na cicatriz ou tecidos outra origem (BOCCHI; ISSA, 2003).

3.3.4.1 Medula Óssea

Na medula óssea de mamíferos adultos, as células sanguíneas desenvolvem-se dentro de uma rede complexa de fatores de regulação humoral, celular e da matriz (DEXTER et al., 1983).

As células-tronco adultas da medula óssea consistem em uma série de populações de células pluripotentes, sendo elas hematopoiéticas (HSCs) e células-tronco mesenquimais (MSCs) que derivam de uma célula primitiva, de forma que ambos os tipos celulares quando injetados auxiliam principalmente na vasculogênese (POULSON et al., 2002).

Durante o desenvolvimento pós-natal os locais de atividade de hematopoiese mudam, havendo um grande decréscimo da atividade do fígado quanto a esta função e um aumento da atividade do baço. Em mamíferos adultos as células-tronco hematopoiéticas e células progenitoras residem na medula óssea no qual se encontram em íntimo contato com o estroma (SIMINIAK, 2003).

Acredita-se que os hemangioblastos são as mais primitivas células da medula óssea. Elas são a fonte das células-tronco hematopoiéticas e das células precursoras endoteliais no saco vitelínico de embriões, sendo que existem evidências que esta função está preservada na medula óssea (ORLIC, 2004), por isso, deve-se tomar cuidado ao atribuir benefícios a uma célula específica da medula

óssea quando a mesma possui células de várias linhagens e fenótipos (CAPLICE; GERSH, 2003).

3.3.4.2 Sangue Periférico

As células-tronco hematopoiéticas em geral não existem em quantidade significativa em circulação, mas elas podem ser “mobilizadas” tanto pelo uso de fatores de crescimento, como GM-CSF (Granulocyte macrophage colony-stimulating factor), quanto pelo uso de quimioterápicos, que causam uma depressão temporária da medula óssea, elevando-se, durante a recuperação, o número de células precursoras hematopoiéticas em circulação (ZAGO; COVAS, 2006).

3.3.4.3 Sangue de Placenta ou de Cordão Umbilical

Após o parto resta na placenta grande quantidade de sangue do feto, que é muito rico em células precursoras hematopoiéticas (ZAGO; COVAS, 2006).

3.3.4.4 Células-Tronco Adultas Cultivadas

As células-tronco mesenquimais podem ser cultivadas e expandidas *in vitro*, a partir de vários tecidos, principalmente de medula óssea, bem como as células-tronco hematopoiéticas de cordão umbilical (ZAGO; COVAS, 2006).

3.4 PLASTICIDADE DAS CÉLULAS-TRONCO

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

Esse processo de plasticidade das células-tronco tem sido demonstrado em vários estudos com células da musculatura esqueléticas, da medula óssea e células hematopoiéticas em infarto do miocárdio, na qual há habilidade destas se diferenciarem em células endoteliais e em cardiomiócitos, participando da angiogênese (ABBOTT; GIORDANO, 2003).

GRAF (2002) afirmou que os tecidos possuem plasticidade, isto é, a capacidade de gerar tecidos diferentes daquele para o qual havia sido inicialmente programado. Diferentes mecanismos têm sido propostos para se explicar a plasticidade, todos envolvendo as células-tronco. Uma possibilidade seria a existência, num mesmo tecido, de células-tronco comprometidas com diferentes linhagens (KAWADA; OGAWA, 2001).

Outra possibilidade seria a capacidade da célula-tronco sofrer diferenciação, isto é, retornar a um estágio mais primitivo, e rediferenciação, tornando-se comprometida com a gênese e o reparo de um diferente tecido (WILMUT et al., 1997).

3.5 FONTES DE CÉLULAS-TRONCO CAPAZES DE FORMAR TECIDO CARDÍACO

Células-tronco com capacidade de gerar tecido miocárdico, utilizadas até hoje em pesquisa experimental ou clínica, foram obtidas de diferentes locais: 1) Embriões: as quais são multipotentes, podendo formar diferentes tecidos, e são

obtidas de blastocistos. O transplante heterólogo tem sua utilização restrita por questões éticas e de imunogenicidade; 2) Mioblastos: obtidas de tecido muscular, foram as primeiras células utilizadas em humanos. São obtidas por biópsia muscular e cultivadas em laboratório. São células grandes, o que dificulta sua administração (por exemplo: intracoronária). São capazes de gerar cardiomiócitos com função contrátil. Esses cardiomiócitos, entretanto, não parecem formar sincícios com os cardiomiócitos existentes, e são bastante resistentes à isquemia; 3) Precursores da medula óssea: vêm sendo cada vez mais utilizados. Na medula óssea encontram-se tanto precursores hematopoiéticos quanto mesenquimais (BOCCHI; ISSA, 2003). São abundantes e relativamente fáceis de serem obtidos, não requerendo imunossupressão, podendo melhorar o resultado pós-infarto pelo menos de três maneiras: aumentando a vascularização, reparando o músculo cardíaco propriamente dito e produzindo citocinas ou fator que promove reparo miogênico e previne fibroses (SUSSMAN, 2001).

Aproximadamente 30% das células aspiradas da medula humana são consideradas células-tronco mesenquimais. Estas podem ser expandidas *in vitro* e induzidas à diferenciação (KOC; LAZARUS, 2001) e quando cultivadas, podem gerar espontaneamente cardiomiócitos e isto evidencia a formação de células musculares cardíacas *in vivo* derivadas de células-tronco adultas (MAKINO et al., 1999).

A escassa transformação das células hematopoiéticas em cardiomiócitos induz a utilização de infusão de células por injeções intracardíacas ou a mobilização por citocinas. O principal efeito *in vivo* das células indiferenciadas oriundas da medula óssea ou do endotélio é a neoangiogênese (HIDEMASA, 2003).

3.6 USO DAS CÉLULAS-TRONCO ADULTAS NA CARDIOLOGIA – TRANSPLANTE AUTÓLOGO

A terapia celular para doenças cardíacas, principalmente as isquêmicas, tem sido objeto de muita investigação desde o final da década de 90. O infarto do miocárdio determina a perda de tecido cardíaco. Os cardiomiócitos remanescentes são incapazes de reconstituir o tecido necrótico e o órgão sofre um processo de deterioração funcional após o infarto, pois infelizmente, a necrose miocárdica inicia-

se rapidamente após a oclusão arterial. A perda do miocárdio viável inicia um processo adverso de remodelamento, levando a dilatação da câmara cardíaca e disfunção na contratilidade (HASSINK et al., 2003 b; NIR et al., 2003; WOLLERT et al., 2004).

Implantes de inúmeros tipos celulares foram testados com a intenção de promover a recuperação do miocárdio isquêmico, incluindo o uso de células musculares lisas, mioblastos esqueléticos, células mononucleares da medula óssea e células mesenquimais. Os dois primeiros tipos, por serem tipos celulares diferenciados, não se mostraram atraentes, pois não desempenham o mesmo papel dos cardiomiócitos quanto capacidade limitada de contração, embora os resultados de estudos em modelos animais tenham revelado melhora da função cardíaca (LI, et al., 1999; MENASCHÉ, et al., 2001)

O transplante autólogo de células-tronco da medula óssea é seguro e não há evidências de toxicidade sistêmica ou local em fase aguda ou crônica. Também não foram observadas zonas de calcificação, produção de células sanguíneas ou resposta inflamatória como migração de neutrófilos ou linfócitos (HAMANO et al, 2002). Além disso, são de fácil obtenção, sem objeções éticas, habilidade de expansão, alta compatibilidade e não há necessidade de imunossupressão. Já como desvantagem observa-se o fato de não haverem marcadores específicos (STRAUER; KORNOWISKI, 2003).

3.6.1 Formação de cardiomiócitos

No que se refere à reconstituição do tecido cardíaco, um grande número de estudos tem mostrado que ocorre a diferenciação em cardiomiócitos tanto *in vitro* quanto *in vivo*, a partir de linhagens de células circulantes ou diretamente oriundas da medula óssea (MALOUF et al., 2001).

Classicamente, o miócito cardíaco, assim como as células nervosas, era tido como células pós-mitóticas terminais, altamente diferenciadas e incapazes de regenerar-se. É sabido que, no miocárdio, células endoteliais, musculares lisas e fibroblastos são capazes de proliferar. Só recentemente, entretanto, demonstrou-se que também os miócitos cardíacos são capazes de sofrer mitose; autores têm

sugerido índice mitótico de 0,015%, o que seria suficiente para gerar 100g de miocárdio em menos de três meses (KAJSTURA et al., 1998).

A relevância clínica desses achados experimentais foi sedimentada em 2001, com a demonstração da existência de divisão de miócitos na periferia de áreas necróticas em pacientes com infarto agudo do miocárdio (BELTRAMI et al., 2001).

Havia dúvida se essas células que proliferam eram preexistentes no miocárdio ou provinham de precursores à distância que migravam para sítio de regeneração. Em 2002, pesquisadores demonstraram que células de receptores de transplante cardíaco são capazes de migrar e repovoar o enxerto, sugerindo que a capacidade do tecido cardíaco se regenerar dar-se-ia, ao menos em parte, pela migração de células pluripotentes extracardíacas (QUAINI et al., 2002).

Com isso, foi concebido um novo modelo para se explicar progressão da disfunção ventricular, que ocorreria por desequilíbrio entre a morte celular (por necrose ou apoptose) e a capacidade tecidual de regeneração. Acredita-se que sob condições de equilíbrio fisiológico, células-tronco presentes no próprio tecido, recomporiam o tecido apoptótico. Entretanto, em condições de aumento da perda celular (com a insuficiência cardíaca), células-tronco circulantes seriam recrutadas em maior número e sofreriam diferenciação em tecidos de órgãos sólidos. Abriu-se, assim, a perspectiva de novas formas de tratamento que tivesse como princípio a amplificação dos mecanismos de regeneração do tecido miocárdico (ANDERSON et al., 2001).

Já Kocher et al. (2001) revelaram que os miócitos cardíacos derivados da medula óssea foram detectados em ratos infartados, depois de injeção na veia da cauda, de células da medula óssea CD 34⁺ humana adulta.

Em outro estudo foi possível observar que seis semanas depois da injeção direta de uma linhagem de células WBF344, derivadas do fígado de ratos machos e marcadas com o gene lac Z da *E. coli*, no ventrículo esquerdo de ratos fêmeas, as células doadas mostraram-se diferenciadas em cardiomiócitos, pois, expressaram troponina cardíaca T e formaram discos intercalares. Este fato foi confirmado a partir da presença do cromossomo Y dos ratos e da expressão da *E. coli* β-galactose (MALOUF et al., 2001).

Toma et al. (2002) demonstraram que células mesenquimais de medula óssea de humanos transplantados, em coração normal de ratos, se transformaram em cardiomiócitos. Estes resultados foram reproduzidos em modelos suínos de

infarto agudo do miocárdio, de forma que cardiomiócitos, juntamente com novos vasos originados da medula óssea, foram identificados.

Estudos histopatológicos do coração de mulheres submetidas a transplante de medula óssea, de doadores homens, Deb et al. (2003) observaram a presença de cardiomiócitos com cromossomo XY, ou seja, cardiomiócitos com origem na medula óssea dos doadores. Outros estudos já haviam descrito a origem extra-cardíaca de novos cardiomiócitos (BAYES-GENIS et al., 2002; GLASER et al., 2002; LAFLAMME et al., 2002; MULLER et al., 2002; QUAINI et al., 2002), mas este foi o primeiro a identificar a medula óssea como fonte de novos cardiomiócitos, revolucionando assim, o conceito até então vigente, de que não há regeneração da musculatura cardíaca.

Isto também é confirmado por Hassink et al. (2003 a), que afirmaram que em modelos animais o transplante de cardiomiócitos pode aumentar a massa cardíaca, bem como a função sistólica, contribuindo na vascularização da região infartada.

Strauer et al. (2001a) relataram o caso de um paciente homem, de 46 anos de idade, que apresentava um quadro de síndrome coronária aguda, com oclusão do ramo descendente anterior esquerdo e artéria coronária esquerda, comprometendo assim o ápice ventricular esquerdo, parede anterior e parte do septo cardíaco, resultando em 24,6% do ventrículo esquerdo infartado. Este paciente foi submetido à terapia celular com infusões de células-tronco via intracoronariana provenientes da medula óssea do mesmo, e após 10 semanas do transplante, a parede anterior havia sido revascularizada, com redução da área infartada.

Análises histopatológicas em ratos infartados, submetidos à terapia celular demonstram que uma semana após a infusão de células-tronco da medula óssea, há presença confirmada, através de fluorescência, de células doadoras nas áreas infartadas do coração, o que sugere que as células-tronco da medula óssea são capazes de colonizar miocárdio infartado quando transfundidas cedo ou tarde depois do infarto. Entretanto uma percentagem muito baixa (1%) destas células infundidas coloniza o coração (BARBASH et al., 2003).

Em contrapartida Orlic et al. (2001) demonstraram que células-tronco da medula óssea regeneram e ocupam 68% da área infartada nove dias após o infarto agudo formando um novo tecido, incluindo artérias, arteríolas e capilares. Tal fato foi observado através das células-tronco marcadas com uma proteína verde

fluorescente. Esta proteína facilitou a identificação das células doadoras que foram injetadas diretamente no miocárdio depois do bloqueio de sangue da coronária. A função cardíaca e vários genes miocíticos específicos foram expressos e descritos por Jackson et al. (2001).

Mais tarde, Brofman et al. (2004) confirmaram os mesmos resultados, porém, de maneira mais detalhada, utilizando 72 ratos Wistar com cardiomiopatia isquêmica e fração de ejeção do ventrículo esquerdo, menor que 40%. Estes animais foram separados em quatro grupos de acordo com o meio de cultura ou das células injetáveis: grupo controle, em que foi injetado apenas meio de cultura (22 ratos); grupo de células-tronco mesenquimais (17 ratos); grupo de células mioblásticas esqueléticas (16 ratos) e grupo de co-cultura (17 ratos). Nos estudos imunocitoquímicos, as células foram marcadas com anti-vimentina, anti-desmina e anti-miosina. Nos estudos histopatológicos, as lâminas foram coradas por Tricromo de Gomori, no qual foram identificados neovasos e tecido muscular. Na análise funcional, foi medida a fração de ejeção do ventrículo esquerdo em dois momentos do segmento, uma semana após o infarto do miocárdio e um mês após a injeção. Com isso observou-se que a fração de ejeção do ventrículo esquerdo entre os quatro grupos, não apresentou diferença estatística significativa ($P = 0,276$). No estudo imunocitoquímico *in vitro*, identificou-se células-tronco mesenquimais quando marcou-se com anti-vimentina e células musculares, com anti-desmina. Nas espécimes cardíacas, identificou-se tecido muscular marcado com anti-desmina e células mioblásticas esqueléticas marcadas com anti-miosina rápida. No estudo histopatológico, observaram-se novos vasos no grupo de células-tronco mesenquimais, no grupo de células mioblásticas esqueléticas, tecido muscular e angiogênese e miogênese no grupo co-cultura.

Kawada e Ogawa (2001) relataram o procedimento em 10 pacientes, sendo isolados mioblastos por biópsia muscular e expandidos em laboratório por duas semanas. Os mioblastos foram injetados no miocárdio em áreas sem evidência de isquemia. Apesar de ter sido relatada melhora da fração de ejeção (em média 24% para 34%) e melhora de sintomas congestivos, é impossível diferenciar o impacto do transplante celular do benefício obtido com a revascularização tradicional.

3.6.2 Formação de novos vasos

A neoangiogênese previne o remodelamento cardíaco através do aumento do fluxo no miocárdio, limitando desta maneira a apoptose das células cardíacas (miócitos) e reduzindo a deposição de colágeno e, conseqüentemente a formação cicatricial (ASSMUS et al., 2002).

Os miócitos cardíacos são a maior fonte de Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) no coração e a perda específica do mesmo traz profundos efeitos sobre a sua função e vascularização (ABBOTT; GIORDANO, 2003).

O paradigma de que as células endoteliais seriam geradas por replicação de células endoteliais maduras foi revolucionado. Asahara et al. (1997) observaram que grande parte das células envolvidas no processo de angiogênese tinha origem na medula óssea, possibilitando a descoberta de que há vasculogênese na vida adulta, ou seja, que ocorre surgimento de novos vasos nesta mesma fase e não somente a replicação de capilares a partir de vasos já existentes, conceito que responde por angiogênese.

Baseado nesta informação Ren et al. (2002) aplicaram este conhecimento em cães induzidos ao infarto, que receberam infusão de células-tronco da medula óssea e após um período de 28 dias houve uma significativa formação de vasos na parede muscular cardíaca.

3.7 VIAS DE INFUSÃO DAS CÉLULAS-TRONCO NO CORAÇÃO

Quando se trata de transplante de células-tronco, em patologias isquêmicas cardíacas, 3 são as vias mais utilizadas para a infusão das mesmas: intracoronariana, intramiocárdica (transendocárdica / transepicárdica) e via retrógrada a qual ainda é pouco empregada, apesar de ser uma via segura e de fácil acesso (KALKA et al., 1999; CARMELIET; LUTTUN et al., 2001; FUCHS et al., 2001; AL-KLALDI et al., 2003; KAWAMOTO et al., 2003; TSE et al., 2003; MURAD-NETTO et al., 2004; SAMOTO et al., 2005; SAMOTO, 2006).

3.7.1 Via Intracoronariana

A via intracoronariana parece ser a mais efetiva e a menos prejudicial, pois as células injetadas são seletivamente direcionadas para reparar a área lesada e não resultam inconveniência nem indução de arritmias segundo Timmermans et al. (2003).

Esta via é considerada segura, não havendo evidência de aumento na taxa de re-estenose (WOLLERT, 2004). Por esta via as células ficam acumuladas e concentradas dentro da área infartada, atravessando pela área infartada e peri-infartada já na primeira passagem. Por este motivo, acredita-se que o tecido é embebido por um máximo número de células viáveis (STRAUER; KORNOWISK, 2003).

Utilizando-se desta via, Hou et al. (2005) infundiram células mononucleares de sangue periférico e observaram ao contrário de Strauer e Kornowisk, (2003) que as células ficaram localizadas preferencialmente na parede antero-lateral, e algumas das mesmas também foram observadas no ventrículo direito.

Pela infusão intracoronariana as células foram encontradas em todas as camadas musculares, aparentemente dentro do lúmen de pequenos capilares e, ocasionalmente no interstício do músculo. Também pôde ser observado histologicamente a formação de pequenas colônias composta de células transplantadas. A via intracoronariana teoricamente é melhor em relação a intramuscular, pois não somente produz menos danos ao miocárdio, mas também dissemina globalmente as células transplantadas. Contudo a taxa de sobrevivência das células por esta via não foi adequada. Isto, segundo os autores, ocorre devido à dificuldade de translocação das células dos vasos para o interstício tecidual (SUZUKI et al., 2000).

A infusão de células-tronco pela via intracoronariana é uma das mais utilizadas, contudo, foi observado em cães a presença de microinfartos em tecido cardíaco. Os autores atribuem este fato ao diâmetro das células tronco (20 μ m) em relação aos microvasos cardíacos (VULLIET et al., 2004).

O transplante autólogo de células-tronco da medula óssea por via intracoronária, em pacientes infartados, promove um reparo tecidual imediato após o período de infarto. Tal terapia mostra também que há o aparecimento de novos

cardiomiócitos e capilares coronários, bem como migração transendotelial para os capilares coronários e incorporação de células no músculo cardíaco (STRAUER et al., 2001b).

Assmus et al. (2002) descreveram que 20 pacientes, entre 18 e 75 anos de idade com infarto agudo do miocárdio receberam injeções intracoronarianas de células-tronco da medula óssea e após quatro meses, as avaliações cardíacas mostraram que os pacientes apresentaram melhora progressiva, sem registro de óbito, atestando que as infusões intracoronarianas de células-tronco, são seguras e possíveis de serem realizadas.

Wollert et al. (2004) publicaram os resultados do primeiro estudo randomizado em pacientes com infarto agudo do miocárdio (ensaio clínico controlado) demonstrando a melhora da fração de ejeção no segmento de seis meses pós implante intracoronariano de células-tronco da medula óssea. Por esta via as células ficam acumuladas e concentradas dentro da área infartada, no qual as células atravessam a área infartada e peri-infartada já na primeira passagem. Por este motivo, acredita-se que o tecido é embebido por um máximo número de células viáveis (STRAUER; KORNOWISK, 2003). Pela infusão intracoronariana as células foram encontradas em todas as camadas musculares, aparentemente dentro do lúmen de pequenos capilares e, ocasionalmente no interstício do músculo. Também pôde ser observado histologicamente a formação de pequenas colônias compostas de células transplantadas.

3.7.2 Via Intramiocárdica (Transendocárdica / Transepicárdica)

A injeção intramiocárdica é o método mais popular de infusão de células dentro do coração. Ela tem grande importância em casos de cardiopatia isquêmica devido à habilidade de restituir as células seletivamente dentro do tecido miocárdico, tanto em áreas normais quanto em infartadas. Contudo, as células por esta via formam pequenas “ilhas”, resultando em uma possível limitação de interação célula/célula (células transplantadas e cardiomiócitos) (SUZUKI et al., 2001). Não foram observadas complicações relacionadas à fase aguda (pós-cirúrgico) ou

seqüelas a longo tempo. Além disso, por esta via, a infusão de células pode ser realizada no local isquêmico (TSE et al., 2003).

Em 2001 Hamano e colaboradores registraram cinco casos de terapia com células-tronco da medula óssea realizados no Japão, nos quais, o transplante intramiocárdico destas células foi realizado durante cirurgia de revascularização miocárdica em território não revascularizáveis, quando 3 de 5 pacientes obtiveram melhora da perfusão miocárdica nas regiões injetadas. Posteriormente, este estudo foi reproduzido na Alemanha por Stamm et al., (2003) gerando resultados semelhantes.

Ozbaran et al. (2004) relataram a evolução de seis pacientes diagnosticados com cardiomiopatia isquêmica (fração de ejeção do ventrículo esquerdo = 25%), que foram submetidos à terapia com células-tronco da medula óssea, através de infusões via intramiocárdica, e acompanhados por 4 meses, resultando após análise de eco e eletrocardiograma, melhora significativa da fração de ejeção.

De acordo com Hou et al. (2005), na via intramiocárdica, as células estavam localizadas predominantemente em parede antero-lateral do ventrículo esquerdo. Os mesmos autores relataram que esta via levou a uma maior retenção de células em tecido cardíaco, contudo, esta diferença não foi significativa em relação às outras vias também testadas.

A via transendocárdica tem como principal vantagem realizar a infusão de células através de visualização. Previamente é realizada a identificação anatômica da área, e até a distribuição das infusões uma vez que para a realização desta via é necessária a utilização do NOGA para mapeamento do órgão. Contudo, esta via pode causar injúria ao miocárdio, induzir extra-sístoles e até mesmo arritmia ventricular tendo em vista que da ponta do cateter NOGA projeta-se uma microagulha que perfura o tecido cardíaco para fazer o mapeamento (STRAUER; KORNOWISK, 2003), porém Samoto (2006) afirma que a via transendocárdica, ainda assim, é a mais eficaz quando se tem por objetivo o tratamento localizado.

Tse et al. (2003) utilizaram a via transendocárdica por acesso percutânea, em 8 pacientes, também diagnosticados com cardiomiopatia isquêmica, para promover terapia celular com células da medula óssea. Ao final de três meses, as imagens da ressonância magnética mostraram uma perfusão do miocárdio, bem como melhora da função da área tratada.

Em 21 pacientes com cardiomiopatia isquêmica e fração de ejeção inferior a 40%, Perin et al. 2003 administraram injeções transendocárdicas (método NOGA) de células-tronco, derivadas da medula óssea, com o objetivo de avaliar a segurança do procedimento, avaliar sintomas, função e perfusão miocárdica. Após dois meses, houve melhora da isquemia e redução da área isquêmica; após quatro meses havia melhora da fração de ejeção (de 20% para 29%) e redução do volume diastólico final. O pequeno número de pacientes e a ausência de intervenção no grupo controle limitaram a extrapolação dos resultados.

Perin et al. (2004) fizeram um estudo para o transplante transendocárdico por cateter de células-tronco da medula óssea em pacientes com grave cardiomiopatia isquêmica, sem possibilidade de revascularização miocárdica convencional. Quatorze pacientes foram submetidos à terapia celular. Os transplantes de células foram realizados com o uso de cateteres NOGA (transendocárdico) e os procedimentos foram realizados sem complicações maiores, sendo que todos os pacientes receberam alta hospitalar em 48 horas. Em dois meses de acompanhamento houve significativa melhora dos sintomas, da perfusão miocárdica, com redução da área de isquemia de 15,1% para 4,5% da área do ventrículo esquerdo ($p=0,02$), redução do volume sistólico final em 15% e melhora relativa de 31% na FE, com resultados mantidos de 6 a 12 meses.

3.7.3 Via Retrógrada

A via venosa ou retrógrada é a via de administração considerada a mais fácil de ser realizada. A grande desvantagem, contudo, é que somente 3% do fluxo percorre o ventrículo esquerdo por minuto. Existe ainda o agravante de captura das células pelos pulmões. Outro fator que deve ser levado em consideração é que por esta técnica as células demoram mais para atingir a área infartada, o que limita sua aplicabilidade (STRAUER; KORNOWISK, 2003).

A principal desvantagem da utilização desta via para infusão de células remete-se a necessidade da passagem das mesmas por outros tecidos, para que sejam então capazes de se difundirem nas regiões peri-infartada e infartada (STRAUER et al., 2001a).

Murad-netto et al. (2004) relataram o histórico de um paciente, com quadro de infarto agudo do miocárdio sendo submetido à terapia com células-tronco da medula óssea através de veia descendente anterior, a fim de promover miogênese e angiogênese e concluíram que a terapia de infusão de células-tronco para o tratamento do infarto agudo do miocárdio através da perfusão retrógrada é viável e delineia a possibilidade de que o sistema venoso coronariano, facilmente acessível por cateterismo direito, possa ser uma via de entrada para a terapêutica do miocárdio isquêmico e para outros fins diagnósticos e terapêuticos, visando o acesso de medicamentos ao tecido miocárdico.

Hou et al. (2005) descreveram que a predominância de células radiomarcadas em modelo de isquemia cardíaca pela via retrógrada encontra-se basicamente na base do coração, átrio e ventrículo direito.

Samoto (2006) acrescentou ainda que a via retrógrada é mais indicada para doenças coronarianas ou como complemento para vias intracoronariana e transendocárdica e que no que se refere a via que mais apresenta adesão de células-tronco pós-infusão, temos em ordem de maior volume a via transendocárdica, seguida pela via intracoronariana e por fim a via retrógrada.

MATERIAL E MÉTODO

4 MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados 10 suínos, fêmeas, com média de peso de 25Kg, saudáveis, oriundos de uma granja da região próxima a cidade de São Paulo (Ibiúna), que permaneceram alojados por um período máximo de 45 dias, em baias apropriadas para a espécie (Figura 1), pertencentes ao Departamento de Patologia (VPT) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo – FMVZ-USP.

4.1 FASE I (ESTUDO PILOTO)

Inicialmente 4 animais pilotos foram induzidos ao Infarto Agudo do Miocárdio através de cateter balão inflado por 45 minutos no 1° ramo diagonal da artéria coronária interventricular. Após este período os animais receberam 1×10^8 células mononucleares da medula óssea marcadas com Hoechst® 33342 (Invitrogen/número catálogo H1399/Brasil) e posteriormente, cada animal foi avaliado em períodos distintos (1, 3, 7 e 21 dias) para que deste modo fosse visualizado o possível comportamento das células infundidas resultando em distribuição celular diferenciada.

4.2 FASE II (ESTUDO CLÍNICO)

Esta fase foi constituída devido a evidencia de que o animal com 21 dias de tratamento apresentou distribuição celular homogenia, com células presentes em toda a estratigrafia cardíaca. Diante deste resultado aumentamos com mais 2 animais o grupo de 21 dias de terapia e formamos um grupo controle, também com 3 animais, não infartados, porém, que receberam as mesmas células, para avaliarmos a influência quimiotática.

Figura 1 - Animais alojados em baias apropriadas, na FMVZ/USP

4.3 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Para a realização deste estudo foram realizados 3 procedimentos cirúrgicos, sendo eles:

4.3.1 Obtenção das Células Mononucleares da Medula Óssea

Os procedimentos cirúrgicos desta pesquisa foram realizados no Laboratório de Cirurgia Cárdio-Torácica (LCCT) localizado no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo – HOVET/FMVZ-USP e as coletas das células foram realizadas adaptando-se a técnica descrita por Crow e WALSHAW, (2000).

Ainda nas baias, os animais foram pré-anestesiados com Cloridrato de Ketamina (Dopalen[®] - Vetbrand) na dose de 3 mg/Kg associada a Midazolan (Dormire[®] - Cristália) na dose de 0,5mg/Kg via intramuscular (IM).

Posteriormente, os animais foram transportados até o Laboratório de Cirurgia Córdio-Torácica (LCCT) onde buscou-se acesso venoso através de uma veia periférica da orelha para instituição de fluidoterapia com Ringer-Lactato de Sódio e indução anestésica (Figura 2 A). A indução foi realizada utilizando-se Propofol (Propovan[®] - Cristália), na dose de 5mg/Kg Intravenoso (IV). Em seguida realizou-se a intubação oro-traqueal (IOT), com sonda traqueal adequada a cada animal. A manutenção anestésica foi realizada com anestesia geral inalatória utilizando-se Isoflurano (Isoforine[®] - Cristália) através do Shoogun Evolution 2700[®] (Takaoka) (Figura 2 B). Foi utilizada Ventilação Controlada à Volume (8ml/Kg) e PEEP = 5cm H₂O.

Figura 2 - Acesso à veia periférica da orelha para fluidoterapia e indução anestésica (A). Aparelho de anestesia inalatória Shoogun Evolution 2700[®] (takaoka) (B)

Através de palpação, delimitou-se a região da crista ilíaca, promovendo-se assim a tricotomia e assepsia da região, conseqüentemente, foi realizada analgesia da pele, tecido subcutâneo e musculatura com Cloridrato de Lidocaína à 02% (Xylocaína[®] - AstraZeneca do Brasil LTDA) sem vaso constritor, seguido de punção com agulha para punção óssea, utilizada em humanos - Tamanho 11 x 10,2cm (HS Trapsystem[®] - MEDICAL) (Figura 3 – A e B), a qual apresentava-se envolta por uma cânula sendo ambas perfuro-cortante, dispensando assim, uma incisão local.

Uma vez introduzido o conjunto, ultrapassando a barreira da pele, musculatura e região cortical da crista ilíaca removeu-se a agulha, permanecendo

apenas a cânula, a qual foi acoplada a um total de 6 seringas de 10ml, Luer-lock (BD), as quais apresentam um sistema de rosqueamento em sua extremidade (Figura 3 - C), favorecendo a pressão, contendo heparina sódica (Herin[®] - Prodotti Laboratório Farmacêutico Ltda), e por pressão negativa foram aspiradas aproximadamente 60ml de medula óssea de cada animal (Figura 4).

As seringas contendo o aspirado medular foram suavemente homogeneizadas e em seguidas colocadas em isopor com gelo, para serem encaminhadas ao laboratório, iniciando assim o processo de separação celular.

Figura 3 - Punho twist lock (A) e Ponta tipo “Double Diamond” (seta vermelha) com cânula cortante “Twin Peaks” (seta azul) (B) e seringa Luer-lock. Sistema de rosqueamento (seta verde)

Figura 4 - Coleta da medula óssea na região da crista ilíaca por pressão negativa, com auxílio da agulha de punção de medula e seringa Luer-Lock

4.3.2 Indução do Infarto Agudo do Miocárdio (IAM)

Ainda com o animal sob plano anestésico realizou-se a dissecação da artéria femoral e canulação utilizando-se de uma Fita Cardíaca® (Ethicon – Johnson&Johnson) (Figura 5 A) para ancoragem da mesma. Um cateter guia (Figura 6), através de uma bainha (Figura 5 B e Figura 7) foi levado até a artéria coronária, servindo como guia para posterior utilização do cateter balão (Figura 8 – A e C) inflado com uma bomba insufladora (Figura 8 – B). Este balão teve por função interromper o fluxo sanguíneo, promovendo assim isquemia. Para a verificação da correta localização do balão, foi injetada solução de contraste iodado (Telebrix Coronar® - Guerbet), para percepção da imagem através de fluoroscopia (Fluoroscópio Philips BV Pulsera) (Figura 9). Após o correto posicionamento do cateter balão no 1º ramo diagonal da artéria coronária interventricular, o mesmo foi inflado com 2atm, por 45 minutos, com o intuito de promover o infarto devido à interrupção do fluxo sanguíneo, uma vez que este período é suficiente para promover a morte tecidual (Figura 10) (HOU et al., 2005).

Figura 5 - Artéria femoral (seta) isolada com auxílio de fitas cardíacas (*) (A). Posicionamento da bainha (seta) no interior do vaso, para auxiliar na passagem do fio guia e cateter balão (B)

Figura 6 – Cateter guia, flexível, utilizado para alcançar a coronária e guiar outro cateter

Figura 7 – Bainha, utilizada para facilitar a entrada da guia no vaso

Figura 08 - Cateter balão (A), com calão localizado na extremidade (seta) (B) e Bomba insufladora utilizada para inflar o cateter balão (C).

Figura 09 - Fluoroscópio Philips BV Pulsera com capacidade de aquisição de 30 pulsos/segundo (A). Estação de Visão Móvel avançada (monitores) (B)

Figura 10 - Imagem radiográfica por fluoroscopia do ramo descendente da artéria coronária esquerda contrastada (seta) (A) e o mesmo ramo com fluxo interrompido, pós posicionamento do cateter balão (seta) (B)

4.3.3 Infusão via transpericárdica

Após o estabelecimento do infarto do miocárdio, foi introduzida uma Agulha Peridural Tuohy (BD™) (Figura 11) na região mediana pré-umbilical (Figura 12). Este procedimento foi realizado pós tricotomia e assepsia local, perfurando pele, musculatura e pleura pericárdica, a qual apresentava uma resistência média, requerendo muita delicadeza durante a manobra.

Uma vez perfurado o pericárdio foi injetado contraste iodado para visualizar o posicionamento correto da agulha no espaço pericárdico (Figura 13) e em seguida, foram infundidos lentamente, 10ml da suspensão de células mononucleares da medula óssea, sendo a técnica de separação das células descritas em capítulo que se segue.

Os animais foram mantidos vivos por um período de 24 horas, 3 dias, 1 semana e 21 dias respectivamente, esperando com isso um acompanhamento da involução da doença, o qual pode ser detectado através de análises microscópicas.

Figura 11 - Esquema da Agulha Peridural Tuohy utilizada para perfurar o saco pericárdico

Figura 12 - Perforação da região mediana pré-umbilical com agulha epidural para infusão das células mononucleares da medula óssea

Figura 13 - Local de infusão das células mononucleares da medula óssea (espaço pericárdico - asterisco) conforme visualização pela fluoroscopia. Agulha peridural (seta vermelha) e contraste iodado (β)

4.4 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

Foram utilizados 6 procedimentos laboratoriais descritos a seguir:

4.4.1 Separação das Células Mononucleares da Medula Óssea

Primariamente, efetuou-se a diluição de cada 20ml de medula óssea coletada em 20ml de solução fisiológica 0,9%. Em seguida, promoveu-se a separação celular por gradiente de densidade, a qual consistiu na colocação de 20ml de Ficoll-Paque™ Plus® (Amersham Pharmacia) em um tubo cônico e, sendo lenta e cuidadosamente adicionada a solução de medula óssea diluída com auxílio de uma pipeta Pasteur de modo a evitar-se a homogenização entre as soluções. Esta nova solução (medula diluída + Ficoll) foi centrifugada por 20 minutos, a 2000rpm e à temperatura de 20°C. Após a centrifugação, as células de interesse

formam um halo entre os diferentes gradientes obtidos. A separação do halo foi promovida com o auxílio de uma pipeta Pasteur e alocados em novo tubo cônico, adicionando-se uma solução de suspensão composta por soro fetal bovino e solução fisiológica 0,9% na proporção 1:6 e levados à centrifugação (2000rpm a 20°C/7 minutos).

Ao término da centrifugação, desprezou-se o sobrenadante e o aglomerado celular sedimentado foi suspenso em nova solução de suspensão e filtrado em malha de aço inox 150 Mesh. O produto obtido foi resuspenso em nova solução de suspensão e levados a centrifugação obedecendo à mesma configuração acima.

Ao final deste processo, o sobrenadante foi desprezado e o aglomerado celular re-suspenso em 2ml de solução fisiológica, de onde se procedeu a separação de uma pequena alíquota para contagem de células vivas em câmara de Neubauer coradas com Azul de Tripán (Merck). Esta técnica de coloração caracteriza-se por corar as células mortas, destacando-as dentre as células vivas. Após a quantificação, separou-se alíquota 10^8 células seguindo-se a marcação do DNA celular com Hoechst[®] 33342 (Invitrogen/H1399/Brasil) (Figura 14). O volume de células marcadas (10ml) foi injetado no espaço pericárdico (STRAUER et al., 2001a).

Figura 14 - Esquema do processo de separação das células mononucleares da medula óssea

4.4.2 Marcação do DNA Celular com Hoechst®

Para a marcação do DNA das células-tronco mesenquimais o corante Hoechst® 33342 (Invitrogen/H1399/Brasil) aplicou-se o seguinte procedimento:

- 1µl Hoechst® para cada 10^8 células;
- 10ml de solução fisiológica;

A suspensão foi transferida para uma seringa de 10ml e incubada em banho-maria (Callmex®) por 30 minutos à temperatura de 37°C.

Após incubação, a seringa contendo as células foi envolta por papel alumínio, para proteger as células marcadas da ação direta da luz, pois o corante é fotossensível, e ficou acondicionada em isopor contendo gelo até o momento da infusão. O tempo de marcação e infusão não pode ultrapassar duas horas devido à

manutenção da viabilidade celular, portanto, a indução do infarto, a suspensão e a marcação celular tiveram que ser sincronizados.

4.5 COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL

Imediatamente após a eutanásia foram coletados 17 fragmentos de cada ventrículo, utilizando-se a mesma metodologia de coleta empregada por Cerqueira et al. (2002). Esta consta da aplicabilidade do gráfico para análise tomográfica do coração (Figura 15), porém o mesmo teve que ser adaptado, uma vez que o posicionamento do coração do homem é diferente dos animais, ou seja, que, no homem, os ventrículos estão dispostos anteriormente, enquanto que nos animais, o coração faz um giro de aproximadamente 90°, de maneira que o ventrículo esquerdo fica posicionado cranialmente. Com isso, toda a nomenclatura utilizada para o mapeamento cardíaco, passa a ser adotada de acordo com o posicionamento quadrupedal dos animais. Assim os planos de delimitação corporal no homem, denominado anterior, posterior, superior e inferior, nos animais passam a ser chamados de cranial, caudal, dorsal e ventral (Figura 16).

Os cortes transversais do coração foram divididos em 6 fragmentos do segmento basal, 6 fragmentos do segmento médio, 4 fragmentos do segmento apical e 1 fragmento somente do ápice propriamente dito.

Fonte: CERQUEIRA et al., 2002, *Circulation*, v. 105, p. 539-542, 2002.

Figura 15 – Esquema de coletados 17 segmentos cardíacos da nomenclatura recomendada para imagem tomográfica do coração

Figura 16 – Esquema adaptado de CERQUEIRA et al., 2002 da coleta dos 17 segmentos cardíacos da nomenclatura recomendada para imagem tomográfica do coração, de acordo com o posicionamento deste órgão nos animais

Parte do material foi processado em Paraplast (Paraplast Embedding Media - Paraplast Plus[®], Ox-ford Lab., USA) e parte foi criopreservado para realização de cortes congelados.

4.5.1 Material processado em Paraplast

O material foi fixado em solução de Paraformaldeído 10%, e processado através de técnica rotineira de inclusão em Paraplast (TOLOSA et al., 2003). Os blocos foram cortados em um Micrótomo Leica[®] com espessura de 5 μ m e corados por Hematoxilina-eosina, Tricromo de Masson (BEHMER; TOLOSA; FREITAS NETO, 1976) e Picro sírius (JUNQUEIRA, 1999).

4.5.2 Material criopreservado

Para os cortes congelados os fragmentos foram criopreservados com solução de glicerol e PBS em seguida embebidos em uma solução de Tissue-tek[®] (Sakura) e congelados à -20°C e depois -80°C. Os cortes destes materiais foram realizados em um criostato (Leica[®], modelo 1850) à -20°C, com espessura de 5 μ m, e colocados sobre lâminas foram silanizadas.

Foram feitas 10 lâminas de cada bloco, sendo cada lâmina contendo 3 cortes e 2 lâminas de cada bloco, também com 3 cortes para imunohistoquímica indireta.

4.5.3 Cortes para epifluorescência

O material foi cortado em criostato com 5µm de espessura e fixado em solução de acetona (ACETONA P.A – Synth) a -4°C, em cubas de vidro ao abrigo da luz. Após a fixação, o material foi mantido à temperatura ambiente para secagem, sobre papel absorvente.

Depois de secas, as lâminas foram guardadas em caixas apropriadas e armazenadas no freezer à temperatura de -80°C (JIANG et al., 2002).

As lâminas foram submetidas à coloração de azul de Evans consistindo em imersão em PBS (2x) por 10 minutos cada, seguindo-se a lavagem em PBS (5 minutos) e imersão em solução de azul de Evans por 5 minutos. A fim de evitar-se excessiva coloração, as lâminas foram lavadas em água destilada por 10 minutos, e então montadas com lamínula. As lâminas foram analisadas ao microscópio semi-confocal Apotome Imager Z I (Carl Zeiss) de epifluorescência da marca Leica®.

4.5.4 Imunohistoquímica Indireta em cortes congelados

Para realizarmos a imunohistoquímica indireta foram eleitos 2 anticorpos primários: Ki67 (Dako) para avaliação do ciclo celular e Fator VIII policlonal rabbit (Dako) para avaliação de endotélio dos vasos e 2 anticorpos secundários: anti-mouse FITC (Sigma-Aldrich) e anti-rabbit FITC (Dako), além disso, foi realizada reação de imunoperoxidase para Fator VIII também para avaliação do endotélio dos vasos.

4.5.4.1 Imunohistoquímica indireta com Ki67 e Fator VIII policlonal rabbit

Inicialmente todas as lâminas foram retiradas do freezer -20°C e colocadas à temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida as mesmas foram lavadas com PBS por 3x com duração de 10 minutos cada, colocadas em solução de cloreto de

amônio (NH_4Cl – 50mM) e PBS por 30 minutos e depois repetiu-se o processo de 3 lavagem com PBS pelo mesmo tempo já citado.

Após o último banho com PBS, as lâminas foram permeabilizadas com Triton x 100 0,5% + PBS, por um período de 30 minutos e em seguida foram lavadas 3 vezes com PBS por 5 minutos cada lavagem.

A partir deste ponto, as lâminas já estavam prontas para passar pelo bloqueio de reação cruzada com o anticorpo secundário (em câmara úmida por 1 hora), de forma que para esse procedimento, foi colocada sobre cada lâmina uma solução composta por 5% de PBS-BSA, 0,5% de Triton x 100.

Ao final do processo de bloqueio de reação cruzada iniciou-se a incubação dos anticorpos primários, em câmara úmida – overnight, em geladeira, diluídos em PBS-BSA 3% e Triton 0,1%. Diluição dos anticorpos primários: Ki67 (1:50) e Fator VIII (1:50)

No dia seguinte a câmara úmida foi retirada da geladeira, deixada à temperatura ambiente por 15 minutos e em seguida as lâminas foram lavadas com PBS + Tween 0,2%, duas vezes, por 5 minutos cada lavagem de forma que posteriormente as mesmas foram incubadas com os anticorpos secundários por 1 hora e depois lavadas com 2 banhos de PBS por 5 minutos cada lavagem.

As lâminas foram contra-coradas com Azul de Evans (Evans Blau® 23860 – Neolab) a 0,005% por 5 minutos, depois elas foram lavadas com 2 banhos de água destilada por 5 minutos e montadas com lamínula com Vectashield®.

Preparação dos anticorpos secundários:

Os anticorpos secundários foram diluídos com PBS e centrifugados por 10 minutos pra realizar a sedimentação e tirar precipitados.

A solução foi colocada em outro ependorff, ao abrigo de luz, pois estes anticorpos são degradados com a luz, e lavada com PBS + Tween 0,2%, duas vezes por 5 minutos.

4.5.4.2 Imunoperoxidase para fator VIII

O início do processamento se dá da mesma forma que a explicada anteriormente para anticorpo primário, porém, o protocolo começa a diferenciar a partir do bloqueio de reação cruzada, no qual além de 5% de PBS-BSA, 0,5% de Triton x 100 acrescentamos 25% de soro normal de cabra (SNG) e o fator VIII (anticorpo primário).

Em seguida as lâminas foram lavadas com PBS com pH de 7,2 – 7,4 por 5 minutos e depois com água destilada, seguindo de inibição da peroxidase endógena com H_2O_2 a 3% em 100ml de metanol por 10 minutos.

Após, as lâminas foram incubadas com Kit Envision – HRP (Dako) por 1 hora - Dako LSAB (anticorpo secundário biotinilado estreptavidina) e Peroxidase por 1 hora seguindo-se a lavagem com PBS Tween 0,2% (pH de 7,2 – 7,4) em 2 banhos de 5 minutos cada e incubadas com a DAB (Dako) até a revelação, por 10 minutos, controlando ao microscópio.

Novamente realizou-se 2 banhos com PBS Tween 0,2% (pH de 7,2 – 7,4) por 5 minutos e outros 2 banhos de água destilada também por 5 minutos. Foi feita contra-coloração com Hematoxilina de Harris diluída (1:30) por 5 minutos, azulou com água corrente e diferenciou com água ácida (solução de HCL 0,5%).

Ao final, as lâminas foram desidratadas em soluções crescentes de etanol por 5 minutos, seguida de 3 banhos de xileno (Xilol® – Synth) por 10 minutos cada passagem e montadas com lamínula com Etelan® (Merck).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Felizmente, o número de óbitos durante a realização deste estudo foi de apenas 4 animais, sendo que 3 não resistiram ao processo de indução do infarto agudo do miocárdio, apresentando fibrilação transoperatória e foram à óbito, enquanto que 1 animal, durante o acesso à via transpericárdica, por não termos a devida experiência neste procedimento quanto a espessura e resistência do pericárdio, houve perfuração também do ápice cardíaco, atingindo profundamente o miocárdio, levando à fibrilação e óbito deste animal.

5.1 ANÁLISE MACROSCÓPICA

A análise macroscópica dos corações foi realizada após a abertura da cavidade torácica, não permitindo verificar alterações quanto ao tamanho do órgão. O pericárdio apresentava-se íntegro, livre da presença de derrame sanguíneo, nem mesmo na região utilizada para infusão das células mononucleares da medula óssea. Não foram constatadas aderência sobre a superfície cardíaca.

Os vasos da base apresentavam-se normais, bem como as artérias coronárias, exceto o ramo interventricular paraconal que apresentava-se ligeiramente empalidecido na região submetida a obstrução pelo cateter balão.

Foi observado que a cicatriz localizada na região crânio apical e latero apical, era mais evidente de acordo com o tempo pós infarto, mostrando um tecido definido de cicatrização com aspecto de fibroplasia na área de lesão. O animal com 24 horas pós obstrução do 1º ramo diagonal da artéria coronária interventricular, apresentou uma cicatriz menor que o animal com 3 dias, a qual por sua vez era menor que a cicatriz do animal com 7 dias e por fim, a cicatriz deste animal era menor que aquela encontrada no animal com 21 dias pós infarto. Neste último caso, foram acrescentados mais 2 animais com o mesmo tempo de infarto (21 dias). Os três animais apresentaram lesões muito semelhantes situadas na região crânio apical do ventrículo esquerdo (Figuras 17 A e 24).

5.2 MICROSCOPIA ÓPTICA DE LUZ

Histologicamente, os corações apresentaram alterações evidentes, independente do tempo de lesão. Foi possível observar um grande infiltrado de células inflamatórias mononucleares dispostas juntamente com o tecido conjuntivo formando tecido cicatricial, com deposição de tecido colágeno. Este variava de tamanho de acordo com o tempo de lesão, mediante presença exacerbada de fibroblastos.

Foi possível notar também, que as fibras cardíacas perderam seu formato original devido ao processo de remodelamento (Figura 17 B) e quanto maior o tempo de infarto, maior foi a deposição de colágeno, e a quantidade de células mononucleares nas áreas afetadas (Figura 18).

Figura 17 - Fotografia e fotomicrografia da região crânio apical do ventrículo esquerdo com área de isquemia (círculo) pós indução de infarto agudo do miocárdio Barra: 1cm (A). Fotomicrografia do coração de animal com 24 horas pós-infarto agudo do miocárdio(B). Observar área com processo inicial de remodelamento cardíaco com intenso infiltrado inflamatório mononuclear entremeadado ao tecido conjuntivo (❶). Coloração: Tricromo de Masson. Escala de Barra: 20 μ m

Figura 18 - Fotomicrografia do coração de animal com 3 dias pós-infarto agudo do miocárdio. (A, B e C) Observar maior deposição de colágeno e grande quantidade de células inflamatórias (❶), bem como degeneração das fibras (❷). Coloração: Tricromo de Masson. Escala de Barra: (A) 20 μ m, (B e C) 200 μ m

5.3- CRIOSCOPIA E IMUNOHISTOQUÍMICA

Os cortes congelados e marcados com Hoechst® (Sigma-Aldrich) nos animais infartados, revelaram que algumas células mononucleares da medula óssea se

infiltraram nas fibras do miocárdio, ou seja, que mesmo a infusão sendo transpericárdica, as células tiveram capacidade, provavelmente por quimiotaxia, de atravessar o epicárdio, e se instalar no miocárdio (Figuras 19-23). A marcação imunohistoquímica com Fator VIII de Von Willebrand (Figuras 19 e 20) e Ki67 (Figuras 21 e 22) identificam células endoteliais de vasos sanguíneos bem como a multiplicação celular.

Ao contrário do que imaginávamos, no grupo controle, as células mononucleares da medula óssea também saíram do espaço pericárdico e ganharam epicárdio e miocárdio, porém numa quantidade infinitamente menor, o que possivelmente é explicado pela falta de estímulo quimiotático, uma vez que os animais pertencentes à este grupo, não eram infartados.

Figura 19 - Identificação de reação positiva para fator VIII nas paredes de vasos sanguíneos (setas) da porção crânio basolateral (A e D); Reação positiva para marcação com Hoechst® (B e E) e Controle negativo para fator VIII (C e F). Animais com 21 dias (A-C) e 3 dias (D-F) pós terapia com infusão de células mononucleares da medula óssea pós infarto agudo do miocárdio. Barras: (A e B) 20 μ m e (C – F) 10 μ m. Coloração: Azul de Evans

Figura 20 - Identificação reação positiva para fator VIII nas paredes de vasos sanguíneos (setas) da porção crânio médio lateral (A e D); Reação positiva para marcação com Hoechst® (B e E) e Controle negativo para fator VIII (E e F). Animais com 24 horas (A-C) e 7 dias (D-F) pós terapia com infusão de células mononucleares da medula óssea pós infarto agudo do miocárdio. Barras 10μm. Coloração: Azul de Evans

Figura 21 - Identificação de reação positiva para Ki 67 (setas) da porção crânio apical (A e D); Reação positiva para marcação com Hoechst® (B e E) e Controle negativo para Ki 67 (C e F). Animais com 21 dias (A-C) e 3 dias (D-F) pós terapia com infusão de células mononucleares da medula óssea pós infarto agudo do miocárdio. Barras: (A e B) 20 μ m

Figura 22 - Identificação de reação positiva para Ki 67 (setas) da porção caudo médio medial (A e D); Reação positiva para marcação com Hoechst® (B e E) e Controle negativo para Ki 67 (C e F). Animais com 24 horas (A-C) e 7 dias (D-F) pós terapia com infusão de células mononucleares da medula óssea pós infarto agudo do miocárdio. Barras: (A -F) 10µm. Coloração: Azul de Evans

Figura 23 - Marcação positiva para Hoechst[®] mostrando que algumas células mononucleares da medula óssea foram capazes de sair da região do espaço pericárdico e invadir o epicárdio (seta) (A), miocárdio (setas) no espaço intersticial (B e D) e próximo à parede de vaso (seta) (C). Animais controles com 21 dias de infusão de células mononucleares da medula óssea, não induzidos à infarto agudo do miocárdio. Barras (A-C) 10µm e (D) 20µm. Coloração: Azul de Evans

Figura 24 - Marcção positiva para Hoechst® mostrando que algumas células mononucleares da medula óssea foram capazes de sair da região do espaço pericárdico e invadir miocárdio (setas) no espaço intersticial (A-C) e aglomerar-se ao redor de vasos (D) (setas). Animais com 21 dias de infusão de células mononucleares da medula óssea pós infarto agudo do miocárdio. Barras (A e C) 20μm e (B e D) 10 μm. Coloração: Azul de Evans

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Para a realização deste estudo, conforme descrito na metodologia, nós elegemos um método de coleta utilizado por Cerqueira et al. (2002), que se embasaram em gráfico de análise ecocardiográfica. Contudo, o mesmo é aplicado em humanos, que possuem posicionamento cardíaco diferente dos animais, o qual nestes, o coração faz um giro aproximadamente de 90°, de maneira que o ventrículo esquerdo fique posicionado cranialmente. Isso deixa claro que a nomenclatura do mapeamento cardíaco dos animais sofre então, grande mudança quando comparada ao do homem. Este fato nos mostrou que inicialmente, tínhamos que fazer uma adaptação do mapa utilizado pelos autores supra mencionados, pois do contrário, a descrição da distribuição das células infundidas, não seria real, ou seja, compatível com a topografia cardíaca. Assim, este novo mapa, da mesma forma que o original, tinha que seguir os mesmos preceitos: (1) manter consistência entre os conceitos anatômicos e dados *post mortem*; (2) manter, sempre que possível, aproximações entre a segmentação do miocárdio e a nomenclatura; (3) permitir localização precisa usando marcos anatômicos; (4) fornecer amostragem adequada do ventrículo esquerdo e distribuição coronária, sem exceder os limites de resolução de imagem ou relevância para o clínico, bem como nas aplicações em pesquisa; (5) permitir ligação entre os segmentos da topografia da arterial coronária e sua angiografia.

No que tange as vias de infusão de células mononucleares da medula óssea no coração, a via transpericárdica é algo que ainda não foi testado, pois este acesso só foi utilizado, até então, para administração de medicamentos (MANNAM et al., 2002; KOLETTIS et al., 2005) e para infusão de fatores de crescimento na tentativa de angiogênese miocárdica (KORNOWSKI et al., 2000). Por conseguinte, não existem dados comparativos de outros experimentos valendo-se desta via, o que nos levou a elaborar uma hipótese sobre a eficiência das três vias (intracoronariana, intramiocárdica (transendocárdica / transepicárdica) e retrógrada) já utilizadas pelos pesquisadores, para administração das células mononucleares da medula óssea.

Desta forma, a via transpericárdica, assim como a intracoronariana (SUZUKI et al., 2000; STRAUER; KORNOWISK, 2003; SAMOTO, 2006) revela uma distribuição de células no tecido cardíaco de forma generalizada e não focalizada como é o caso

da via transendocárdica. As células quando injetadas podem ser encontradas em todas as câmaras cardíacas, dispostas do epicárdio ao endocárdio, independente de haver ou não lesão isquêmica, porém, foi notada uma maior concentração celular nas áreas com presença de tecido cicatricial, formando as chamadas “colônias celulares” referidas por Suzuki et al. (2000). Já Hou et al. (2005) apresentam resultados um pouco diferentes, mostrando que as células infundidas pela via intracoronariana, ficam distribuídas não somente na parede antero-lateral, mas também são encontradas no ventrículo direito.

Da mesma forma que a via intracoronariana, e indo ao encontro dos achados de Samoto (2006) notamos que a via transpericárdica, como via de distribuição de células, tem importante relevância em patologias cardíacas causadas por obstruções (infarto). Sabe-se que a distribuição de sangue no coração não é homogênea, sendo que a área sub-endocárdica é a menos perfundida, devido ao gradiente de pressão que leva a compressão de seus vasos. Uma vez que as células se encontram nesta área, podem auxiliar na regeneração desta patologia diminuindo a área de infarto e/ou restringindo a área de remodelamento cardíaco. Isto ocorre devido aos seus efeitos sobre o tecido cicatricial, seja pela neoformação de vasos e/ou pela formação de cardiomiócitos.

Apesar de, aparentemente, a via intracoronariana e transpericárdica mostrarem uma similitude de distribuição celular, a primeira apresenta a formação de pequenos agrupamentos de células no local da infusão. Entretanto, uma maior quantidade de células no tecido cardíaco seria benéfica, pois levaria provavelmente, a uma maior formação de vasos e de cardiomiócitos. Por outro lado, um acúmulo de células poderia interferir na diferenciação das mesmas, uma vez que, este fenômeno celular é influenciado pelo microambiente, citocinas e pela interação “célula nativa e célula transplantada”.

A via transcoronariana, não é inconveniente tampouco resulta na indução de arritmias, sendo bastante segura (TIMMERMANS et al., 2003). O mesmo podemos concluir sobre a via transpericárdica, mas é importante destacar que Vulliet et al., (2004), pós infusão de células-tronco pela via intracoronariana em cães, registrou a presença de microinfartos no tecido cardíaco, fato este imputado ao diâmetro das células-tronco (20µm) em relação aos microvasos cardíacos.

A via transendocárdica, parece ser mais vantajosa, podendo ser utilizada em processos denominados de infartos intramurais ou sub-epicárdicos. Este fato

respalda-se nas observações de Samoto (2006), já que no cão há uma maior quantidade de células no epicárdio, além de que, os nichos de células em interstício celular podem favorecer o restabelecimento do tecido lesionado, apesar de haver uma acentuada quantidade de células também dispostas no endocárdio.

O maior número de células aderidas pela via transendocárdica em relação às vias intracoronariana e retrógrada pode ser explicado devido à entrega seletiva de células que esta via promove, fato que não ocorre com a utilização da via transpericárdica. Nesta as células ficam distribuídas não somente nas quatro câmaras cardíacas, como também por toda estratigrafia do órgão a partir do 21º dia de infusão. Como foi demonstrado em nosso experimento piloto, antes deste período, a distribuição celular não é disposta de maneira uniforme pelas camadas que compõem o coração.

Há também restrições para a realização de infusão pela via transendocárdica, pois, quando ocorre à penetração da agulha no miocárdio, esta interfere na condução do estímulo cardíaco, ou seja, ocorre hiperestimulação. Este fenômeno em particular pode resultar em extra-sístoles, ou em casos mais graves fibrilação cardíaca, como relata Strauer e Kornowski (2000) e Fuchs et al. (2003). Não nos deparamos, entretanto com este problema durante a utilização da via transpericárdica. É importante ressaltar que a agulha utilizada para infusão em nosso experimento transpassa apenas a porção apical do saco pericárdico, não tocando no tecido cardíaco propriamente dito.

A via retrógrada por seio venoso promove uma relativa aderência de células mononucleares em tecido cardíaco. Isto pode ocorrer devido à interferência na passagem das células pela parede das veias. As células que permanecem no espaço intravascular não sobrevivem. Além disso, o efeito de primeira passagem pela circulação pulmonar também pode desfavorecer o processo (STRAUER;KORNOWSKI, 2003). Este fato que não ocorreu com a utilização da via transpericárdica, tendo em vista que as células mononucleares da medula óssea que foram infundidas, não foram desviadas de início para outros órgãos, pois sua primeira passagem foi obrigatoriamente o próprio coração.

Embora Suzuki et al. (2000) relataram a presença de células-tronco somente na parede do ventrículo esquerdo, Samoto (2006) observou a presença da mesma tanto no ventrículo direito quanto no septo cardíaco dos cães, fato notado também em nosso estudo, embora tivéssemos optado pela a via transpericárdica. Os

mesmos autores relatam ainda, a presença de células no espaço extracelular, no chamado interstício celular, como observado nesta pesquisa. Contudo, devemos salientar que em casos de doença coronariana, esta via tem grande importância, como uma alternativa para infusão de células, diminuindo a área de lesão.

CONCLUSIONS

7 CONCLUSÕES

Com relação à via transpericárdica para infusão de células mononucleares coletadas da medula óssea de suínos, concluímos que:

1. Sugerimos que apenas pessoas habilitadas para o procedimento de pulsão cardíaca devam acessar a via transpericárdica, evitando com isso problemas de perfuração do coração seguido de óbito.
2. Para o acesso à via transpericárdica, a partir da região mediana pré-umbilical é fundamental que este procedimento seja guiado por algum sistema de imagem, seja ecocardiográfica ou através de fluoroscopia.
3. É dispensável a utilização de equipamentos mais sofisticados, tais como (NOGA) utilizado na via transendocárdica, para a realização do mapeamento das câmaras cardíacas, localização da área infartada, e, conseqüentemente, localização da região de infusão de células, uma vez que pela via transpericárdica, estas são lançadas no espaço pericárdico.
4. Ao contrário das vias de infusão de células-tronco já estudadas, a via transpericárdica revela que uma vez infundidas, as células migram transmuralmente invadindo toda a estratigrafia cardíaca, aumentando o favorecimento do tecido lesado com processos de neovascularização.
5. Animais infartados, e com 24 horas, três e sete dias pós infusão das células mononucleares da medula óssea marcadas, apresentaram distribuição celular diferente no tecido cardíaco, pois quanto menor o tempo pós infusão, menor a quantidade destas células no miocárdio e endocárdio, ao passo que os animais que permaneceram vivos por 21 dias após o transplante de células, estas estavam homogeneamente distribuídas na estratigrafia cardíaca.
6. Tanto os animais infartados quanto aos não infartados apresentaram distribuição celular nas quatro câmaras cardíacas, porém os corações infartados revelaram uma maior deposição celular nas áreas cicatriciais, provavelmente devido ao processo quimiotático.
7. Mediante os resultados encontrados, observou-se que a via transpericárdica pode ser utilizada como método alternativo para infusão de células-tronco em

processos de isquemia cardíaca, porém, ainda assim, não é melhor que a via intracoronariana (mais utilizada), uma vez que o paciente infartado, ao ser atendido no hospital, é cateterizado estabelecendo-se uma via de acesso cardíaco.

Perspectivas Futuras

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

Nosso estudo mostra claramente através dos achados microscópicos, que a utilização da via transpericárdica para infusão de células mononucleares de medula óssea, revela uma distribuição celular por todo o tecido cardíaco, ocupando as 4 câmaras do coração. Isso nos permite fazer alguns questionamentos: Seria possível que a utilização desta via fosse mais indicada em pacientes com processos de cardiomiopatia dilatada como, por exemplo, a doença de Chagas? A via transpericárdica oferece mais segurança que as outras vias já estudadas? Seria a via transpericárdica uma boa substituta da via intracoronariana que é mais utilizada?

Quanto à doença de Chagas, esta manifesta sintomatologia cardíaca na fase crônica da doença, com caráter fibrosante, e combinação com distúrbios da condução de estímulo atrioventricular e intraventricular, bem como grande incidência de morte súbita e fenômenos tromboembólicos, assim como de aneurismas ventriculares. Sendo esta patologia uma importante forma de miocardite, o que seguramente gera uma grande sinalização celular generalizada, por conta do processo de quimiotaxia, e não focal como é o caso dos processos isquêmicos, seria possível a utilização da via transpericárdica, porém isso requer estudos experimentais em animais chagásicos.

No que tange à segurança da via transpericárdica, ela não é uma das mais seguras quando comparada com a via transendocárdica, retrógrada e principalmente a intracoronariana, pois requer muita precisão no momento da perfuração do pericárdio, sendo necessário profissional bem treinado na realização de manobras de punção cardíaca, para evitar acidentes de perfuração de miocárdio, além disso, é importante ressaltar que um paciente com diagnóstico de isquemia cardíaca, ao ser hospitalizado, o mesmo será cateterizado, logo é mais fácil aproveitar o momento da utilização da via intracoronariana para, por exemplo, realizar infusão celular, do que acessar uma nova via, principalmente sendo a transpericárdica, assim, esta via por nós estudada, não se enquadra como uma via substituta da via intracoronariana.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, D.; GIORDANO, F. J. "Stem cells" and cardiovascular disease. **Journal Nuclear Cardiology**, EUA, v. 10, p. 403-412, Ago. 2003.

ALIOTTA, J. M.; PASSERO, M.; MEHARG, J.; KLINGER, J.; DOONER, M. S.; PIMENTEL, J.; QUESENBERRY, P. J. Stem cell and pulmonary metamorphosis: New concepts in repair and regeneration. **Journal of Cellular Physiology**, v. 204, p. 725-741, Mar. 2005.

AL-KHALDI, A.; AL-SABTI, H.; GALIPEAU, J.; LACHAPELLE, K. Therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow stromal cells: improved blood flow in a chronic limb ischemia model. **Annals of Thoracic Surgery**, v. 75, p. 204-209, Ago. 2003.

ANDERSON, D. J.; GAGE, F. H.; WEISSMAN, I. L. Can "stem cells" cross lineage boundaries? **Nature Medicine**, v. 7, p. 393-395, Abr. 2001.

ASAHARA, T.; ISNER, J. M. Endothelial progenitor cells for vascular regeneration. **Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research**, v. 11, p. 171-178, Ago. 2002.

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

ASSMUS, B.; SCHÄCHINGER, V.; TEUPE, C.; BRITTEN, M.; LEHMANN, R.; DÖBERT, N.; GRÜNWALD, F.; HONOLD, J.; ABOLMAALI, N. D.; VOGL, T. J.; HOFMANN, W. K.; MARTIN, H.; DIMMELER, S.; ZEIHNER, A. M. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). **Circulation**, v. 106, n. 24, p. 3009, Out. 2002.

BARBASH, I. M.; CHOURAQUI, P.; BARON, J.; FEINBERG, M. S.; ETZION, S.; TESSONE, A.; MILLER, L.; GUETTA, E.; ZIPORI, D.; KEDES, L. H.; KLONER, R. A.;

LEOR, J. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal “stem cells” to the infarcted myocardium. **Circulation**, v. 108, p. 863-868, Ago. 2003.

BAYS-GENIS, A.; SALIDO, M.; SOLE RISTOL, F.; PUIG, M.; BROSSA, V.; CAMPRECIÓS, M.; COROMINAS, J. M.; MARIÑOSO, M. L.; BARÓ, T.; VELA, M. C.; SERRANO, S.; PADRÓ, J. M.; BAYES DE LUNA, A.; CINCA, J. Host cell-derived cardiomyocytes in sex-mismatch cardiac allografts. **Cardiovascular Research**, n. 56, p. 404-410, Dez. 2002.

BELTRAMI, A. P.; URBANEK, K.; KAJSTURA, J.; SHAO-MIN, Y.; FINATTO, N.; BUSSANI, R.; NADAL-GINARD, B.; SILVESTRI, F.; LERI, A.; BELTRAMI, C. A.; ANVERSA, P. Evidence that human cardiac myocytes device after myocardial infarction. **New England Journal of Medicine**, v. 23, n. 344, p.1750-1757, Jun. 2001.

BOCCHI, E. A.; ISSA, V. S. Transplante celular para o tratamento de pacientes com insuficiência cardíaca. **Revista da Sociedade de Cardiologia de Estado de São Paulo**, n. 13, p. 427-433, Abr. 2003.

BROFMAN, P. R.; CARVALHO, K. A.; GUARITA-SOUZA, L. C.; REBELATTO, C.; HANSEN, P.; SENEGAGLIA, A. C.; MYAGUE, N.; FURUTA, M.; FRANCISCO, J. C.; OLANDOSKI, M. Transplante celular: análise funcional, imunocitoquímica e histopatológica em modelo experimental de miocardiopatia isquêmica utilizando diferentes células. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, v. 3, n.19, p. 261-266, Set. 2004.

CAPLICE, N. M.; GERSH, B. J. Stem cell to repair the heart: a clinical perspective. **Circulation**, v. 92, n. 1, p. 92-96, Set. 2003.

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

CARMELET, P.; LUTTUN, A. The emerging role of the bone marrow-derived “stem cells” in (therapeutic) angiogenesis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, n. 86, p. 289-297, 2001.

CERQUEIRA, M. D.; WEISSMAN, N. J.; DILSIZIAN, V.; JACOBS, A. K.; KAUL, S.; LASKEY, W. K.; PENNELL, D. J.; RUMBERGER, J. A.; RYAN, T.; VERANI, M. S. Standardized Myocardial Segmentation and Nomenclature for Tomographic Imaging of the Heart. **Circulation**, n. 105, p. 539-542, Set. 2002.

CROW, E. S.; WALSHAW, S. O. Colocação e cuidados com cateteres intravenosos. In: _____. **Manual de procedimentos clínicos em cães, gatos e coelhos**. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000. p. 47-64.

DEB, A.; WANG, S.; SKELDING, K. A.; MILLER, D.; SIMPER, D.; CAPLICE, N. M. Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart: A study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients. **Circulation**, n. 107, p. 1247-1249. Fev. 2003.

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

FUCHS, S.; BAFFOUR, R.; ZHOU, Y. F.; SHOU, M.; PIERRE, A.; TIO, F. O.; WEISSMAN, N. J.; LEON, M. B.; EPSTEIN, S. E.; KORNOWSKI, R. Transendocardial delivery of autologous bone marrow enhances collateral perfusion and regional function in pigs with chronic experimental myocardial ischemia. **Journal of American College of Cardiology**, n. 37, p. 1726-1732, Jan. 2001.

FUKUDA, K. Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal “stem cells” for cardiovascular tissue engineering. **International journal of Artificial Organs**, n. 25, p.187-193. 2001.

GLASER, R.; LU, M. M.; NARULA, N. EPSTEIN, J. A. Smooth muscle cells, but not myocytes, of host origin in transplant human hearts. **Circulation**, n. 106, p. 17-19, Jun. 2002.

GRAF, T. Differentiation plasticity of hematopoietic cells. **Blood**, n. 99, p. 3089-3101, Maio 2002.

HASSINK, R. J.; BRUTEL DE LA RIVIERE, A.; MUMMERY, C. L.; DOEVENDANS, P. A. Transplantation of Cells for Cardiac Repair. **Journal of American College Cardiology**, v. 41, n. 5, p. 711-717, Nov. 2003a.

HASSINK, R. J.; DOWELL, J. D.; DE LA RIVIÈRE, A.B.; DOEVENDANS, P. A.; FIELD, L. J. Stem cell therapy for ischemic heart disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 9, n. 10, p. 436-441, Out. 2003b.

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

HEESCHEN, C.; LEHMANN, R.; HONOLD, J.; ASSMUS, B.; AICHER, A.; WALTER, D. H.; MARTIN, H.; ZEIHNER, A. M.; DIMMELER, S. Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease. **Circulation**, n. 109, p. 1615-1622, Jan. 2004.

HERZOG, E. L.; CHAI, L.; KRAUSE, D. S. Plasticity of marrow-derived "stem cells". **Blood**, n. 102, p. 3483-3493, Nov. 2003.

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

HOU, D.; YOUSSEF, E. A.; BRINTON, T. J.; ZHANG, P.; ROGERS, P.; PRINCE, E. T.; YEUNG, A. C.; JOHNSTONE, B. H.; YOCK, P. G.; MARCH, K. L. Radiolabeled cell distribution after intramyocardial, intracoronary, and interstitial retrograde coronary venous delivery – Implications for current clinical trials. **Circulation**, v. 112, n. 1, p. 150 -156, Jul. 2005.

JACKSON, K. A.; MAJKA, S. M.; WANG, H.; Pocius, J.; Hartley, C. J.; Majesky, M. W.; Entman, M. L.; Michael, L. H.; Hirschi, K. K.; Goodell, M. A. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult “stem cells”. **Journal of Clinical Invest**, n. 107, p. 1395-1402, Mar. 2001.

KAJSTURA, J.; LERI, A.; FINATO, N.; DI LORETO, C.; BELTRAMI, C. A.; ANVERSA, P. Myocytes proliferation in end-stage cardiac failure in human. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, n. 95, p. 8801-8805, Mai. 1998.

KALKA, C.; ASAHARA, T.; KRONE, W.; ISNER, J. M. Angiogenesis and vasculogenesis. Therapeutic strategies for stimulation of postnatal neovascularization. **Herz**, n. 25, p. 611-622, Jan. 2000.

KAWADA, H.; OGAWA, M. Bone marrow origin of hematopoietic progenitors and “stem cells” in murine muscle. **Blood**, n. 98, p. 2008-2013, Ago. 2001.

KAWAMOTO, A.; TKEBUCHAVA, T.; YAMAGUCHI, J-I.; NISHIMURA, H.; YOON, Y. S.; MILLIKEN, C.; UCHIDA, S.; MASUO, O.; IWAGURO, H.; MA, H.; HANLEY, A.; SILVER, M.; KEARNEY, M.; LOSORDO, D. W.; ISNER, J. M.; ASAHARA, T. Intramiocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. **Circulation**, n. 107, p. 461-468, Set. 2003.

KOC, O.; LAZARUS, H. Mesenchymal “stem cells”: heading into the clinic. **Bone Marrow Transplant**, n. 27, p. 235-239, Mar. 2001.

KOCHER, A.; SCHUSTER, M.; SZABOLCS, M.; TAKUMA, S.; BURKHOF, D.; WANG, J.; HOMMA, S.; EDWARDS, N. M.; ITESCU, S. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioplasty prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. **Nature Medicine**, n. 7, p. 430-436, Jan. 2001.

KOLETTIS, T. M.; KAZAKOS, N.; KATSOURAS, C. S.; NIOKOU, D.; PAPPA, L.; KOULOURAS, V.; STEFANO, P.; SEFERIADIS, C.; MALAMOU-MITSI, V.; MICHALIS, L. K.; MARSELOS, M.; SIDERIS, D. A. Intrapericardial drug delivery: pharmacologic properties and long-term safety in swine. **International Journal of Cardiology**, n. 99, p. 415–421, Jul. 2005.

KORNOWSKI, R.; FUCHS, S.; LEON, M. B.; EPSTEIN, S. E. Delivery strategies to achieve therapeutic myocardial angiogenesis. **Circulation**, n. 101, p. 454-458, Nov. 2000.

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

LAFLAMME, M. A.; MYERSON, D.; SAFFITZ, J. E.; MURRY, C. E. Evidence for cardiomyocytes repopulation by extracardiac progenitors in transplanted human hearts. **Circulation Research**, n. 90, p. 634-640, May. 2002.

LI, R. K.; JIA, Z. Q.; WEISEL, R. D.; MERANTE, F.; MICKLE, D. A. Smooth muscle cell transplantation into myocardial scar tissue improves heart function. **Journal of Molecular Cells of Cardiology**, v. 31, n. 3, p. 513-522, Mar. 1999.

MAKINO, S.; FUKUDA, K.; MIYOSHI, S.; KONISHI, F.; KODAMA, H.; PAN, J.; SANO, M.; TAKAHASHI, T.; HORI, S.; ABE, H.; HATA, J.; UMEZAWA, A.; OGAWA, S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. **Journal of Clinical Investigation**, n. 103, p. 697-705, Aug. 1999.

MALOUF, N.; COLEMAN, W.; GRISHAM, J.; LININGER, R. A.; MADDEN, V. J.; SPROUL, M.; ANDERSON, P. A. Adult-derived “stem cells” from the liver become

myocytes in the Herat *in vivo*. **American Journal Pathology**, n. 158, p. 1929-1935, Mar. 2001.

MANNAM, A. P.; KALON, K. K.; HO.; CULTIP, D. E.; CARROZZA, J. P.; COHEN, D. J.; LORELL, B. H.; LAHAM, R. J. Safety of Subxyphoid Pericardial Access Using a Blunt-Tip Needle. **American Journal of Cardiology**, v. 89, p. 891-893, Abr. 2002.

MENASCHÉ, P.; HAGEGE, A. A. SCORSIN, M.; POUZET, B.; DESNOS, M.; DUBOC, D.; Schwartz, K.; Vilquin, J.; Marolleau, J. Myoblast transplantation for heart failure. **Lancet**, v. 357, p. 279-280, Jan. 2001.

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

MULLER, P.; PFEIFFER, P.; KOGLIN, J.; SCHAFERS, H. J.; SEELAND, U.; JANZEN, I.; URBSCHAT, S.; BOHM, M. Cardiomyocytes of noncardiac origin in myocardial biopsies of human transplanted hearts. **Circulation**, n. 106, p. 31-355. Maio, 2002.

MURAD-NETTO, S.; MOURA, R.; ROMEO, L. J. M.; NETO, A. M.; DUARTE, N.; BARRTO, F.; JENSEN, A.; VIÑA, R. F.; VRASLOVIK, F.; OBERDAN, A.; BENETTI, F.; SASLAVSKY, J.; VIÑA, M. F.; AMINO, J. G. Relato de caso: terapia de células-tronco no infarto agudo do miocárdico, através de perfusão coronariana retrógrada. Uma nova técnica. **Arquivos Brasileiro de Cardiologia**, v. 84, n. 4, p. 349-351, Maio, 2004.

NIR, S. G.; DAVID, R.; ZARUBA, M.; FRANZ, W. M.; ITSKOVITZ-ELDOR, J. Human embryonic stem cells for cardiovascular repair. **Cardiovascular Research**, v. 58, n. 2, p. 313-323, Maio, 2003.

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

ORLIC, D. The strength of plasticity: stem cells for cardiac repair. **International Journal of Cardiology**, v. 95, p. S16-S19, Jun. 2004. (Supplement 1).

OZBARAN, M.; OMAY, S. B.; NALBANTGIL, S.; KULTURSAY, H.; KUMANLIOGLU, K.; NART, D.; PEKTOK, E. Autologous peripheral stem cell transplantation in patients with congestive heart failure due to ischemic heart disease. **European Journal of Cardiothoracic Surgery**, n. 25, p. 342-350, Ago. 2004.

PEREIRA, R.; O'HARA, M.; LAPTEV, A.; HALFORD, K. W.; POLLARD, M. D.; CLASS, R.; SIMON, D.; LIVEZEY, K.; PROCKOP, D. J. Marrow stromal cells, a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, n. 95, p. 1142-1147, Feb. 1998.

PERIN, E. C.; DOHMANN, H. F. R.; BOROJEVIC, R.; SILVA, S. A.; SOUSA, A. L.; SILVA, G. V.; MESQUITA, C. T.; BELEM, L.; VAUGHN, W. K.; RANGEL, F. O.; ASSAD, J. A.; CARVALHO, A. C.; BRANCO, R. V.; ROSSI, M. I.; DOHMANN, H. J.; WILLERSON, J. T. Improved exercise capacity and ischemia 6 and 12 months after transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic cardiomyopathy. **Circulation**, v. 110, n. 110, p. 213-218, Sep. 2004.

PERIN, E. C.; DOHMANN, H. F. R.; BOROJEVIC, R.; SILVA, S. A.; SOUSA, A. L.; MESQUITA, C. T.; ROSSI, M. I.; CARVALHO, A. C.; DUTRA, H. S.; DOHMANN, H. J.; SILVA, G. V.; BELEM, L.; VIVACQUA, R.; RANGEL, F. O.; ESPORCATTE, R.; GENG, Y. J.; VAUGHN, W. K.; ASSAD, J. A.; MESQUITA, C. T.; WILLERSON, J. T. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic heart failure. **Circulation**, n. 107, p. 2294-302, Abr. 2003.

POULSON, R.; ALISON, M. R.; FORBES, S. J.; WRIGHT, N. A. Adult stem cell plasticity. **Journal of Pathology**, v. 197, p. 441-456, Jul. 2002.

POUZET, B.; GHOSTINES, S.; ALLATAR, N. Long-term functional results of autologous skeletal myoblast transplantation in rats. **Circulation**, n. 104, p. 599, Jan. 2001.

QUAINI, F.; URBANEK, K.; BELTRAMI, A. P.; FINATO, N.; BELTRAMI, C. A.; NADAL-GINARD, B.; KAJSTURA, J.; LERI, A.; ANVERSA, P. Chimerism of the transplanted heart. **The New England Journal of Medicine**, n. 346, p. 5-15, Jan. 2002.

REN, G.; MICHAEL, L. H.; ENTMAN, M. L.; FRANGOGIANNIS, N. G. Morphological characteristics of the microvasculature in healing myocardial infarcts. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, n. 50, p. 71-79, Jan. 2002.

SAMOTO, V. Y. **Terapia celular cardíaca: vias de infusão de célula mononucleares em cães SRD**. 2006. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

SAMOTO, V. Y.; BRANCO, E. B.; FERREIRA, G. J. B.; CABRAL, R. M.; GREGORES, G. B.; MIGLINO, M. A.; SOUSA, A. L. S.; FOHMANN, H. F.; BOBOJEVIC, R.; TAKIYA, C.; ROSSI, I. D. Mononuclear stem cell infusion by retrograde route in mongrel dogs. Abstract Book. Simpósio Internacional de Terapias Avançadas 2005. In XXX Reunião da Sociedade Brasileira de Biofísica, Rio de Janeiro [Anais **XXX Reunião da Sociedade Brasileira de Biofísica**], SBB, 2005. p. 45.

SARMENTO-LEITE, R.; DOHMANN, H. F. Uso das células- tronco aplicado à cardiologia. **Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul**, Ano XIII, nº 03. 2004.

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

STAMM, C.; WESTPHAL, B.; KLEINE, H. D.; PETZSCH, M.; KITTNER, C.; KLINGE, H.; SCHUMICHEN, C.; NIENABER, C. A.; FREUND, M.; STEINHOFF, G. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. **The Lancet**, n. 361, p. 45-456, Nov. 2003.

STRAUER, B. E.; BREHM, M.; ZEUS, T.; GATTERMANN, N.; HERNANDEZ, A.; SORG, R. V.; KÖGLER, G.; WERNET, P. Intracoronary, human autologous stem cell transplantation for myocardial regeneration following myocardial infarction. **Deutsche Medizinische Wochenschrift**, v. 126, n. 34-35, p. 932-938, Set. 2001a.

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

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

SUZUKI, K.; BRAND, N. J.; SMOLENSKI, R. T.; JAYAKUMAR, J.; MURTUZA, B.; YACOB, M. H. Development of a novel method for cell transplantation through the coronary artery. **Circulation**, v. 102, p. 359-364, Out. 2000. (Supplement 3).

SUSSMAN, M. Cardiovascular biology. Hearts and Bones. **Nature**, n. 410, p. 640-641. Jan. 2001.

TATEISHI-YUYAMA, E.; MATSUBARA, H.; MUROHARA, T.; IKEDA, U.; SHINTANI, S.; MASAKI, H.; AMANO, K.; KISHIMOTO, Y.; YOSHIMOTO, K.; AKASHI, H.; SHIMADA, K.; IWASAKA, T.; IMAIZUMI, T. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone marrow cells: a pilot study and a randomized controlled trial. **The Lancet**, n. 360, p. 427-435, Jul. 2002.

TIMMERMANS, F.; DE SUTTER, J.; GILLEBERT, T. C. Stem cell for the heart. Are we there yet? **Cardiology**, n. 100, p. 176-185, Nov. 2003.

TOLOSA, E. M. C.; RODRIGUES, C. J.; BEHMER, O. A.; FREITAS-NETO, A. G.
Manual de técnicas para histologia normal e patológica. 2. ed. São Paulo:
 Manole, 2003. p. 331.

TOMA, C.; PITTENGER, M. F.; CAHILL, K. S.; BYRNE, B. J.; KESSLER, P. D.
 Human mesenchymal “stem cells” differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the
 adult murine heart. **Circulation**, n.105, p. 93-98, Abr. 2002.

TOMITA, S.; LI, R.; WEISEL. R. D.; MICKLE, D. A.; KIM, E. J.; SAKAI, T.; JIA, Z. Q.
 Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged Herat function.
Circulation, n.100, p. 11247-11256, Dez. 1999.

TOMITA, S.; MICKLE, D. A.; WEISEL. R. D.; JIA, Z. Q.; TUMIATI, L. C.; ALLIDINA,
 Y.; LIU, P.; LI, R. K. Improved Herat function with myogenesis and angiogenesis after
 autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation. **Journal of Thorac-
 Cardiovascular Surgery**, n. 107, p. 1247-1249, Ago. 2002.

TSE, H. F.; KWONG, Y. L.; LO, G.; HO, C. L.; LAU, C. P. Angiogenesis in ischemic
 myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell
 implantation. **The Lancet**, n. 361, p. 47-49, Jul. 2003.

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

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

WILMUT, I.; SCHINIEKE, A. E.; McWHIR, J.; KIND, A. J.; CAMPBEL, K. H. Viable
 offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, n. 385, p. 810-813,
 Nov. 1997.

WOLLERT, K. C.; MEYER, G. P.; LOTZ, J.; RINGES-LICHTENBERG, S.; LIPPOLT,
 P.; BREIDENBACH, C.; FICHTNER, S.; KORTE, T.; HORNIG, B.; MESSINGER, D.;

ARSENIEV, L.; HERTENSTEIN, B.; GANSER, A.; DEXLER, H. Intracoronary autologous bone-marrow cells transfer after myocardial infarction: the boost randomised controlled clinical trial. **The Lancet** v. 364, n. 9429, p. 141-148, Abr. 2004

WU, A. H.; PARSONS, L.; EVERY, N. R.; BATES, E. R. Hospital outcomes in patients presenting with congestive heart failure complicating acute myocardial infarction: a report from the Second National Registry of Myocardial Infarction (NRMII-2). **Journal of American College of Cardiology**, n. 40, p. 1389-1394, Maio. 2002.

ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. **Células tronco, a nova fronteira de medicina**. Ed. Atheneu, 2006. p. 3-4.