
**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA**

Tese de Doutorado

**EFEITO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS NA
MODULAÇÃO AUTONÔMICA CARDÍACA E NA SENSIBILIDADE
DO BARORREFLEXO EM RATOS COM INSUFICIÊNCIA
CARDÍACA**

Sharon Del Bem Velloso de Moraes

Ribeirão Preto

2015

SHARON DEL BEM VELLOSO DE MORAIS

**EFEITO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS NA
MODULAÇÃO AUTONÔMICA CARDÍACA E NA SENSIBILIDADE
DO BARORREFLEXO EM RATOS COM INSUFICIÊNCIA
CARDÍACA**

Tese apresentada ao Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, como parte das exigências para obtenção do grau de Doutor em Ciências

Área de concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Helio Cesar Salgado

Ribeirão Preto

2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO – USP
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA

Morais, Sharon Del Bem Velloso de

Efeito das células-tronco mesenquimais na modulação autonômica cardíaca e na sensibilidade do barorreflexo em ratos com insuficiência cardíaca / Sharon Del Bem Velloso de Moraes; orientador: Prof. Dr. Helio Cesar Salgado - Ribeirão Preto, 2015.

198 p. : il.; 30 cm

Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, 2015

1. Célula-tronco Mesenquimal. 2. Insuficiência Cardíaca 3. Variabilidade da Frequência Cardíaca. 4. Barorreflexo. 5. Tono Autonômico Cardíaco.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aluna: Sharon Del Bem Velloso de Morais

Título: Efeito das células-tronco mesenquimais na modulação autonômica cardíaca e na sensibilidade do barorreflexo em ratos com insuficiência cardíaca.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências – área de concentração em Fisiologia.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora:

Profa. Dra.: Luciana Venturini Rossoni

Instituição: Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Assinatura: _____

Prof. Dr.: Valdo José Dias da Silva

Instituição: Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Assinatura: _____

Profa. Dra.: Kelen Cristina Ribeiro Malmegrim de Farias

Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP

Assinatura: _____

Prof. Dr.: André Schmidt

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

Assinatura: _____

Prof. Dr.: Helio Cesar Salgado (**orientador**)

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

Assinatura: _____

"DEUS"

*O Universo é obra inteligentíssima:
obra que transcende a mais genial inteligência humana.
E como todo efeito inteligente tem uma causa inteligente,
é forçoso inferir que a do Universo é superior a toda inteligência:
É a inteligência das inteligências;
A causa das causas;
A lei das leis;
O princípio dos princípios;
A razão das razões;
A consciência das consciências;
É Deus.
Deus!
Nome mil vezes santo, que Newton jamais pronunciava sem se
descobrir!
Deus!
Vós que vos revelais pela natureza,
Vossa filha e nossa mãe,
reconheço-vos eu, Senhor,
Na poesia da criação; na criança que sorri;
No ancião que tropeça; no mendigo que implora;
Na mão que assiste; na mãe que vela;
No pai que instrui; no apóstolo que evangeliza;
Reconheço-vos eu, Senhor, no amor da esposa,
No afeto do filho; na estima da irmã;
Na justiça do justo; na misericórdia do indulgente;
Na fé do pio; na esperança dos povos;
Na caridade dos bons; na inteireza dos íntegros;
Deus!
Reconheço-vos eu, Senhor,
No estro do vate; na eloquência do orador;
Na inspiração do artista; na santidade do moralista;
Na sabedoria do filósofo; nos fogos do gênio!
Deus!
Reconheço-vos eu, Senhor,
Na flor dos vergeis; na relva dos vales;
No matiz dos campos; na brisa dos prados;
No perfume das campinas; no murmúrio das fontes;
No rumorejo das franças; na música dos bosques;
Na placidez dos lagos; na altivez dos montes;
Na amplidão dos oceanos; na majestade do firmamento!
Deus!
Reconheço-vos eu, Senhor,
Nos lindos antélios; no iris multicolor;
Nas auroras polares; no argênteo da lua;
No brilho do sol; na fulgência das estrelas;
No fulgor das constelações!
Deus!
Reconheço-vos eu, Senhor,
Na formação das nebulosas; na origem dos mundos;
Na gênese dos sóis; no berço das humanidades;
Na maravilha, no esplendor, no sublime infinito!
Deus!
Reconheço-vos eu, Senhor,
com Jesus, quando ora:
"PAI NOSSO QUE ESTAIS NOS CÉUS"...
Ou com os anjos, quando cantam:
"GLÓRIA A DEUS NAS ALTURAS"..."*

Eurípedes Barsanulfo (1880-1918)

Com todo o meu amor, à minha família.

AGRADECIMENTOS

- ❖ À minha família, pelo amor incondicional, apoio irrestrito, paciência e compreensão em todos os momentos;
- ❖ Ao Gustavo Guidetti, pelo apoio, incentivo e compreensão; que me deu forças em vários momentos e me ajudou muito nesta conquista;
- ❖ Ao Professor Helio Cesar Salgado, pela orientação e por acreditar no meu trabalho, permitindo que eu iniciasse uma nova linha de pesquisa no laboratório;
- ❖ Ao Professor Rubens, pelo apoio e, também, supervisão;
- ❖ À Christiane Becari, que me apoiou, aconselhou e abriu caminhos;
- ❖ Aos meus queridos amigos: pessoais, do laboratório (Luiz, Daniel, Geisa, Renata, César, Fábio, Fernandinha, Gean, Pedro, Sarai, Fernanda, Paloma), da USP, UWO e *Robarts Research Institute*, agradeço pelo carinho e pelos momentos juntos, sempre bom estar com vocês;
- ❖ Ao Luciano Fonseca e Eduardo Carvalho, pela amizade, dedicação e colaboração nos experimentos realizados na Medicina Nuclear do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto.
- ❖ Aos técnicos do laboratório, do Departamento de Fisiologia e da USP, pelo apoio, colaborações e amizade. Em especial, ao Carlos Alberto A. Silva, que contribuiu de forma importante nos experimentos, e ao Rubens Melo, pelo processamento histológico das lâminas;
- ❖ À Secretaria e funcionários do Departamento de Fisiologia e da USP, pela assistência;
- ❖ Aos Professores Marco Prado, Vânia Prado e Robert Gros por me receberem em seus laboratórios e pela excelente oportunidade de aprendizagem, não só científica, mas também, pela experiência de vida ao morar em outro país maravilhoso, o Canadá. Muito obrigada por tudo;
- ❖ Ao Professor Valdo, fonte eterna de inspiração e paixão pela ciência;
- ❖ Ao Professor Lindolfo da Silva Meirelles, por ser colaborador deste trabalho, sempre disposto a ajudar e pela amizade;
- ❖ Às minhas companheiras de república (Marlusa, Fernanda, Maitê e Laura), pela amizade, carinho e compreensão. Obrigada, meninas;
- ❖ A todos, direta ou indiretamente, envolvidos neste trabalho, muito obrigada!!!

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana”.

Carl Gustav Jung

RESUMO

Morais, S. D. B. V. Efeito das células-tronco mesenquimais na modulação autonômica cardíaca e na sensibilidade do barorreflexo em ratos com insuficiência cardíaca. 2015. Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

As doenças cardiovasculares estão entre as principais causas de morte, principalmente aquelas decorrentes do infarto do miocárdio (IM). A terapia com células-tronco tem mostrado resultados promissores após o IM em estudos clínicos e experimentais, especialmente as células-tronco mesenquimais (MSC), por apresentarem notável potencial pró-angiogênico, anti-fibrosante e imunomodulador. Entretanto, nenhum estudo foi realizado quanto à variabilidade da frequência cardíaca (VFC), tono autonômico e sensibilidade do barorreflexo, que são considerados fatores de risco apreciáveis, e se encontram atenuados na insuficiência cardíaca (IC) induzida pelo IM. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi examinar o efeito do transplante de MSC de medula óssea sobre a modulação autonômica e a sensibilidade do barorreflexo em ratos com IC, induzida pelo IM. Para isso, foi realizada a ligadura da artéria coronária esquerda em ratos Wistar machos (220-360g), e após dois a três dias foi feita a avaliação da área infartada pelo SPECT. As MSCs foram injetadas, intravenosamente, sete dias pós-IM. A função cardíaca foi analisada pela ventriculografia, antes e um mês após o transplante. Após a reavaliação da ventriculografia, os animais foram submetidos a registros eletrocardiográficos, após receberem eletrodos implantados subcutaneamente no dorso, e cânula na veia jugular esquerda para determinação farmacológica do tono autonômico. Também, foi implantada cânula na artéria femoral para registro da pressão arterial, e análise da sensibilidade do barorreflexo. Logo após os registros, os animais foram sacrificados para coleta do coração e análise histopatológica. Para a infusão, as MSCs foram caracterizadas, segundo critérios da Sociedade Internacional de Terapia Celular. A área de lesão induzida logo após a ligadura da artéria foi semelhante entre os animais. Um mês após o tratamento, o tamanho do infarto foi reduzido no grupo tratado com MSC. Verificou-se redução da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) após a ligadura coronariana, e previamente ao tratamento nos animais com IC. Um mês após a terapia com MSC, ou injeção de salina, não houve melhora da FEVE em ambos os grupos com IC. Os intervalos QT e QTc foram alongados pelo IM, enquanto as MSCs não tiveram efeito nestes parâmetros. A VFC mostrou redução do desvio padrão de valores sucessivos

(SDNN) do intervalo RR (iRR) e a raiz quadrada da média da soma dos quadrados das diferenças de valores sucessivos (RMSSD) do iRR pós-IM, enquanto as MSCs preveniram essa redução. Na análise espectral, os espectros do iRR, após o infarto, mostraram potências menores, em unidades absolutas, das bandas de baixa frequência, LF, e alta frequência, HF, enquanto que as MSCs promoveram um aumento destes parâmetros. Os métodos não-lineares da VFC mostraram redução na entropia, e aumento da análise de flutuação depurada de tendência (DFA) do iRR pós-IM. A terapia com MSC preveniu a alteração da entropia e, também, protegeu o DFA. A frequência cardíaca foi semelhante entre os grupos; entretanto, a frequência intrínseca de marca-passo apresentou-se reduzida no grupo IC, enquanto o tratamento com MSC preservou esta atenuação. Foi observado menor tono vagal no grupo IC não tratado, enquanto o tratamento com MSC aumentou o tono vagal. O tono simpático não apresentou diferença entre os grupos. A sensibilidade do barorreflexo à bradicardia foi reduzida na IC, enquanto que as MSC preveniram essa redução. O colágeno intersticial apresentou-se aumentado na IC, mas não no grupo tratado com MSC. A pressão arterial (PA) sistólica, a PA média e os parâmetros da variabilidade da PA: SDNN e LF encontraram-se reduzidas nos grupos com IC, tratados ou não com MSC. Em conjunto, esses dados demonstram que a terapia com MSC reduziu a extensão do infarto e a fibrose intersticial no miocárdio remanescente do ventrículo esquerdo. Além disso, melhorou a modulação autonômica colinérgica do coração, a VFC e a sensibilidade barorreflexa.

Palavras-chave: Célula-Tronco Mesenquimal, Insuficiência Cardíaca, Variabilidade Da Frequência Cardíaca, Barorreflexo, Tono Autonômico Cardíaco

ABSTRACT

Morais, SDBV. Effect of mesenchymal stem cells on cardiac autonomic modulation and baroreflex sensitivity in rats with heart failure. 2015 Thesis (Ph.D.), Medical School of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil.

Cardiovascular diseases are among the leading causes of death, especially those resulting from myocardial infarction (MI). Stem cell therapy has shown promising results after MI in both patients and experimental animals, especially those using mesenchymal stem cells (MSC), which present potential pro-angiogenic, anti-fibrotic and immunomodulatory. However, no studies have been conducted on the heart rate variability (HRV), autonomic tone and baroreflex sensitivity, which are considered risk factors and are attenuated in heart failure (HF) induced by MI. Thus, the main of this study was to examine the effect of bone marrow MSC transplantation on autonomic modulation and baroreflex sensitivity in rats with HF, induced by MI. Therefore, it was performed ligation of the left coronary artery of male Wistar rats (220-360g) and after two to three days, assessment was made of the area infarcted by SPECT. MSC were injected intravenously seven days post-MI. Cardiac function was assessed by ventriculography before and one month after transplantation. After reassessing the ventriculography, the animals underwent electrocardiographic recordings after receiving electrodes implanted subcutaneously on the back, and cannula in the left jugular vein for drug determination of autonomic tone. Also, cannula was implanted in the femoral artery for blood pressure recording and analysis of baroreflex sensitivity. Soon after the records, the animals were sacrificed for collection of the heart and histopathological analysis. For infusion, the MSC were characterized according to the criteria of the International Society for Cellular Therapy. The lesion area induced soon after artery ligation was similar among animals. One month after treatment, infarct size was reduced in the group treated with MSC. A reduction was observed in left ventricular ejection fraction (LVEF) after coronary ligation, and prior to treatment in HF animals. One month after the MSC therapy, or saline injection, there was no improvement in LVEF in both groups with HF. The QT and corrected QT intervals were lengthened by IM, while the MSC had no effect on these parameters. HRV showed a reduction in the standard deviation of successive values (SDNN) of the RR interval (RRi), and the root mean square of the successive (RMSSD) RRi after MI, while the MSC prevented this reduction. In spectral analysis, the RRi spectra, after infarction, showed lower power, in absolute units, of the low frequency, LF, and high frequency band, HF, while MSCs

promoted an increase in these parameters. Nonlinear methods of HRV showed a reduction in entropy, and increased detrended fluctuation analysis (DFA) of RRI, post-MI. The MSC therapy prevented the change of entropy and also protected DFA. Heart rate was similar in both groups; however, the intrinsic heart rate was reduced in HF group, while treatment with MSC preserved this attenuation. A lower vagal tone was observed in HF untreated group, while treatment with MSC increased vagal tone. The sympathetic tone did not differ between groups. The baroreflex sensitivity to bradycardia was reduced in HF, while the MSC prevented this reduction. The interstitial collagen was increased in HF, but not in the group treated with MSC. Systolic blood pressure (BP), the mean BP and parameters of BP variability: SDNN and LF were reduced in the groups with HF, treated or not with MSC. Together, these data demonstrate that MSC therapy reduced the infarct size and interstitial fibrosis in the remaining myocardium of the left ventricle. In addition, the cells improved cholinergic autonomic modulation of the heart, heart rate variability and baroreflex sensitivity.

Keywords: Mesenchymal Stem Cell, Heart Failure, Heart Rate Variability, Baroreflex, Cardiac Autonomic Tonus.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Diagrama do Protocolo Experimental para avaliação da função cardíaca e hemodinâmica antes e após o transplante de MSC 45
- FIGURA 2.** Perfil imunofenotípico das células-tronco mesenquimais (MSC) avaliado por citometria de fluxo. Percentual médio de células derivadas da medula óssea em terceira passagem, positivas para os marcadores de superfície celular CD29, CD90 e CD44, tipicamente expressos nas MSCs 59
- FIGURA 3.** Fotomicrografias da diferenciação das células-tronco mesenquimais (MSC) em terceira passagem, *in vitro*, em osteoblastos e adipócitos. **Painel A:** A coloração *Alizarin Red* evidencia a presença de depósitos de cálcio e mostra a diferenciação osteoblástica das MSCs, após seu cultivo em meio indutor de diferenciação osteogênica. **Painel B:** Cultura controle osteogênica na qual as MSCs não foram cultivadas em meio indutor de diferenciação osteogênica, e coradas com *Alizarin Red*. **Painel C:** A coloração com *Oil Red* evidenciou a presença de depósitos lipídicos, proeminentes no citoplasma das células, indicando a diferenciação das MSCs em adipócitos, após seu cultivo em meio indutor de diferenciação adipogênica. **Painel D:** Cultura controle adipogênica na qual as MSCs não foram cultivadas em meio de diferenciação adipogênica, e foram coradas com *Oil Red* e Hematoxilina 60
- FIGURA 4.** Fotomicrografia das células-tronco mesenquimais (MSC) em cultura, na terceira passagem, demonstrando morfologia fibroblastóide 62
- FIGURA 5.** Fotomicrografia das células-tronco mesenquimais (MSC), em vermelho, marcadas com o corante *CM-Dil* 62
- FIGURA 6.** Tamanho do infarto (% do defeito de perfusão) determinado pelo SPECT (Tomografia computadorizada por emissão de fóton único) após a cirurgia fictícia nos animais controles (SHAM), e após a ligadura da artéria coronária esquerda nos animais com insuficiência cardíaca (IC), antes do tratamento com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC) 63

FIGURA 7. Imagens cintilográficas de perfusão miocárdica, obtidas pelo SPECT (Tomografia computadorizada por emissão de fóton único), após a cirurgia fictícia nos animais controles (SHAM), e após a ligadura da artéria coronária esquerda nos animais com insuficiência cardíaca (IC), antes do tratamento com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC). O Mapa Polar representa, na coluna vertical à esquerda, o coração como um todo. Cortes segmentados da base ao ápice do coração estão representados nas colunas horizontais. A área escura contida no círculo prata representa a lesão cardíaca 64

FIGURA 8. Fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) determinada por Ventriculografia Radioisotópica. **Painel A:** antes (pré-tratamento) e **Painel B:** um mês após o tratamento (pós-tratamento) dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC) 66

FIGURA 9. Fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE), determinada por meio da Ventriculografia Radioisotópica, antes (pré-tratamento) e um mês após o tratamento (pós-tratamento). **Painel A:** grupo controle (SHAM); **Painel B:** grupo com insuficiência cardíaca (IC) tratado com salina; e **Painel C:** grupo com insuficiência cardíaca (IC) tratado com células-tronco mesenquimais (MSC) 67

FIGURA 10. Espectro representativo da variabilidade da frequência cardíaca (VFC), no domínio da frequência (análise espectral), dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC) 71

FIGURA 11. Tono vagal (Δ frequência cardíaca em bpm) dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC) 74

FIGURA 12. Tono simpático (Δ frequência cardíaca em bpm) dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC) 74

FIGURA 13. Frequência cardíaca (FC) basal de animais acordados dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC) 75

FIGURA 14. Frequência cardíaca intrínseca de marca-passo (FIMP), de animais acordados, após o duplo bloqueio farmacológico com metil-atropina e propranolol, nos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC) 75

FIGURA 15. Índice barorreflexo ($\Delta FC/\Delta PAM$ bpm/mmHg) da resposta bradicárdica reflexa dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC) 76

FIGURA 16. Índice barorreflexo ($\Delta FC/\Delta PAM$ bpm/mmHg) da resposta taquicárdica reflexa dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC) 76

FIGURA 17. Traçados ilustrativos da pressão arterial sistólica (PAS) e frequência cardíaca (FC), da resposta bradicárdica à administração de fenilefrina, de um animal representativo dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC) 77

FIGURA 18. Painel A: Extensão do infarto (%) no ventrículo esquerdo dos animais com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC). **Painel B:** Fotomicrografia corada com hematoxilina-eosina (HE) 79

FIGURA 19. Porcentagem de colágeno intersticial no miocárdio sobrevivente do ventrículo esquerdo dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC) 80

FIGURA 20. Fotomicrografia da fibrose intersticial do miocárdio remanescente na parede livre do ventrículo esquerdo. **Painel A:** grupo controle (SHAM); **Painel B:** grupo com

insuficiência cardíaca (IC) tratado com salina; e **Painel C:** grupo com insuficiência cardíaca (IC) tratado com células-tronco mesenquimais (MSC) 81

FIGURA 21. Diâmetro dos cardiomiócitos remanescentes, no septo, dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC) 82

FIGURA 22. Espessura mínima da área de infarto no ventrículo esquerdo dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC) 83

FIGURA 23. Painel A: Peso corporal antes do infarto do miocárdio; **Painel B:** peso corporal um mês após o tratamento; e **Painel C:** ganho de peso dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC) 85

FIGURA 24. Painel A: Peso cardíaco; **Painel B:** peso corporal; e **Painel C:** índice de peso cardíaco dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC) 86

LISTA DE TABELA

TABELA 1. Parâmetros eletrocardiográficos dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC). Os parâmetros eletrocardiográficos são expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) 68

TABELA 2. Índices de variabilidade da frequência cardíaca (VFC) no domínio do tempo: intervalo RR (ms), SDNN (ms) e RMSSD (ms) dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC) 70

TABELA 3. Índices de variabilidade da frequência cardíaca (VFC) no domínio da frequência (análise espectral): valores das potências das bandas de baixa (LF) e de alta (HF) frequência, e razão LF/HF dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC) 70

TABELA 4. Índices dos métodos não lineares da variabilidade da frequência cardíaca (VFC): DFA (análise de flutuação depurada de tendências) e Entropia dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC) 72

TABELA 5. Pressões arteriais, média (PAM) e sistólica (PAS), e índices de variabilidade da pressão arterial no domínio do tempo (SDNN) e da frequência (LF), dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC) 74

Tabelas do Apêndice

TABELA 1: Defeito de perfusão (%) determinado pelo SPECT (Tomografia computadorizada por emissão de fóton único) no período de pré-tratamento dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC) 137

TABELA 2. Fração de Ejeção (%) no período de pré-tratamento dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC)	138
TABELA 3. Fração de Ejeção (%) após um mês do tratamento dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC)	139
TABELA 4. Fração de Ejeção (%) antes (pré-tratamento) e após um mês (pós-tratamento) do tratamento dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC)	140
TABELA 5. Parâmetros eletrocardiográficos: intervalo PR (iPR), duração da onda P (dP), intervalo QRS (iQRS), intervalo QT (iQT) e intervalo QT corrigido (iQTc) após um mês do tratamento do grupo controle (SHAM) com salina.	141
TABELA 6. Parâmetros eletrocardiográficos: intervalo PR (iPR), duração da onda P (dP), intervalo QRS (iQRS), intervalo QT (iQT) e intervalo QT corrigido (iQTc) após um mês do tratamento do grupo com insuficiência cardíaca (IC) tratado com salina.	141
TABELA 7. Parâmetros eletrocardiográficos: intervalo PR (iPR), duração da onda P (dP), intervalo QRS (iQRS), intervalo QT (iQT) e intervalo QT corrigido (iQTc) após um mês do tratamento do grupo com insuficiência cardíaca (IC) tratado com células-tronco mesenquimais (MSC)	142
TABELA 8. Intervalo RR do eletrocardiograma (ms), SDNN (desvio padrão de valores sucessivos do intervalo RR, em ms), RMSSD (raiz quadrada da média da soma dos quadrados das diferenças entre sucessivos valores de intervalo RR, em ms) da variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC)	143
TABELA 9. Potências das bandas de baixa (LF: 0,2 - 0,75 Hz) e alta frequência (HF: 0,75 – 3 Hz) em unidades absoluta (abs - ms ²) e normalizada (nu - %), e a razão LF/HF da	

variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência do intervalo RR do eletrocardiograma do grupo controle (SHAM) 144

TABELA 10. Potências das bandas de baixa (LF: 0,2 – 0,75 Hz) e alta frequência (HF: 0,75 – 3 Hz) em unidades absoluta (abs - ms^2) e normalizada (nu - %), e a razão LF/HF da variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência do intervalo RR do eletrocardiograma do grupo com insuficiência cardíaca (IC) tratado com salina 145

TABELA 11. Potências das bandas de baixa (LF: 0,2 – 0,75 Hz) e alta frequência (HF: 0,75 – 3 Hz) em unidades absoluta (abs - ms^2) e normalizada (nu - %), e a razão LF/HF da variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência do intervalo RR do eletrocardiograma do grupo com insuficiência cardíaca (IC) tratado células-tronco mesenquimais (MSC) 146

TABELA 12. Índice α da Análise depurada de tendências (DFA) e Entropia dos métodos não lineares da variabilidade da frequência cardíaca dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC) 147

TABELA 13. Pressão arterial média (PAM, em mmHg), média da pressão arterial sistólica (PAS, em mmHg), SDNN (desvio padrão de valores sucessivos do intervalo RR, em mmHg), e a potência da banda de baixa frequência (LF: 0,2 – 0,75 Hz) em unidade absoluta (abs - mmHg^2) da PAS do grupo controle (SHAM) 148

TABELA 14. Pressão arterial média (PAM, em mmHg), média da pressão arterial sistólica (PAS, em mmHg), SDNN (desvio padrão de valores sucessivos do intervalo RR, em mmHg), e a potência da banda de baixa frequência (LF: 0,2 – 0,75 Hz) em unidade absoluta (abs - mmHg^2) da PAS do grupo com insuficiência cardíaca (IC) tratado com salina 149

TABELA 15. Pressão arterial média (PAM, em mmHg), média da pressão arterial sistólica (PAS, em mmHg), SDNN (desvio padrão de valores sucessivos do intervalo RR, em mmHg), e a potência da banda de baixa frequência (LF: 0,2 – 0,75 Hz) em unidade absoluta (abs -

mmHg²) da PAS do grupo com insuficiência cardíaca (IC) tratado com células-tronco mesenquimais (MSC) 150

TABELA 16. Frequência cardíaca (bpm) dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC) 151

TABELA 17. Frequência intrínseca de marca-passo (bpm) dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC) 152

TABELA 18. Resposta taquicárdica (efeito vagal – bpm) à administração de metil-atropina dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC) 153

TABELA 19. Resposta bradicárdica (efeito simpático – bpm) à administração de propranolol dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC) 154

TABELA 20. Sensibilidade barorreflexa, resposta bradicárdica à administração de fenilefrina (bpm/mmHg), dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC) 155

TABELA 21. Sensibilidade barorreflexa, resposta taquicárdica à administração de nitroprussiato de sódio (bpm/mmHg), dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC) 155

TABELA 22. Extensão do infartado dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC) 156

TABELA 23. Quantidade relativa de colágeno (%) do miocárdio sobrevivente, na área da parede livre do ventrículo esquerdo, dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC) 157

TABELA 24. Diâmetro dos cardiomiócitos no Septo (μm) dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC)	158
TABELA 25. Mínima espessura do ventrículo esquerdo na área de infarto (mm) dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC)	159
TABELA 26. Peso inicial (g) dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC)	160
TABELA 27. Peso final (g) dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC)	161
TABELA 28. Variação do peso inicial pelo peso final (g) dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC)	162
TABELA 29. Peso dos corações (mg), peso final (g) e o índice de peso cardíaco (mg/g) do grupo controle (SHAM)	163
TABELA 30. Peso dos corações (mg), peso final (g) e o índice de peso cardíaco (mg/g) do grupo com insuficiência cardíaca (IC) tratado com salina	164
TABELA 31. Peso dos corações (mg), peso final (g) e o índice de peso cardíaco (mg/g) do grupo com insuficiência cardíaca (IC) tratado com células-tronco mesenquimais (MSC)	165

LISTA DE ABREVIATURAS

ANP	Peptídeo Atrial Natriurético
BNP	Peptídeo Cerebral Natriurético
CNP	Peptídeo Natriurético do Tipo C
CVLM	Bulbo Ventro-Lateral Caudal
DC	Débito Cardíaco
DFA	Análise Depurada de Tendências
DMV	Núcleo Dorsal Motor do Nervo Vago
ECG	Eletrocardiograma
FC	Frequência Cardíaca
FEVE	Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo
FFT	Transformada Rápida de Fourier
FIMP	Frequência Intrínseca de Marca-passo
HE	Hematoxilina-Eosina
HF	Alta Frequência
i.m.	Injeção Intramuscular
i.p.	Injeção Intraperitoneal
i.v.	Injeção Intravenosa
IBMX	Isobutilmetilxantina
IC	Insuficiência Cardíaca
If	Corrente “ <i>Funny</i> ”
IM	Infarto do Miocárdio
ISCT	Sociedade Internacional de Terapia Celular
kg	Quilograma
KeV	Quiloelétron-volt
LF	Baixa Frequência
LVEDV	Volume Diastólico Final do Ventrículo Esquerdo
mBq	MiliBecquerel
mg	Miligrama
mM	Milimolar
MSC	Célula-tronco Mesenquimal
NA	Núcleo Ambíguo
η M	Nanomolar

NTS	Núcleo Do Trato Solitário
NYHA	New York Heart Association
PA	Pressão Arterial
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
PAM	Pressão Arterial Média
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PFA	Paraformaldeído
RMSSD	Raiz Quadrada da Média da Soma dos Quadrados das Diferenças de Valores Sucessivos
RVLM	Bulbo Ventro-Lateral Rostral
SDNN	Desvio Padrão de Valores Sucessivos
SNC	Sistema Nervoso Central
SPECT	Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único
SRA	Sistema Renina-Angiotensina
Tc	Tecnécio
TH	Tirosina Hidroxilase
VE	Ventrículo Esquerdo
VFC	Variabilidade da Frequência Cardíaca
VLF	Muito Baixa Frequência
VS	Volume Sistólico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
1.1 A Insuficiência Cardíaca	26
1.2 O Modelo Experimental de Infarto do Miocárdio	30
1.3 A Modulação Autonômica, o Barorreflexo e Disfunções na Insuficiência Cardíaca	32
1.4 Terapia Celular e Células-Tronco Mesenquimais	36
1.5 O Infarto do Miocárdio e Células-Tronco Mesenquimais	39
2. OBJETIVOS	42
3. MÉTODOS	44
3.1 Desenho Experimental	45
3.2 Isolamento de MSC da Medula Óssea	45
3.3 Replaqueamento de MSC	46
3.4 Caracterização de MSC	46
3.4.1 Imunofenotipagem	47
3.4.2 Diferenciação Celular	47
3.4.2.1 Diferenciação Osteogênica	47
3.4.2.2 Diferenciação Adipogênica	48
3.5 Infarto do Miocárdio	48
3.6 Cintilografia de Perfusão Miocárdica Com Spect-Sestamibi-Tc ^{99m}	49
3.7 Ventriculografia Radioisotópica	50
3.8 Administração Intravenosa de MSC nos Animais	51
3.9 Avaliação Funcional e Morfológica após o Transplante de MSC	51
3.9.1 Ventriculografia Radioisotópica	51
3.9.2 Registro Eletrocardiográfico e Implante de Eletrodos	51
3.9.3 Variabilidade da Frequência Cardíaca e Tono Autonômico Cardíaco	52
3.9.4 Variabilidade da Pressão Arterial e Sensibilidade Do Barorreflexo	53
3.9.5 Processamento Histológico do Coração	53
3.10 Análise dos Dados	54
3.11 Análise Estatística	55

4. RESULTADOS	57
4.1 Caracterização das Células-Tronco Mesenquimais (MSC)	58
4.1.1 Imunofenotipagem	58
4.1.2 Plasticidade	58
4.1.3 Morfologia	61
4.1.4 Marcação das MSC	61
4.2 Cintilografia Miocárdica de Perfusão com Spect-Sestamibi-Tc99m	61
4.3 Ventriculografia Radioisotópica	65
4.4 Registro Eletrocardiográfico	65
4.5 Variabilidade da Frequência Cardíaca (VFC)	69
4.6 Variabilidade da Pressão Arterial (PA)	69
4.7 Controle Autonômico Cardíaco e Frequência Intrínseca De Marca-passo (FIMP)	73
4.8 Sensibilidade do Barorreflexo	73
4.9 Análise Histológica do Coração	78
4.10 Espessura Cardíaca	78
4.11 Peso	84
5. DISCUSSÃO	87
6. CONCLUSÕES	102
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104
8. APÊNDICE	136
9. MANUSCRITO	166

1. INTRODUÇÃO

1.1 A INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

A insuficiência cardíaca (IC) é uma síndrome complexa que resulta de alteração estrutural ou prejuízo funcional do enchimento ou da ejeção de sangue pelos ventrículos (TASK FORCE, 2013).

Nos Estados Unidos, aproximadamente 5,1 milhões de pessoas apresentam manifestações clínicas de IC e a prevalência continua a aumentar (GO et al., 2013). O risco de desenvolvimento de IC é de 20% para americanos acima dos 40 anos de idade, e de 10 para cada 1000, acima dos 65 anos (DJOUSSÉ et al., 2009; ROGER et al., 2011). No Brasil, estima-se que a IC acometa cerca de 2 milhões de pessoas, e que 240 mil novos casos são diagnosticados anualmente (PLENTZ, 2010).

A IC é o diagnóstico primário em mais de um milhão de hospitalizações por ano (GO et al., 2013). Os custos totais de cuidados com a IC nos EUA excedem 30 bilhões de dólares, anualmente, sendo que mais da metade destes custos são gastos com as hospitalizações (GO et al., 2013).

Embora a sobrevivência tenha aumentado nos últimos anos, a taxa de mortalidade para a IC permanece, aproximadamente, em 50% 5 anos após o diagnóstico (LEVY et al., 2002; ROGER et al., 2004). Quando o paciente não vem a óbito, a IC reduz, significativamente, a sua qualidade de vida (HEO et al., 2008; LESMAN-LEEGTE et al., 2009). Assim, a IC pode ser considerada um problema de saúde pública mundial.

A IC consiste de disfunção ventricular com redução da contratilidade miocárdica, do débito cardíaco (DC), da reserva cardíaca funcional, perfusão tecidual, e aumento do volume diastólico final dos ventrículos (LVEDV) (FELDER et al., 2001; FRANCIS et al., 2001). Desta forma, os sinais e sintomas da IC são resultados de intercorrências clínicas do DC inadequado, e da ineficiência do retorno venoso (KEMP; CONTE, 2012).

Devido à inabilidade de bombeamento adequado pelos ventrículos, a IC envolve ajustes cardiocirculatórios expressivos; na tentativa de manter adequada perfusão tecidual. Dentre eles, são ativados o mecanismo de Frank-Starling, os neuro-hormônios, e o remodelamento ventricular (KEMP; CONTE, 2012).

O mecanismo de Frank-Starling possui papel compensatório significativo no início da IC, o qual utiliza a reserva diastólica para tentar aumentar a eficiência sistólica. Porém, devido à ineficiência contrátil do coração, este mecanismo é exaurido e o aumento do LVEDV (pré-carga) e pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (LVEDP) levam à congestão pulmonar, redução do DC e dilatação ventricular (KEMP; CONTE, 2012;

TIBIRIÇÁ, 2001).

A ativação neuroendócrina, particularmente a atividade simpática, utiliza a reserva sistólica para a manutenção dos parâmetros hemodinâmicos dentro dos limites adequados para manter a perfusão apropriada dos tecidos. Assim, dentre as alterações que ocorrem desde as fases iniciais da IC observa-se hiperatividade simpática (MANCIA et al., 1992; MARK, 1995; ZUCKER et al., 1995) combinada com a redução do tônus vagal (OLSHANSKY et al., 2008; PORTER et al., 1990).

A ativação simpática tem efeito vasoconstritor, e, também, inotrópico e cronotrópico positivos; os quais aumentam o volume sistólico (VS), DC e a resistência vascular, restabelecendo os níveis pressóricos sanguíneos e a perfusão tecidual. Embora o aumento do tono simpático possa ser benéfico nos estágios iniciais da IC, a manutenção da sua ativação é considerada o principal fator responsável pelos efeitos deletérios ao sistema cardiovascular (FRANCIS, 1998; ZUCKER et al., 1995). Ressalta-se que o aumento da frequência cardíaca (FC), e o consumo elevado de oxigênio pelo miocárdio, deprimem as reservas de substratos de alta energia, dificultam a perfusão subendocárdica, com diminuição do limiar de fibrilação, e aumentam a incidência de arritmias ventriculares (FRENNEAUX, 2004; ZUCKER et al., 1995; TIBIRIÇÁ, 2001). Além disso, a simpato-excitação na IC está associada à redução da sensibilidade dos reflexos simpato-inibitórios, como o barorreflexo arterial e o reflexo cardiopulmonar (THAMES et al., 1993; ZUCKER et al., 1995); ao aumento da atividade dos quimiorreceptores periféricos (LI et al., 2007; SCHULTZ et al., 2007); à elevada concentração plasmática de angiotensina II (DIBONA et al., 1995); e, também, à redução na síntese de óxido nítrico (FRANCIS, 1998; FRENNEAUX, 2004). É consenso que o grau de hiperatividade simpática determina um mau prognóstico de pacientes com IC (KAYE; ESLER, 1995). Neste contexto, o controle do tono simpático na IC tem sido exaustivamente estudado.

Por outro lado, uma hipoatividade parassimpática tem sido identificada como fator de risco, independente, em pacientes com infarto do miocárdio (IM) (KLEIGER et al., 1987; LA ROVERE et al., 1998). O sistema parassimpático possui efeito cronotrópico negativo, o que reduz o DC. O controle parassimpático sobre o coração é um processo complexo, o qual, a exemplo do controle simpático, envolve componentes centrais e periféricos, incluindo a geração de impulsos centrais, sinapses pré- e pós-ganglionares, a síntese e liberação de acetilcolina, e hidrólise desta última pela acetilcolinesterase (SHEPHERD; VANHOUTTE, 1979). A disfunção parassimpática na IC pode ser atribuída às alterações, em um, ou mais, destes componentes. Entretanto, pouca atenção tem sido dada ao estudo do sistema

autônomo parassimpático na IC.

O sistema autônomo simpático e a baixa perfusão renal ativam o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), o qual induz vasoconstrição, retenção de sódio e água, e estimula a sede. Assim, aumentam a pré- e pós-carga, ou seja, o LVEDV e a resistência periférica, as quais contribuem para a normalização da PA. Este sistema, assim como outros mecanismos neuro-hormonais, como as catecolaminas, vasopressina, e os contrarreguladores (ANP, BNP, CNP) presentes na IC, também contribuem na tentativa de restabelecer os níveis pressóricos e a perfusão tecidual adequada (KEMP; CONTE, 2012). Todavia, em longo prazo, a ativação sustentada dos sistemas neuro-hormonal e, também, do sistema citocinérgico (TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-18) levam ao remodelamento cardíaco, o qual agrava a descompensação cardíaca (GULLESTAD et al., 2012; KEMP; CONTE, 2012; TIBIRIÇÁ, 2001).

O remodelamento cardíaco é caracterizado por alterações na forma, tamanho, estrutura e função ventricular (CURRY et al., 2000; PFEFFER; BRAUNWALD, 1990). As mudanças nos miócitos envolvem alterações no acoplamento excitação-contração, das proteínas do citoesqueleto, da expressão do gene da cadeia pesada de miosina e dessensibilização beta-adrenérgica. As mudanças teciduais envolvem a perda de miócito (por necrose e apoptose), e alterações na matriz extracelular, com degradação da matriz e formação de fibrose miocárdica. E as alterações na geometria da câmara envolvem a dilatação, aumento da esfera e incompetência da válvula mitral (COHN ET AL., 2000; PFEFFER; BRAUNWALD, 1990; TIBIRIÇÁ, 2001). Assim, o ventrículo se torna menos elíptico e mais esférico. Estas mudanças geométricas, inicialmente, são compensatórias, uma vez que o coração se redimensiona para aumentar o VS e DC, apesar da fração de ejeção (FE) reduzida. A espessura da parede miocárdica e a massa ventricular aumentam, induzindo, inicialmente, maior contratilidade (KEMP; CONTE, 2012). Assim, as mudanças na arquitetura da câmara ventricular e a perda de cardiomiócitos promovem sobrecarga no miocárdio viável e induzem mecanismos compensatórios, como a hipertrofia ventricular esquerda e a dilatação do VE (PETROVIC, 2004; TIBIRIÇÁ, 2001).

O remodelamento atua, inicialmente, como mecanismo compensatório para manter o DC. No entanto, a dilatação e a hipertrofia cardíaca resultam em uma condição de carga e tensão na parede ventricular aumentada. Essas alterações, por sua vez, aumentam o gasto energético, o qual compromete a contratilidade cardíaca e induz aumento da fibrose tecidual, resultando na exacerbação da dilatação e disfunção ventricular (VAN DEN BORNE et al., 2010; LITWIN et al., 1994). Em longo prazo, o remodelamento aumenta a apoptose e induz

dissincronia contrátil no miocárdio ventricular dilatado e remodelado, levando à menor eficiência da bomba. Desta forma, o remodelamento cardíaco está relacionado com a deterioração do desempenho do VE (KEMP; CONTE, 2012).

A presença crônica de neuro-hormônios na circulação aumenta as anormalidades hemodinâmicas presentes na IC, as quais acentuam o remodelamento cardíaco e a liberação dos neuro-hormônios, os quais, por sua vez, agravam a deterioração hemodinâmica. Desta forma, cria-se um ciclo vicioso, cujo resultado é a disfunção ventricular progressiva, culminando com a morte do indivíduo (KEMP; CONTE, 2012).

Como o remodelamento na IC é progressivo, e, eventualmente, se torna deletério, a maioria das estratégias terapêuticas visam parar, ou reverter, este processo; entretanto, apesar dos avanços medicinais, a prevenção e o tratamento do remodelamento ainda permanecem como um desafio terapêutico (TASK FORCE, 2013; VRTOVEC et al., 2013). Terapias utilizando inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) e bloqueadores de receptores de angiotensina melhoram, modestamente, a qualidade de vida, ou retardam a progressão do agravamento desta última na IC (MAJANI et al., 2005). A terapia de resincronização cardíaca e abordagens educacionais e de gestão da doença, têm demonstrado resultados positivos; entretanto, um número apreciável de pacientes ainda progride para o estágio final da IC sujeito a opções terapêuticas limitadas (CLELAND et al., 2005; INGLIS et al., 2010; JOHANSSON et al., 2006; MCALISTER et al., 2004; VRTOVEC et al., 2013). Para estes pacientes, as terapias com células-tronco têm sido investigadas como estratégias seguras de tratamento, para redução do remodelamento cardíaco (VRTOVEC et al., 2013).

As estratégias terapêuticas por meio de células-tronco possuem grande potencial transformador, para o tratamento e prognóstico da IC, por atingir o problema fundamental da doença: a perda de tecido cardíaco; esta terapia induz à regeneração miocárdica (SANGANALMATH; BOLLI, 2013). Dentre os tipos de células-tronco, as células-tronco mesenquimais (MSC) têm sido amplamente estudadas, e em estágios iniciais, estudos clínicos têm mostrado resultados promissores para o reparo e regeneração do tecido cardíaco (KARANTALIS; HARE, 2015), dados estes, discutidos ainda nesta sessão. Apesar dos efeitos benéficos demonstrados até agora em doenças cardíacas, não há estudo na literatura em relação ao efeito das MSCs sobre o desequilíbrio autonômico do sistema cardiovascular. Portanto, baseado no potencial terapêutico destas células avaliou-se o efeito das MSCs sobre o controle autonômico, a função cardíaca e o remodelamento em ratos com IC.

1.2 O MODELO EXPERIMENTAL DE INFARTO DO MIOCÁRDIO

A IC ocorre em diversas doenças cardiovasculares, com destaque para o IM (HE et al., 2001; LOEHR et al., 2008), sendo este a causa primária de internação em 15% dos pacientes com IC (FONAROW et al., 2008).

Considerando a estreita relação entre o IM e a IC, o conhecimento de processos fisiopatológicos após o evento isquêmico e tratamentos que contribuam para a sobrevivência após o IM afetam, diretamente, o número de pacientes com IC. Deste modo, modelos de oclusão coronariana em animais de experimentação têm sido desenvolvidos. Estes modelos têm proporcionado excelentes perspectivas de estudo dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos no IM e na IC, e as intervenções que possam contribuir para a redução da progressão da doença.

Em 1979 PFEFFER et al. desenvolveram o modelo de ligadura coronária em ratos, o qual se tornou o modelo mais utilizado no estudo de IM e IC nas décadas seguintes (DOGGRELL; BROWN, 1998; PATTEN; HALL-PORTER, 2009). O desenvolvimento deste modelo deu início a uma série de experimentos subclínicos, e triagens clínicas, objetivando o teste de fármacos com potenciais terapêuticos no tratamento do IM e IC, a exemplo do Captopril, o qual vem sendo utilizado até os dias atuais (PFEFFER, J. M. et al., 1985; PFEFFER, M. A. et al., 1985; PFEFFER; BRAUNWALD, 1990; TASK FORCE, 2013).

A ligadura cirúrgica do ramo descendente anterior da artéria coronária esquerda, em ratos, está associada à perda de tecido ventricular, localizada na parede anterolateral do VE, e reproduz o infarto transmural do miocárdio (PFEFFER et al., 1979; PFEFFER, M. A. et al., 1985). Essa perda miocárdica, quando não compensada pelo miocárdio residual, leva à disfunção ventricular; o aumento do volume no ventrículo esquerdo é proporcional à extensão e ao tempo decorrido pós-IM (PFEFFER et al., 1979; PFEFFER, M. A. et al., 1985; PFEFFER; BRAUNWALD, 1990). O infarto transmural resulta numa série de alterações complexas, e progressivas, na arquitetura e estrutura ventricular, ou seja, o remodelamento cardíaco, o qual afeta a função ventricular e o prognóstico do paciente (PFEFFER; BRAUNWALD, 1990). Este modelo simula as causas mais comuns da IC em humanos, e permite o sincronismo preciso do evento causador e das mudanças nos sistemas neuro-humorais e função ventricular esquerda, com a progressão da IC (FRANCIS et al., 2001). Desta forma, animais com ligadura da coronária esquerda têm sido bem caracterizados em relação às alterações cardíacas, hemodinâmicas e neuro-humorais.

FRANCIS et al. (2001) estudaram, cronicamente, o desenvolvimento da IC, em ratos,

após a ligadura coronariana; e observaram que tanto a função ventricular, como indicadores neuro-hormonais, passaram por alterações ao longo de 6 semanas. Os autores demonstraram que o LVEDV aumentou, progressivamente, enquanto que o volume sistólico aumentou logo após a ligadura, tendo apresentado alterações pouco expressivas (pequena redução) ao longo do estudo. A atividade da renina plasmática, vasopressina, peptídeo atrial natriurético (ANP) aumentaram a partir da segunda semana, e assim permaneceram até o final do estudo. Entre 6 e 8 semanas após o IM, os ratos apresentaram aumento da atividade do nervo simpático renal e disfunção barorreflexa (FRANCIS et al., 2001).

Os achados de FRANCIS et al. (2001) confirmam dados da literatura que também demonstraram, em ratos submetidos à ligadura coronariana, aumento do LVEDV (ANVERSA et al., 1985; LITWIN et al., 1994; MONNET; CHACHQUES, 2005), disfunção barorreflexa (DIBONA et al., 1995; KIRCHHEIM et al., 1998; THAMES et al., 1993), hiperatividade do nervo simpático renal (DIBONA et al., 1995; ZUCKER; WANG, 1991), e aumento do níveis de ANP (HODSMAN et al., 1988; THAMES; SCHMID, 1981).

A IC em ratos promove, também, hipertrofia do miocárdio remanescente. Assim, estes animais apresentam maior peso cardíaco em decorrência da hipertrofia do ventrículo direito (FRANCIS et al., 2001; PFEFFER et al., 1979). LITWIN et al. (1994) demonstraram a sequência de alterações na geometria do VE em ratos com infarto transmural. Ou seja, remodelamento progressivo com adelgaçamento da parede anterior e aumento das dimensões; além de disfunção sistólica e diastólica do VE, 1 semana após o IM, com progressão das alterações após 6 semanas (LITWIN et al., 1994). Também, mostraram progressiva redução da fração de encurtamento e alterações no enchimento diastólico.

Assim, ratos com 40-50% de lesão após o IM, apresentam alterações funcionais, anatômicas, hemodinâmicas, autonômicas e humorais, características da IC (MULDERS; ELSNER, 2000), e semelhantes àquela observada em humanos (ANVERSA et al., 1986; COHN et al., 1984; DIBONA et al., 1995; ECKBERG et al., 1971a; SWYNGHEDAUW, 1999). Desta forma, o modelo de IM pela ligadura da artéria coronária descendente esquerda, em ratos, é considerado um excelente modelo de estudo da fisiopatologia e tratamento da IC. Assim, no presente estudo, utilizou-se do modelo de ligadura coronariana, em ratos, para indução da IC, a fim de se estudar os efeitos do tratamento com MSC nas alterações dos parâmetros cardiovasculares desta patologia.

1.3. A MODULAÇÃO AUTÔNOMICA, O BARORREFLEXO E DISFUNÇÕES NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA.

Os barorreceptores são mecanorreceptores sensíveis à deformação da parede vascular (principal mecanismo de ativação), e estão localizados entre as camadas adventícia e média do arco aórtico e seios carotídeos, formando uma estrutura sensitiva complexa (KIRCHHEIM, 1976; KRIEGER et al., 1982; SALGADO; KRIEGER, 1978). O aumento da PA provoca distensão vascular, induzindo deformação nas terminações nervosas. Canais iônicos mecanossensíveis localizados nestas estruturas são ativados, causando aumento do número de potenciais gerados nos barorreceptores, chegando a atingir um nível máximo de descargas (saturação). Quando ocorrem quedas na PA, as terminações barorreceptoras sofrem menor deformação e as descargas dos barorreceptores diminuem, até cessar completamente (KIRCHHEIM, 1976; KRIEGER et al., 1982; SALGADO; KRIEGER, 1978; AIRES, 2008).

Na maioria dos animais as aferências barorreceptoras originadas no seio carotídeo trafegam pelo nervo carotídeo (nervo de Hering), o qual se une ao nervo glossofaríngeo para alcançar o sistema nervoso central (SNC). As aferências barorreceptoras do arco aórtico trafegam no nervo depressor aórtico, e, posteriormente, pelo vago para alcançar o SNC. A primeira sinapse das aferências barorreceptoras no SNC ocorre no núcleo do trato solitário (NTS), de onde neurônios se projetam para dois grupamentos neuronais no tronco cerebral, envolvidos na gênese do tono vagal e simpático; são eles: 1) neurônios inibitórios do bulbo ventro-lateral caudal (CVLM), que por sua vez se projetam para o bulbo ventro-lateral rostral (RVLM) o qual ativa os neurônios pré-ganglionares simpáticos; 2) neurônios localizados no núcleo ambíguo (NA) e núcleo dorsal motor do nervo vago (DMV), os quais contêm os corpos celulares dos neurônios pré-ganglionares do sistema nervoso parassimpático (CHAPLEAU et al., 1988; KRIEGER et al., 1982). Assim, o barorreflexo consiste do ramo aferente, que envia informações relacionadas às alterações da PA para o SNC, o qual, por sua vez, integra essas informações e, por meio das vias eferentes - simpática e parassimpática - promove ajustes na PA (AIRES, 2008).

O ramo simpático possui fibras noradrenérgicas distribuídas por todo o coração, com ações inotrópica, cronotrópica e dromotrópica positivas, enquanto que nos vasos de resistência promove vasoconstrição sistêmica. Essas alterações levam a aumento no DC e resistência periférica, causando aumento da PA. O ramo parassimpático possui fibras colinérgicas que inervam, essencialmente, os nodos sinoatrial e atrioventricular, e, também, os átrios; e assim, modulam o cronotropismo, o dromotropismo, e, em menor grau, o

inotropismo negativo. Desta forma, ocorre redução da FC e do DC, com consequente redução da PA (DE JONG; RANDALL, 2005; KIRCHHEIM, 1976; KRIEGER et al., 1982). Portanto, a ativação dos barorreceptores inibe as descargas simpáticas para os vasos e coração, e aumenta a atividade parassimpática, resultando na redução da resistência periférica total e DC, e, conseqüentemente, promovem a redução da PA (KIRCHHEIM, 1976; KRIEGER et al., 1982). Por outro lado, queda na PA promove redução da atividade dos barorreceptores, a qual induz aumento da atividade simpática para o coração e os vasos, e redução da atividade vagal cardíaca, para que a PA retorne aos níveis normais (SHEPHERD; VANHOUTTE, 1979). Desta forma, a principal função do barorreflexo no controle cardiovascular é manter a PA dentro de faixa estreita de variação, em diferentes situações comportamentais (CHAPLEAU et al., 1988; KRIEGER et al., 1982). Em níveis normais de PA as descargas dos barorreceptores são intermitente, e sincrônicas, com a fase sistólica do pulso arterial.

Alteração reflexa da FC, em resposta à alteração da PA induzida por drogas vasoativas, pode ser uma maneira de se determinar o componente cardíaco do barorreflexo (FARAH et al., 1999). A administração intravenosa de fenilefrina eleva, momentaneamente, a PA, e as respostas reflexas bradicárdica e vasodilatadora, contribuem de forma apreciável para a normalização da PA (AIRES, 2008). Já a administração intravenosa de nitroprussiato de sódio leva à queda transitória da PA, enquanto que as respostas reflexas de taquicardia e vasoconstrição periférica, prontamente, trazem de volta a PA aos níveis normais (AIRES, 2008). Desta forma, a sensibilidade do barorreflexo pode ser calculada pelo índice barorreflexo, obtido pela razão entre as alterações reflexas da FC e as alterações na PA, em resposta à administração intravenosa de fenilefrina e nitroprussiato de sódio (FARAH et al., 1999).

Estudos têm demonstrado atenuação do controle barorreflexo sobre a FC em pacientes com IC (ECKBERG et al., 1971b; GRASSI et al., 1995; LA ROVERE et al., 2009). Alterações do barorreflexo semelhantes às descritas em humanos também são observadas em animais de experimentação, como cães e ratos com IC (THAMES et al., 1993). A partir destas observações ressalta-se a importância do controle barorreflexo sobre a modulação autonômica cardiovascular na IC, uma vez que a via eferente deste reflexo é o sistema nervoso autônomo, e tanto a função autonômica quanto o barorreflexo estão alterados na IC. Além disso, admite-se que a atenuação da sensibilidade do barorreflexo possa ser considerada como fator importante no prognóstico de pacientes com IC (CREAGER et al., 1982; NOLAN et al., 1998).

A modulação autonômica sobre o sistema cardiovascular pode ser mensurada por

métodos estatísticos, como a análise da variabilidade espontânea da PA e FC (TASK FORCE, 1996; DIAS DA SILVA et al., 2006). Os batimentos cardíacos e os pulsos de PA não são regulares, possuem oscilações que correspondem à habilidade do indivíduo em manter os parâmetros cardiovasculares em níveis fisiológicos frente a desafios, tais como, ortostatismo, exercício físico, estresse mental, sono, alterações hemodinâmicas e metabólicas, bem como em compensar disfunções induzidas por diversas patologias (TASK FORCE, 1996; MALLIANI, 1999; MONTANO et al., 2009; SWYNGHEDAUW et al., 1997). Em 1981, AKSELROD et al. utilizaram um método matemático, a **Transformada Rápida de Fourier**, para medir as flutuações dos intervalos entre cada batimento cardíaco (intervalos RR do eletrocardiograma). Estes autores demonstraram que componentes oscilatórios com frequências distintas são modulados por ramos distintos do sistema nervoso autônomo. Por meio do registro eletrocardiográfico contínuo, aliado a recurso computacional, é possível estimar a variabilidade dos intervalos RR por unidade de tempo (domínio do tempo), e analisar a frequência de oscilação destes mesmos intervalos RR no domínio da frequência por meio da análise espectral.

A quantificação da variabilidade de um fenômeno oscilatório no domínio do tempo pode ser dividida em duas categorias: 1) índices baseados na medida dos intervalos RR, como o SDNN, que quantifica o desvio padrão de intervalos RR; 2) índices baseados na comparação entre dois intervalos RR adjacentes, como o RMSSD, ou seja, raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RR normais adjacentes (TASK FORCE, 1996). A estimulação parassimpática resulta em uma resposta rápida e de curta duração, fazendo-se notar já no primeiro ou segundo batimento subsequente; assim, os índices baseados na comparação entre a duração de dois ciclos adjacentes, como o RMSSD, refletem, predominantemente, o tônus vagal. A estimulação simpática, por sua vez, tarda alguns segundos para se manifestar (GREENWOOD et al., 1997). Desta forma, índices baseados na medida dos intervalos RR individualmente, como SDNN, representam a variabilidade global do fenômeno oscilatório (PA ou FC), e refletem a atividade de ambos, parassimpático e simpático (VANDERLEI et al., 2009).

A quantificação da variabilidade da FC e PA no domínio da frequência (análise espectral) permite a identificação, e quantificação, de oscilações rítmicas que podem refletir a modulação simpática, ou parassimpática, sobre o sistema cardiovascular (AKSELROD et al., 1981). Utilizando-se um algoritmo matemático, como a Transformada Rápida de Fourier, o sinal pode ser decomposto em componentes de frequência, e quantificar o poder de cada componente. Em indivíduos normais, e em animais de experimentação, a análise espectral

mostra três ritmos básicos de oscilação: a banda de muito baixa frequência (VLF), de baixa frequência (LF) e de alta frequência (HF). Inúmeros estudos têm mostrado que as influências simpática e parassimpática, sobre o coração e os vasos, determinam certos padrões de variabilidade rítmica de baixa (LF) e alta frequência (HF), respectivamente. Fatores humorais, como óxido nítrico, ANP, catecolaminas da adrenal e o SRA, participam da gênese do VLF da PA e FC. As oscilações em HF da FC correspondem à modulação vagal sobre o coração, e ocorrem na mesma frequência da respiração (AKSELROD et al., 1981; JULIEN et al., 1995). Já as oscilações em HF da PA são associadas às flutuações rítmicas do DC ocasionadas pelos movimentos respiratórios, os quais alteram a pressão intratorácica e o retorno venoso. Por outro lado, as oscilações em LF, tanto da PA quanto da FC, refletem a modulação simpática sobre o coração e vasos (AKSELROD et al., 1981; CERUTTI et al., 1991).

Além dos métodos lineares (análise espectral e domínio do tempo) de estudo da VFC, métodos não lineares também têm sido utilizados para descrever a interação fisiológica entre o intervalo cardíaco e o sistema nervoso autônomo (TASK FORCE, 1996; (HUIKURI et al., 2009; PORTA, ALBERTO; TOBALDINI; et al., 2007; VOSS et al., 2009).

Recentemente, os métodos não lineares têm revelado alterações do intervalo cardíaco que não podem ser detectadas pela análise espectral (HUIKURI et al., 2009; PORTA, ALBERTO; TOBALDINI; et al., 2007; VOSS et al., 2009). Desta forma, os métodos não lineares podem prover informações adicionais sobre o controle autonômico cardíaco em pacientes com IC. Dentre os métodos não lineares a **Entropia Amostral** mede a regularidade (normalmente relacionado com o nível de complexidade) das séries temporais do intervalo RR (SILVA; MURTA, 2012; RICHMAN; MOORMAN, 2000). A entropia amostral é considerada uma ferramenta com potencial para análise de sistemas complexos (SILVA; MURTA, 2012), enquanto que a **Análise de Flutuação Depurada de Tendências** (DFA) quantifica as propriedades fractais da escala destas séries temporais nas diferentes escalas de tempo (PENG et al., 1995). Tem sido sugerido que propriedades fractais se constituem em um princípio organizado para a função e estrutura fisiológica (GOLDBERGER, 1996). Assim, o DFA é um dos métodos mais utilizados para demonstrar a diferença da auto similaridade, e as correlações de longo prazo das séries temporais em situações fisiológicas e fisiopatológicas (GOLDBERGER et al., 2002; PENG et al., 1995). Estes métodos têm sido estudados em modelos de IC como preditores de mortalidade (ARZENO et al., 2007; HUIKURI et al., 2000; SIGNORINI et al., 2006; MÄKIKALLIO et al., 1997).

Por conseguinte, a análise da VFC (por meio dos intervalos RR) reflete a modulação autonômica cardiovascular (função autonômica cardíaca simpática e parassimpática), e tem se

revelado de suma importância nos estudos sobre o controle autonômico cardiovascular em humanos e animais de experimentação. A utilização desta ferramenta de estudo tem crescido, consideravelmente, nos últimos anos, por se tratar de um método não invasivo e que tem se mostrado eficaz para o registro dos mecanismos rápidos de controle do sistema cardiovascular.

Além da análise da VFC, o grau de modulação autonômica cardíaca também pode ser avaliado pela administração de bloqueadores autonômicos, os quais permitem uma estimativa da ação vagal e/ou simpática sobre o coração. O aumento da FC após administração de bloqueador do receptor colinérgico muscarínico, como a atropina, indica o tono vagal cardíaco; enquanto que a redução da FC observada após a administração de bloqueador β -adrenérgico, como o propranolol, representa o tono simpático cardíaco. Após a administração de ambos bloqueadores autonômicos, a FC observada representa a ritmicidade espontânea cardíaca desprovida de qualquer modulação autonômica, a chamada frequência intrínseca de marca-passo (FIMP) (CHAPLEAU; SABHARWAL, 2011).

Logo, o presente estudo avaliou a função autonômica cardiovascular por meio da análise da sensibilidade barorreflexa, por métodos lineares (domínio do tempo e da frequência) e não lineares (DFA e entropia) da VFC, e pela utilização de bloqueadores autonômicos, atropina e propranolol; a fim de se investigar se o tratamento com MSC poderia prevenir a atenuação da modulação e tono autonômico, e do controle barorreflexo da FC em ratos com IC. Vale ressaltar que nenhum estudo foi encontrado analisando estes parâmetros até o presente momento.

1.4. TERAPIA CELULAR E CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

Nos últimos anos consideráveis avanços têm sido obtidos na tecnologia de reconstituição de tecidos lesados utilizando-se células indiferenciadas, pluri- ou multipotentes, as chamadas “*stem cells*” ou células-tronco (DONOVAN; GEARHART, 2001; STRAUER; KORNOWSKI, 2003).

As células-tronco podem ser classificadas de acordo com o potencial de diferenciação, e podem ser: 1) totipotentes, sendo capazes de originar os tecidos embrionários e extraembrionários, como o zigoto; 2) pluripotentes, ou seja, possuem a capacidade de originar todas as células do organismo; estas podem ser de origem embrionária (EVANS; KAUFMAN, 1981), derivadas do maciço interno do embrião na fase de blastocisto, ou, mais recentemente descritas, as chamadas iPS, formadas a partir de fibroblastos transduzidos com

fatores de transcrição (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006); 3) multipotentes, por terem a capacidade de diferenciação mais restrita, se diferenciando, principalmente, em células do tecido de origem, e participando do processo de regeneração tissular e homeostase tecidual, sendo encontradas, praticamente, em todos os tecidos adultos, (ECKFELDT et al., 2005; DONOVAN; GEARHART, 2001; KAJSTURA et al., 2008; STRAUER; KORNOWSKI, 2003).

A célula-tronco é um tipo singular de célula que tem a capacidade de se auto renovar, mantendo o reservatório (“*pool*”) de células-tronco, e de se diferenciar em múltiplos tipos de células especializadas. São requisitadas em qualquer lugar onde exista a necessidade de originar células diferenciadas (POULSOM et al., 2002; SELL, 2004; ZUBAIR et al., 2002). Até serem recrutadas, permanecem em estado quiescente por longos períodos (HE et al., 2009).

Vários estudos têm utilizado as células-tronco do ponto de vista terapêutico. Por exemplo, mioblastos esqueléticos (GHOSTINE et al., 2002; SCORSIN et al., 2000; TAYLOR et al., 1998), cardiomiócitos derivados de células-tronco embrionárias (HODGSON et al., 2004, p. 2005; MÉNARD et al., 2005); mais recentemente, cardiomiócitos derivados de iPS (MIKI et al., 2012; ZHANG et al., 2014) têm sido testados em animais com lesões cardíacas causadas por isquemia. Entretanto, em relação à célula-tronco embrionária e iPS, a utilização clínica, até o momento, não é apropriada devido à falta de segurança, já que elas são capazes de formar teratocarcinomas, devido ao potencial pluripotente, como demonstrado em animais (CAO et al., 2006; LEE et al., 2013; LIU et al., 2013; NUSSBAUM et al., 2007). Também, as células embrionárias induzem rejeição de enxerto, por apresentarem antígenos de histocompatibilidade (NUSSBAUM et al., 2007). Aspectos éticos devem ser destacados como limitações ao uso destas células, uma vez que elas são obtidas de blastocistos. Já os mioblastos esqueléticos podem causar arritmias, pelo fato dos mesmos não formarem junções comunicantes (*gap junctions*) apropriadas com os cardiomiócitos residentes (LEOBON et al., 2003; MIRAGOLI et al., 2007; REINECKE et al., 2000).

Devido às dúvidas e considerações que ainda carecem de esclarecimentos quanto à utilização das células-tronco pluripotentes e mioblastos como terapia, o uso das células-tronco adultas tem se tornado bastante promissor. Dentre estas, as derivadas de medula óssea têm sido as mais estudadas (PERIN et al., 2003; POULSOM et al., 2002; ZUBAIR et al., 2002). Embora o compartimento celular responsável pela formação da medula óssea vermelha seja muito complexo, possuindo várias linhagens celulares presentes, dois grupos distintos de células-tronco têm sido mais amplamente caracterizados: as células-tronco hematopoiéticas e

as células-tronco mesenquimais (MSC) (PERIN et al., 2003; POULSOM et al., 2002; ZUBAIR et al., 2002). Ambas se apresentam como bastante promissoras para a regeneração tecidual (MEIRELLES; NARDI, 2009; PITTENGER et al., 1999), uma vez que abrem a possibilidade da aplicação da plasticidade das mesmas na recuperação de órgãos lesados por patologias degenerativas. Elas são obtidas de maneira relativamente fácil, tornando-as excelentes candidatas nas terapias regenerativas.

As MSCs são consideradas como células-tronco adultas de maior potencial para aplicação terapêutica por apresentarem alto poder regenerativo, devido, não só à sua enorme plasticidade, mas também, e principalmente, pela ampla secreção de fatores que atuam de forma parácrina e que, crescentemente, vêm sendo conhecidos (MEIRELLES et al., 2009; MEIRELLES; NARDI, 2009; SORDI, 2009). Sua utilização é interessante, também, por serem facilmente isoladas, cultivadas, e manipuladas *ex vivo*.

As MSCs foram descritas, primeiramente, por FRIEDENSTEIN et al. (1976), os quais reportaram o isolamento de células precursoras fibroblastóides, não hematopoiéticas, derivadas da medula óssea de camundongos. Mais tarde, CAPLAN (1991) cunhou o termo células-tronco mesenquimais, e o acrônimo MSC, para designar esta população celular multipotente. Em 2005, foi publicado o posicionamento da Sociedade Internacional de Terapia Celular (HORWITZ et al., 2005) relativa à nomenclatura das MSCs. Os autores propuseram que as células aderentes ao plástico, até então denominadas células-tronco mesenquimais, fossem designadas como células estromais mesenquimais multipotentes, pois uma população celular só pode ser considerada constituída inteiramente por células-tronco se cada uma das células possuir a capacidade de auto renovação, e diferenciação, em múltiplas linhagens. Não há evidências de que cada uma das células que constituem a população de MSC cultivada tenha esta capacidade. No entanto, ambas as nomenclaturas ainda são utilizadas pela comunidade científica.

A presença das MSCs na medula óssea é baixa. Estima-se, por meio de ensaios de unidade formadora de colônia de fibroblastos (CFU-F), que haja 1 MSC para cada 34.000 células nucleadas de medula óssea humana (WEXLER et al., 2003). Em medula óssea murina foi estimada 1 MSC para cada 11.000 a 27.000 células nucleadas (MEIRELLES; NARDI, 2003). Porém, é possível aumentar a quantidade de MSC, expandindo-as *in vitro*.

Quando administradas *in vivo*, estas células apresentam a capacidade de enxerto, demonstrada tanto em tecidos lesados, como íntegros (ANJOS-AFONSO et al., 2004); e também, de diferenciação em células especializadas, como fibras musculares esqueléticas (FERRARI et al., 1998), cardiomiócitos (GOJO et al., 2003; LIECHTY et al., 2000), células

vasculares (GOJO et al., 2003), e células do SNC (AZIZI et al., 1998; ORTIZ et al., 2003). Elas podem se diferenciar em todas as células da linhagem mesodérmica; entretanto, a capacidade de se diferenciarem em células de outras linhagens, ainda se apresenta um tanto controversa na literatura.

Além da capacidade de diferenciação em tipos distintos de células em estágio final, uma segunda capacidade funcional tem sido destacada, ou seja, elas secretam amplo espectro de macromoléculas bioativas com propriedades imunorregulatórias, pró-angiogênicas, anti-apoptóticas e antifibróticas (MEIRELLES et al., 2009; MEIRELLES; NARDI, 2009). Assim, as MSCs são aptas a estruturar microambientes regenerativos no campo de lesão tecidual, quando administradas local, ou sistemicamente (CAPLAN, 2007). Desta forma, o emprego das MSCs em terapias regenerativas tem se mostrado muito atrativo, e, conseqüentemente, bastante utilizado pela comunidade científica, sendo considerada um dos tipos de células-tronco mais fortemente investigado e clinicamente testado (KARANTALIS; HARE, 2015).

As células circulantes da medula óssea e células precursoras podem migrar para órgãos tais como fígado e coração, como mostram os estudos feitos com camundongos quiméricos e pacientes (BAYES-GENIS et al., 2007; TEN HOVE et al., 2007). Porém, quando lesões crônicas causam danos permanentes, o reparo promovido pelas células-tronco endógenas, ou circulantes, pode não ser suficiente para manter a funcionalidade do órgão. Além disso, com o avanço da idade há um declínio da população destas células (BALLARD; EDELBERG, 2008); e, conseqüentemente, da capacidade regenerativa de pacientes com doenças crônico-degenerativas, justificando a necessidade da aplicação destas células como forma de terapia.

Dentre as doenças crônico-degenerativas passíveis de serem tratadas com as MSCs, as doenças cardíacas se classificam, seguramente, dentre as mais estudadas até o momento.

1.5. O INFARTO DO MIOCÁRDIO E CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

O uso das MSCs como abordagem terapêutica após o IM e na IC tem sido realizado tanto em nível experimental: camundongos (BOOMSMA et al., 2007; JIN et al., 2011; LI et al., 2010; ORLIC et al., 2001), ratos (DAI et al., 2005; DAVANI et al., 2003; GNECCHI et al., 2005, 2006), porcos (FEYGIN et al., 2007; LIM et al., 2006) e cães (HAMANO et al., 2002; VULLIET et al., 2004); bem como, mais recentemente, em seres humanos, com vários estudos em andamento (CHEN et al., 2004; KATRITSIS et al., 2005; GOLPANIAN et al., 2015; HARE et al., 2009; HELDMAN et al., 2014; MAZHARI; HARE, 2012; MATHIASSEN

et al., 2012; PERIN et al., 2015).

Os resultados dos estudos randomizados, duplo-cegos, placebo controlados, e dose-dependentes em pacientes com cardiomiopatia isquêmica tratados com MSC, autóloga e alogênica, demonstraram redução do tamanho do infarto, melhoria da qualidade de vida, da geometria ventricular, e da capacidade funcional pelo teste de 6 min de esteira (CHEN et al., 2006; GOLPANIAN et al., 2015; MAZHARI; HARE, 2012). Outros estudos observaram melhora da FE, menor frequência de episódios de taquicardia, e melhor função pulmonar (CHEN et al., 2006; DIB et al., 2009; HARE et al., 2009).

O estudo POSEIDON mostrou que o transplante alogênico não induziu rejeição do enxerto e demonstrou ausência de arritmia ventricular e melhora do LVEDV (MAZHARI; HARE, 2012). Outros ensaios clínicos também demonstraram segurança na utilização das MSCs como terapia para o IM, e nenhum paciente desenvolveu qualquer tipo de tumor (CHEN et al., 2006; KATRITSIS et al., 2005; HARE et al., 2009).

Estudos que avaliaram o transplante de MSC em modelos experimentais de IM mostraram: melhora da função cardíaca (BERRY et al., 2006; DAVANI et al., 2003; GNECCHI et al., 2006; KRAUSE et al., 2007; LIM et al., 2006; SCHULERI et al., 2008), da dilatação ventricular esquerda (BERRY et al., 2006), aumento da densidade vascular (DAVANI et al., 2003; JIANG et al., 2006; NAGAYA et al., 2004; TOMITA et al., 2002), da massa da parede ventricular (SMITS et al., 2005); redução da área de cicatrização (KOCHER et al., 2001; TOMITA et al., 1999), e aumento da densidade da cicatrização (SHAKE et al., 2002; TOMITA et al., 1999), aumento da mobilidade da parede regional (MAKINO et al., 1999), LVEDP (HU et al., 2007; NAGAYA et al., 2004), $+dp/dt$ e $-dp/dt$ (BERRY et al., 2006; LI et al., 2010; ORLIC et al., 2001), e fração de encurtamento (HU et al., 2007; KRAUSE et al., 2007; NAGAYA et al., 2004; PIAO et al., 2005). FEYGIN et al. (2007) demonstraram que o transplante de MSC, no modelo de IM em porco, melhorou o desempenho contrátil do miocárdio e reduziu o estresse da parede sistólica, resultando em significativa melhora bioenergética por mecanismos parácrinos de reparo. Outros trabalhos também mostraram melhora da contratilidade cardíaca (BOOMSMA et al., 2007; LI et al., 2010). Assim, as MSCs possuem grande potencial de aplicação clínica para promover a melhora da função inotrópica (ORLIC et al., 2001; SHAKE et al., 2002; TOMITA et al., 1999).

Estudo realizado por PAK et al. (2003) demonstrou que a administração de MSC de medula óssea, em corações infartados de porcos, resultou no aumento da inervação cardíaca, tanto nos átrios como nos ventrículos; e, também, na densidade da inervação simpática atrial

após 2 meses do tratamento. Usando anticorpos anti-tirosina hidroxilase (TH) eles encontraram alta densidade de nervos TH+ nos animais tratados com MSC, em comparação ao grupo tratado com meio de cultura. Outro estudo revelou que o transplante de MSC humana expressou maior nível de RNAm de fator β de crescimento neural em fibras simpáticas TH+ (KIM et al., 2010). Como o desenvolvimento de inervação cardíaca pode ter um papel significativo no reparo do miocárdio após o transplante de MSC, este assunto requer investigações mais profundas (WEN et al., 2011).

Apesar de todos os efeitos benéficos até agora demonstrados pelo transplante de MSC no IM, as evidências de aumento da inervação simpática indicam a necessidade de estudos mais acurados, especialmente relacionados com a modulação autonômica no coração.

Estudos avaliando a modulação autonômica cardíaca pós-transplantes de MSC são fundamentais para a segurança da utilização destas células em terapias celulares como forma de tratamento de várias patologias, especialmente o IM e IC. Além disso, os estudos da modulação autonômica cardíaca envolvendo o transplante de MSC em modelos de IC se apresentam como bastante oportunos, uma vez que estudos clínicos já se encontram em andamento. Até o presente momento, o exame acurado da literatura pertinente mostra que nenhum trabalho foi realizado visando a avaliação do tono autonômico, balanço simpatovagal, a variabilidade da FC e PA, e a sensibilidade do barorreflexo, quer em pacientes, quer em modelos experimentais de IC tratados com MSC.

Em síntese, o presente estudo teve por objetivo examinar na IC, utilizando o modelo experimental de IM em ratos, o efeito da administração de MSC sobre: o tono autonômico cardíaco, obtido pela administração de bloqueadores autonômicos, atropina e propranolol; a variabilidade de parâmetros cardiocirculatórios (PA e FC), por métodos lineares (no domínio do tempo e da frequência) e não lineares (Entropia e DFA); o controle barorreflexo da FC; a função e o remodelamento cardíaco.

2. OBJETIVOS

Avaliar em ratos com insuficiência cardíaca induzida por infarto do miocárdio o efeito do transplante das células-tronco mesenquimais sobre:

1. Tono autonômico cardíaco, avaliado pela administração de bloqueadores autonômicos, atropina e propranolol;
2. Variabilidade da frequência cardíaca, avaliada por métodos lineares no domínio do tempo e da frequência (análise espectral), e não lineares (DFA e Entropia);
3. Variabilidade da pressão arterial no domínio do tempo e da frequência (análise espectral);
4. Sensibilidade do barorreflexo, por meio do índice de sensibilidade do baroreflex cardíaco, determinado pela razão entre as alterações reflexas da FC e as alterações na PA;
** Os itens 1, 2, 3 e 4 foram estudados em animais acordados.*
5. Atividade elétrica cardíaca por meio da eletrocardiografia;
6. Extensão do infarto do miocárdio, por meio de avaliação por aquisição de imagens de tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT-Sestamib-Tc^{99m}) e histológica;
7. Remodelamento cardíaco, pelo acúmulo de colágeno e hipertrofia cardíaca;
8. Função cardíaca, por meio da Ventriculografia Radioisotópica.

3. MÉTODOS

Foram utilizados ratos da linhagem *Wistar*, adultos (220-360g), fornecidos pelo Biotério Central da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Foram utilizados, também, ratos *Wistar* machos de 200g como doadores das MSCs. Durante o estudo os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Fisiologia da FMRP/USP, em caixas individuais, com livre acesso à água e ração, e ciclo claro-escuro de 12 horas. Os protocolos experimentais estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da FMRP (nº protocolo no. 034/2012).

3.1. DESENHO EXPERIMENTAL

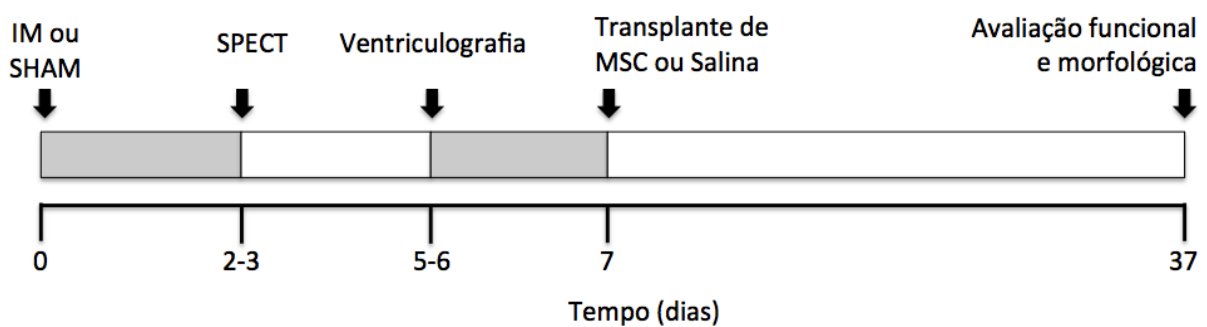


FIGURA 1. Diagrama do Protocolo Experimental para avaliação da função cardíaca e hemodinâmica, antes e após o transplante das MSCs.

3.2. ISOLAMENTO DE MSC DA MEDULA ÓSSEA

As MSCs foram obtidas, e isoladas, da medula óssea. Para isso, os animais foram rapidamente anestesiados pela inalação de isoflurano (*Isothane, Baxter, Bacter Healthcare of Puerto Rico, Guayama, Puerto Rico, EUA*), e sacrificados por deslocamento cervical. Logo a seguir, os dois fêmures, as duas tíbias e os dois úmeros, de cada animal, foram removidos, limpos, e colocados em placa com PBS-EDTA (pH = 7,2), sobre o gelo. Utilizando-se uma capela de fluxo laminar tipo 2-A, as epífises ósseas foram removidas, e as metáfises colocadas dentro de ponteiras plásticas estéreis. O conjunto foi introduzido em tubo *falcon* de 50 mL, e centrifugado, por 3 minutos, a 400 g. A medula óssea obtida foi ressuspensa em PBS-EDTA (pH = 7,2), e filtrada em *Millipore*[®] de 100 µm (*Millipore, Billerica, MA, EUA*). O filtrado foi colocado sobre uma camada de *Ficoll-Hypaque* (*Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO,*

EUA), e submetido à centrifugação a 400 g durante 40 minutos, de modo a se obter uma fração isolada de células mononucleares de medula óssea. Esta fração foi submetida a lavagens com PBS-EDTA, seguidas de centrifugação a 200 g, por 10 minutos, e ressuspensa em meio completo, composto por *DMEM* (*Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA*) contendo 10% de soro bovino fetal (*Life Technologies*) e 1% penicilina/estreptomicina (*Life Technologies*). As células foram plaqueadas em garrafas de poliestireno para cultura de 75 cm² (*Sarstedt Inc, Princeton, NJ, EUA*) na densidade de 4 x10⁵ células/cm². Os frascos de cultura foram, então, colocados em estufa a 37°C com 5% CO₂. Após 72 horas do plaqueamento foi realizada a primeira troca do meio de cultura, desprezando-se as células que não aderiram à superfície plástica das garrafas. As trocas do meio de cultura foram realizadas a cada 3-4 dias.

As células obtidas a partir do isolamento, plaqueadas, foram consideradas como passagem P0, e a cada replaqueamento as células avançavam uma passagem, prosseguindo para P1, depois para P2, e assim sucessivamente. Todos os procedimentos realizados utilizaram as MSCs na passagem P3.

3.3. REPLAQUEAMENTO DE MSC

Os frascos de cultura cujas MSCs atingiram confluência de 80-90% foram submetidos ao replaqueamento. Este, consistiu de remoção do meio de cultura, lavagem da superfície celular do frasco com PBS-EDTA (pH = 7,2), aplicação de tripsina-EDTA 0,25% (*Life Technologies*), na proporção de 0,02mL/cm², por 3 minutos, e neutralização de 3x o volume de tripsina-EDTA com meio completo. A seguir, as células obtidas foram centrifugadas a 200 g durante 10 minutos, ressuspensas em meio de cultura e, novamente, replaqueadas na densidade aproximada de 2x10⁴ células/cm². A seguir, os frascos de cultura foram rearmazenados na incubadora.

3.4. CARACTERIZAÇÃO DE MSC

As MSCs foram caracterizadas segundo critérios estabelecidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (DOMINICI et al., 2006; HORWITZ et al., 2005). Portanto, foi realizada a imunofenotipagem das células em cultura, indução de diferenciação, e análise morfológica da cultura, conforme a descrição a seguir.

3.4.1. IMUNOFENOTIPAGEM

A imunofenotipagem das MSCs foi realizada no Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro de Ribeirão Preto (SP). Para isso, alíquotas de 100 μL de MSCs a 1×10^6 células/mL, em P3, foram incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, com 1 μL de anticorpos monoclonais ou isotipos controles diretamente conjugados a fluorocromo (ficoeritrina (PE) ou isotiocianato de fluoresceína (FITC)). Foram feitas marcações simples utilizando anticorpos monoclonais para os seguintes marcadores: CD11b (*BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, EUA*, catálogo no. 554862), CD31 (*BD*, catálogo no. 555027), CD44 (*BD*, catálogo no. 550974), CD45 (*BD*, catálogo no. 554878) e CD90 (*BD*, catálogo no. 554894) e CD29 (*BD*, catálogo no. 555005). Após a incubação foi acrescentado 1 mL de PBS e as células foram centrifugadas por 5 min a 350 g. Em seguida, as mesmas foram ressuspensas em 200 μL de PBS e analisadas, imediatamente, no citômetro de fluxo FACSCalibur 4C (*Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, EUA*). Foram adquiridos 20.000 eventos por amostra. As análises foram realizadas utilizando-se o *software CellQuest (BD)*. Os eventos da *gate* de células viáveis (R1) foram representados por um histograma de fluorescência 2 (FL2, PE – ficoeritrina e FL3, FITC – isotiocianato de fluoresceína) com os parâmetros de tamanho (*FSC*) por granularidade (*SSC*) celular.

3.4.2. DIFERENCIAÇÃO CELULAR

As MSCs em cultura foram estimuladas, mediante protocolo específico, a se diferenciarem em osteoblastos e adipócitos.

3.4.2.1. Diferenciação Osteogênica

Para a indução de diferenciação *osteogênica*, as MSCs na terceira passagem foram plaqueadas em placas de cultura contendo 06 poços, em uma densidade de 3×10^3 células/cm². Dois dias após o plaqueamento, o meio completo foi substituído por meio de indução osteogênico, constituído por meio completo acrescido de 100 nM de dexametasona (*Sigma*), 50 μM ascorbato-2-fosfato (*Sigma*) e 10 mM de glicerol-fosfato (*Sigma*). O meio de indução osteogênica foi substituído, a cada 3-4 dias, e no 20º dia foi feita a análise da diferenciação.

A análise da diferenciação constituiu de remoção do meio de indução osteogênica,

fixação das células na placa por meio da utilização de Paraformaldeído 4% (PFA; *Sigma*), por 20 minutos, seguido pela aplicação, por 5 minutos, do corante *Alizarin Red S* (*Sigma*) em pH 4,1, o qual cora, em vermelho, a matriz extracelular mineralizada enriquecida de cálcio. As MSCs cultivadas em meio completo, sem indutores de diferenciação osteogênica, foram submetidas ao mesmo protocolo de coloração, e serviram como controle da diferenciação. Cada poço da placa foi fotografado em microscópio invertido com câmera acoplada (*Axioskop 2 Plus*, *Zeiss*, *Carl Zeiss*, *Alemanha*).

3.4.2.2. Diferenciação Adipogênica

Para a indução de diferenciação *adipogênica*, as MSCs na terceira passagem foram plaqueadas em placas de cultura contendo 6 poços, em uma densidade de 2×10^4 células/cm², e cultivadas até próximo da confluência de 100%. A seguir, o meio completo foi substituído por meio de indução adipogênico, constituído por meio completo acrescido de 100 µM de indometacina (*Sigma*) e 0,5 mM de isobutilmetilxantina (IBMX; *Sigma*). Após as gotículas lipídicas começarem a aparecer, foi acrescentado no meio 1 µM de dexametasona (*Sigma*) e 10 µg/mL de insulina (*Sigma*).

Após 3 semanas, foi realizada a análise da diferenciação. Esta consistiu da remoção do meio de indução adipogênica, fixação das células na placa, por meio da utilização de PFA 4% por 60 minutos, aplicação do corante *Oil Red O* (*Sigma*), por 5 minutos, para coloração dos vacúolos lipídicos, e aplicação do corante Hematoxilina de Harris, por 2 min, para corar o núcleo. As MSCs cultivadas em meio completo, sem indutores de diferenciação adipogênica, foram submetidas ao mesmo protocolo de coloração, e serviram como controle da diferenciação. Cada poço foi fotografado em microscópio invertido com câmera acoplada (*Axioskop 2 Plus*, *Zeiss*, *Carl Zeiss*, *Alemanha*).

3.5. INFARTO DO MIOCÁRDIO

A IC foi induzida pelo infarto do miocárdio (IM), como descrito por Pfeffer et al. (1979). Para isso, os animais foram anestesiados com ketamina (50 mg/kg, *ip*, União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, SP) e xilazina (10 mg/kg, *ip*, União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, SP), e submetidos à intubação orotraqueal para ventilação mecânica (*Advanced Safety Ventilator*, *Harvard Apparatus*, MA1 55-7059, *Holliston*, *MA*, EUA). Uma toracotomia esquerda, por incisão no terceiro espaço intercostal,

foi feita para expor o coração. O pericárdio foi aberto, o coração exposto, e o ramo descendente anterior da artéria coronária esquerda foi identificado, para, então, ser ligado com um fio de poliéster (4-0, Ethicon, São José dos Campos, SP), entre o fluxo arterial pulmonar e o átrio esquerdo. Em seguida, o tórax foi fechado. Ratos controles foram submetidos à cirurgia fictícia para o IM, ou seja, passaram por procedimentos semelhantes aos descritos acima, com exceção da ligadura da artéria coronária. Logo em seguida à cirurgia, o animal foi implantado com cateter de polietileno (PE-10/PE-50, *Intramedic, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, EUA*) na veia jugular esquerda. Ao final do procedimento o rato recebeu 0,7 mL/kg de peso corporal das seguintes: cloridrato de lidocaína 2% (Hipolabor, Belo Horizonte, MG, Brasil), por sua propriedade antiarrítmica, e de Pentabiótico Veterinário para animais de pequeno porte (Fort Dodge Saúde Animal, Campinas, SP, Brasil) para se prevenir infecções pós-operatória.

Dentre os animais submetidos ao IM foram selecionados, para estudo, apenas aqueles que apresentaram defeito de perfusão maior ou igual a 40%, determinado pela análise de imagem cintilográfica SPECT-Sestamibi-Tc99m (Tomografia computadorizada por emissão de fóton único) descrita a seguir.

Após uma semana do IM, os animais receberam o transplante de MSC ou salina, e foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

- A) Insuficiência Cardíaca (IC) + Salina;
- B) Insuficiência Cardíaca (IC) + MSC;
- C) SHAM + Salina

Os animais foram acompanhados durante cinco semanas após a indução do IM (ou cirurgia fictícia), pesados e submetidos ao protocolo experimental apresentado a seguir. Ao final, os animais foram sacrificados com uma sobredose de anestésico, e os corações removidos, pesados, e submetidos ao processamento histológico.

3.6. CINTILOGRAFIA DE PERFUSÃO MIOCÁRDICA COM SPECT-SESTAMIBI-TC^{99M} (TOMOGRÁFIA COMPUTADORIZADA POR EMISSÃO DE FÓTON ÚNICO)

Dois a três dias após a cirurgia da ligadura coronariana, a extensão da área infartada foi mensurada pela cintilografia de perfusão do miocárdio (*SPECT: single photon emission computed tomography*) conforme a técnica desenvolvida por MEJIA et al. (2010). Sob anestesia inalatória do isoflurano (*Isothane, Baxter, Bater Healthcare of Puerto Rico,*

Guayama, Puerto Rico, EUA: 5% para indução e 0,5 a 1,5% para manutenção) os ratos receberam 555 mBq de Sestamibi-Tc^{99m} (Cardiolite^R, Lantheus Medical Imaging, North Billerica, MA, EUA; e Piro-Tec, IPEN, SP, Brasil) pela veia jugular, ou peniana, e, após 90 minutos, foram colocados em um contensor cilíndrico, motorizado, e acoplado a um colimador do tipo "pinhole" adaptado a uma *gama-câmara* de uso clínico (DST - SMV America, Twinsburg OH, EUA). As imagens foram adquiridas entre duas aquisições planares em órbita circunferencial, 30 segundos por projeção, 40 projeções igualmente espaçadas em 360 graus. As projeções foram registradas em matriz de 128 x 128 elementos, e cada elemento com uma área de 3,4 x 3,4 mm. O fator de magnificação foi fixado em 6,3 para todos os experimentos, correspondendo a uma dimensão lateral do volume do objeto de 0,54 mm. As imagens foram processadas por um programa computacional especificamente desenvolvido para esta finalidade (MEJIA et al., 2010). Animais com defeito de perfusão inferior a 40% foram descartados dos grupos.

3.7. VENTRICULOGRAFIA RADIOISOTÓPICA

Para análise da função ventricular foram realizadas duas avaliações ventriculográficas: a primeira realizada 5-6 dias após a realização do exame com o SPECT, e a segunda, um mês após o transplante. Todos os animais foram anestesiados com isoflurano (conforme descrito na sessão anterior), e receberam injeção de 75 µg de pirofosfato de sódio (Piro-Tec; IPEN) na veia peniana. A seguir, os animais foram mantidos em repouso, por 15 minutos, com ventilação espontânea em ar ambiente. Após esse intervalo, os animais foram anestesiados, novamente, receberam nova injeção na veia peniana de 555 mBq de pertecnetato de Tecnécio^{99m} (IPEN) e foram levados à *gama-câmara* e posicionados em decúbito dorsal abaixo do detector. Foram implantados quatro eletrodos na hipoderme, posicionados nos quatro membros, para monitorização eletrocardiográfica.

A ventriculografia radioisotópica foi realizada utilizando-se uma *gama-câmara* de uso clínico (DST - SMV America, Twinsburg, OH, EUA) equipada com um colimador "pinhole" de abertura de 1,5 mm. Foram obtidas imagens em formato *Word*, matrizes de 64 x 64 *pixels*, sincronizadas com ECG, com janela de aceitação de 40% em torno do valor médio da duração do QRS, e 32 quadros por ciclo cardíaco. Foram adquiridos 200 quilocontagens por quadro. A janela de energia simétrica de 20% foi centrada no fotopico de energia do Tc^{99m} de 140 KeV. O tempo aproximado de aquisição foi de 10 a 15 min.

Para o processamento das imagens foi utilizado *software* comercialmente disponível

(*planar Gated blood Pool, SMV America*) em estação de trabalho dedicada. Após a detecção semiautomática das bordas do ventrículo esquerdo, com auxílio das imagens paramétricas de fase e de amplitude de variação de contagens, uma curva de tempo versus atividade foi gerada. A partir da curva foi calculada a fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE), expressa em valores percentuais (%), definida como a diferença entre os valores corrigidos para a radiação de fundo das contagens diastólicas e sistólicas finais, divididas pelo valor das contagens diastólicas finais.

3.8. ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA DE MSC NOS ANIMAIS

A administração única das MSCs da medula óssea na passagem P3 foi efetivada uma semana após a indução do IM em ratos Wistar, pela veia jugular, a qual havia sido cateterizada no dia da cirurgia de IM. A quantidade de células injetadas para cada animal foi de 2×10^6 . Para analisar a migração das células para o coração, inicialmente as MSCs foram marcadas com o corante fluorescente de membrana (*CM-Dil, Molecular Probes, EUA*). Para tal procedimento, a suspensão celular foi incubada com 20 mM do corante, por 5 minutos a 37°C, e 15 min a 4°C conforme especificações do fabricante (*Molecular Probes, EUA*). As células marcadas foram submetidas à lavagem (centrifugação a 200 g por 10 minutos a 4 °C), filtradas com *Millipore*[®] de 70 µm, e subsequente ressuspensão em solução salina num total de 8×10^6 células/mL. A seguir, as células foram injetadas *i.v.* em um volume de 250 µL por animal.

3.9. AVALIAÇÃO FUNCIONAL E MORFOLÓGICA APÓS O TRANSPLANTE DE MSC

Após 30 dias do transplante das MSCs, ou injeção de salina, os animais submetidos ao IM (ou ao IM fictício) foram avaliados de acordo com a descrição que se segue.

3.9.1. VENTRICULOGRAFIA RADIOISOTÓPICA

Foi repetido o exame de ventriculografia radioisotópica, conforme descrito acima.

3.9.2. REGISTRO ELETROCARDIOGRÁFICO E IMPLANTE DE ELETRODOS

Para avaliar as repercussões funcionais elétricas cardíacas, após anestésiar os animais com isoflurano, eletrodos foram inseridos no subcutâneo dos quatro membros, de modo a registrar as seis derivações eletrocardiográficas do plano frontal (D1, D2, D3, aVR, aVL e aVF), e na parede anterolateral do tórax, de modo a registrar seis derivações eletrocardiográficas no plano transversal (Derivações precordiais: V1, V2, V3, V4, V5 e V6). Os eletrodos foram conectados a um amplificador diferencial (CL-6 615422-1, *Gould Instruments Systems, Inc., OH, EUA*) para registro do ECG, tendo sido coletados 15 a 20 batimentos, continuamente, para cada derivação, amostrados em 2 kHz, em microcomputador equipado com interface analógico-digital (DI-220 *Dataq System, Akron OH, EUA*).

As seguintes variáveis do eletrocardiograma (ECG) foram analisadas: a) duração do intervalo RR (iRR); b) duração da onda P (dP); c) duração do intervalo PR (iPR); d) duração do complexo QRS (QRS); e) duração do intervalo QT (iQT); f) duração do intervalo QT corrigido segundo a equação de Bazett [$iQTc = iQT/\text{raiz}(iRR)$].

Logo após o registro das 12 derivações do ECG, ainda sob anestesia inalatória, os animais sofreram implantes de eletrodos subcutâneos formando uma derivação eletrocardiográfica semelhante à derivação I de Einthoven, para consecução do registro de ECG nos animais acordados. As extremidades dos fios dos eletrodos foram exteriorizadas e fixadas na região dorsal.

3.9.3. VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA E TONO AUTONÔMICO CARDÍACO

Após 48h do implante dos eletrodos estes foram conectados a um amplificador de ECG (8811A, *Bioelectric Amplifier, Hewlett Packard, EUA*; ou ML224, *ADInstruments, Sidney, Austrália*) conectado a uma interface analógico-digital (DI-220 *Dataq Instruments, Akron, OH, EUA*; ou ML866, *ADInstruments*) e acoplada em um microcomputador IBM/PC. Para a determinação da FC o ECG basal foi registrado durante 2 horas, e, no dia seguinte, durante mais 2 horas.

Para a determinação do balanço autonômico cardíaco os animais receberam bloqueadores de receptores autonômicos: metil-atropina (1 mg/kg, *i.v., Sigma*) e, após 15 minutos, propranolol (2 mg/kg, *i.v., Sigma*), após o registro basal. No dia seguinte, os animais receberam a administração dos bloqueadores autonômicos na ordem inversa, ou seja, o propranolol foi administrado antes da atropina, após o registro basal.

3.9.4. VARIABILIDADE DA PRESSÃO ARTERIAL E SENSIBILIDADE DO BARORREFLEXO

Após o segundo registro eletrocardiográfico, os ratos foram anestesiados com isoflurano e tiveram implantados cateteres de polietileno (PE-10/PE-50, *Intramedic, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, EUA*) na artéria e veia femorais, cujas extremidades foram exteriorizadas na região dorsal do pescoço, para registro da PA e administração de drogas, respectivamente. Após 24h, o cateter arterial foi acoplado a um transdutor de pressão (*Statham, modelo P23XL, Valley View, OH, EUA; ou MLT0380/D, ADInstruments*), e conectado a um amplificador (CL-6 615422-1, *Gould Instruments Systems Inc.; ou ML224, ADInstruments*). A PA foi registrada (1 kHz) durante 1 hora, em microcomputador equipado com interface de conversão analógico/digital (DI-220, *Dataq Instruments; ou ML866, ADInstruments*). Após o registro basal da PA foram administrados: fenilefrina (2 µg/kg, *iv, Sigma*) e nitroprussiato de sódio (16 µg/kg, *iv, Sigma*), nesta ordem, para análise da sensibilidade do barorreflexo.

Após os procedimentos descritos acima, os ratos foram pesados e anestesiados com Thiopentax (40 mg/kg, *i.p., Cristália, Itapira, SP*). Em seguida, a cavidade torácica foi aberta expondo o coração ainda pulsando. Os corações foram, então, removidos, banhados em solução salina (NaCl 0,9%), e pesados para o cálculo do índice de peso cardíaco (fórmula abaixo). Em seguida, os corações foram seccionados por dois cortes transversais, na porção médio-ventricular. Os fragmentos da porção médio-ventricular dos corações foram fixados em formaldeído e posteriormente submetidos ao processamento histológico. A porção superior-ventricular foi congelada em Tissue-tek® e processada para análise da migração das MSCs.

$$\text{Índice de Peso Cardíaco} = \frac{\text{Peso Cardíaco (mg)}}{\text{Peso Corporal (g)}}$$

3.9.5. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DO CORAÇÃO

Cortes histológicos dos corações fixados em formaldeído 10%, e embebidos em parafina, foram cortados em secções de 7 µm e coradas por hematoxilina e eosina (HE) e por

Picrosirius. As lâminas coradas por HE foram utilizadas na determinação da área infartada e análise morfométrica, enquanto as lâminas coradas com Picrosirius o foram para quantificação de colágeno.

A avaliação da área comprometida pelo infarto e as espessuras no VE foram mensuradas utilizando o software de domínio público “*Image J*” (*desenvolvido pelo National Institutes of Health*, disponível em <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>). A extensão do infarto foi determinada pela divisão do comprimento da área infartada pelo comprimento total do VE e expressa como porcentagem. Para determinar a espessura mínima da região infartada foi calculada a média de 3 medidas mínimas na região cicatrizada.

A análise morfométrica do diâmetro dos cardiomiócitos e a quantificação relativa de colágeno foram realizadas utilizando o programa Leica Qwin (*Leica Imaging Systems Ltd*, Cambridge, Inglaterra) em conjunto com um microscópio Leica (*DMR, Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar*, Inglaterra), videocâmara (*DC300F, Leica Microsystems AG, Heerbrugg*, Suíça) e um computador *on-line*. O aumento utilizado para o estudo foi de 400x. Para a determinação da hipertrofia, foram realizadas, por animal, aproximadamente 110 medidas nos miócitos que se apresentavam em disposição longitudinal, distribuídos por toda a circunferência septal; e obtido um valor médio por animal. A quantidade relativa de colágeno foi avaliada, morfometricamente, nas lâminas coradas com Picrosirius e foram medidos 15 campos por animais, selecionados aleatoriamente.

Para análise da migração das MSCs para o coração, o tecido cardíaco coletado congelado foi cortado em criostato em secções com espessura de 30 μm e analisados em microscopia de fluorescência (*DM5500 B, Leica Microsystems*).

3.10. ANÁLISE DOS DADOS

Os registros de ECG e PA foram processados por programa computacional específico (*LabChart 7 Pro, ADInstruments, Bella Vista, Austrália*), e, então, geradas séries temporais, batimento a batimento, do iRR, FC, PAS e PAM.

O tono simpático e o tono vagal sobre a FC foram determinados pelo bloqueio autonômico produzido pela injeção de propranolol e metil-atropina, respectivamente. A diferença entre a bradicardia registrada após 15 min da administração do propranolol e a FC basal, foi considerada como tono simpático cardíaco. Já a diferença entre a taquicardia registrada após 15 minutos da administração de metil-atropina e a FC basal, foi considerada como tono vagal cardíaco. Os valores da FC obtidos ao final do duplo bloqueio farmacológico

com a metil-atropina e propranolol foram considerados como a frequência cardíaca intrínseca de marca-passo (FIMP), ou seja, a frequência de auto despolarização do nodo sinoatrial, livre da influência do sistema nervoso autônomo.

As respostas de bradicardia, ou taquicardia, reflexas induzidas, respectivamente, pelo aumento da PA causado pela fenilefrina, e pela queda da PA produzida pelo nitroprussiato de sódio, foram utilizadas para o cálculo do índice de sensibilidade do barorreflexo cardíaco, determinado pela razão entre as alterações reflexas da FC e as alterações na PA ($\Delta FC/\Delta PAM$).

A análise da variabilidade no domínio da frequência para o iRR, e no domínio do tempo e da frequência para a PAS, foi realizada por um programa computacional específico desenvolvido em nosso laboratório (*CardioSeries* v2.4 – <http://www.danielpenteado.com>). Foram utilizados trechos das séries com valores de iRR e PAS do período basal de registro, com 15 minutos de duração, onde os valores se mantiveram dentro de relativa estacionariedade. Os valores foram reamostrados em 10 Hz (1 valor a cada 100 ms) por interpolação cúbica do tipo *spline*, para regularização do intervalo de tempo entre batimentos. As séries com 15 minutos, ou seja, 9001 valores interpolados de intervalo cardíaco foram divididas em 34 segmentos, com 512 valores cada, com sobreposição de 50 % (Protocolo de Welch).

A estacionariedade dos valores de cada segmento foi examinada visualmente, e aqueles segmentos com artefatos, ou transientes, foram excluídos. Cada segmento estacionário foi submetido à análise espectral pela Transformada Rápida de Fourier (FFT), após janelamento do tipo *Hanning*. Os espectros de intervalo cardíaco foram integrados em bandas de baixa (LF: 0,20 – 0,75 Hz) e alta frequência (HF: 0,75 – 3,00 Hz).

As médias das potências dos espectros, em ambas as bandas de frequência (LF e HF), foram utilizadas para expressar a potência de LF e HF do espectro do iRR e PAS para cada rato. Foi determinada a potência relativa (unidades normalizadas; nu) dos espectros, em cada banda de frequência, bem como a razão entre as potências de LF e HF (LF/HF) dos mesmos.

Para as medidas não lineares foram aplicadas a entropia amostral (RICHMAN; MOORMAN, 2000) e a análise de flutuação depurada de tendências (DFA) (PENG et al., 1995). Para o DFA, o expoente α foi calculado para todas as janelas de tamanho “n”. Para a entropia amostral, os parâmetros foram ajustados para $m=2$ e $r=15\%$ do desvio padrão da série. Todos os índices dos métodos, no domínio do tempo e não lineares, foram calculados utilizando o *software* customizado *JBio* (DUQUE et al., 2013).

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são expressos como média \pm EPM. Comparação entre grupos foi feita por meio de teste t pareado e não pareado. Para comparações múltiplas, os dados foram analisados pelo Modelo Geral Linear (GLM) do software SAS (SAS *Institute Inc.*, Cary, NC, EUA). O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

Foram estudados 51 ratos Wistar machos, dentre os quais, seis foram usados para a extração das MSCs de medula óssea. Dos 45 animais, 14 constituíram o grupo SHAM, submetidos à cirurgia fictícia da ligadura da artéria coronária, e os outros 31 animais foram submetidos, de fato, à ligadura, constituindo os grupos “IC”. Destes animais, 16 receberam salina e foram denominados de grupo IC + Salina, e 15 receberam MSC como tratamento, compondo o grupo IC + MSC.

4.1. CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

4.1.1 IMUNOFENOTIPAGEM

A caracterização imunofenotípica das culturas de MSC de medula óssea de ratos Wistar, em terceira passagem, demonstrou a expressão de marcadores característicos destas células, segundo os critérios definidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular, tais como: CD90 (96,07%), CD29 (95,89%) e CD44 (40,7%). Encontrou-se um número exíguo de células expressando o marcador pan-hematopoético CD45 (1,86%), de marcador de macrófagos CD11b (0%) e marcador de células endoteliais CD31 (0,38%), indicando cultura de MSC praticamente livre de contaminação por células das linhagens hematopoiética e endotelial (Figura 2).

4.1.2 PLASTICIDADE

Com a finalidade de se avaliar a plasticidade *in vitro* das MSCs, as mesmas foram testadas quanto à sua capacidade de diferenciação em osteoblastos e adipócitos. Após o cultivo em meio indutor de diferenciação osteogênica, as MSCs se diferenciaram em osteoblastos, formando depósitos de compostos de cálcio os quais foram corados por *Alizarin Red* (Figura 3A). Nenhuma matriz extracelular calcificada foi encontrada nas culturas de controle osteogênica (Figura 3B). A coloração *Oil Red* revelou a presença de depósitos lipídicos (corados em alaranjado) no citoplasma das MSCs cultivadas em meio indutor de diferenciação adipogênica, indicando sua diferenciação em adipócitos (Figura 3C). As culturas de controle adipogênica não apresentaram vacúolos lipídicos (Figura 3D).

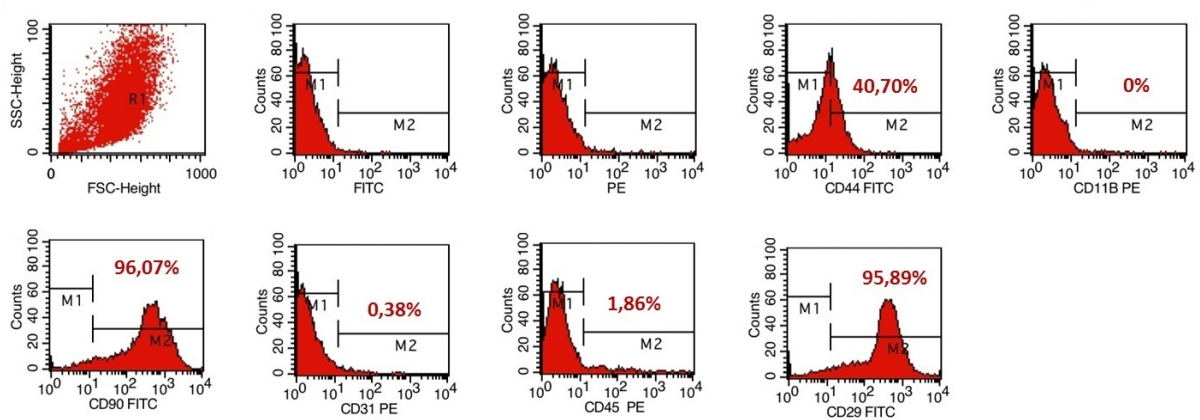


FIGURA 2. Perfil imunofenotípico das células-tronco mesenquimais (MSC) avaliado por citometria de fluxo. Percentual médio de células derivadas da medula óssea em terceira passagem, positivas para os marcadores de superfície celular CD29, CD90 e CD44, tipicamente expressos nas MSCs. SSC: *side scatter* (granulosidade), FSC: *forward scatter* (tamanho), *Counts*: contagem.

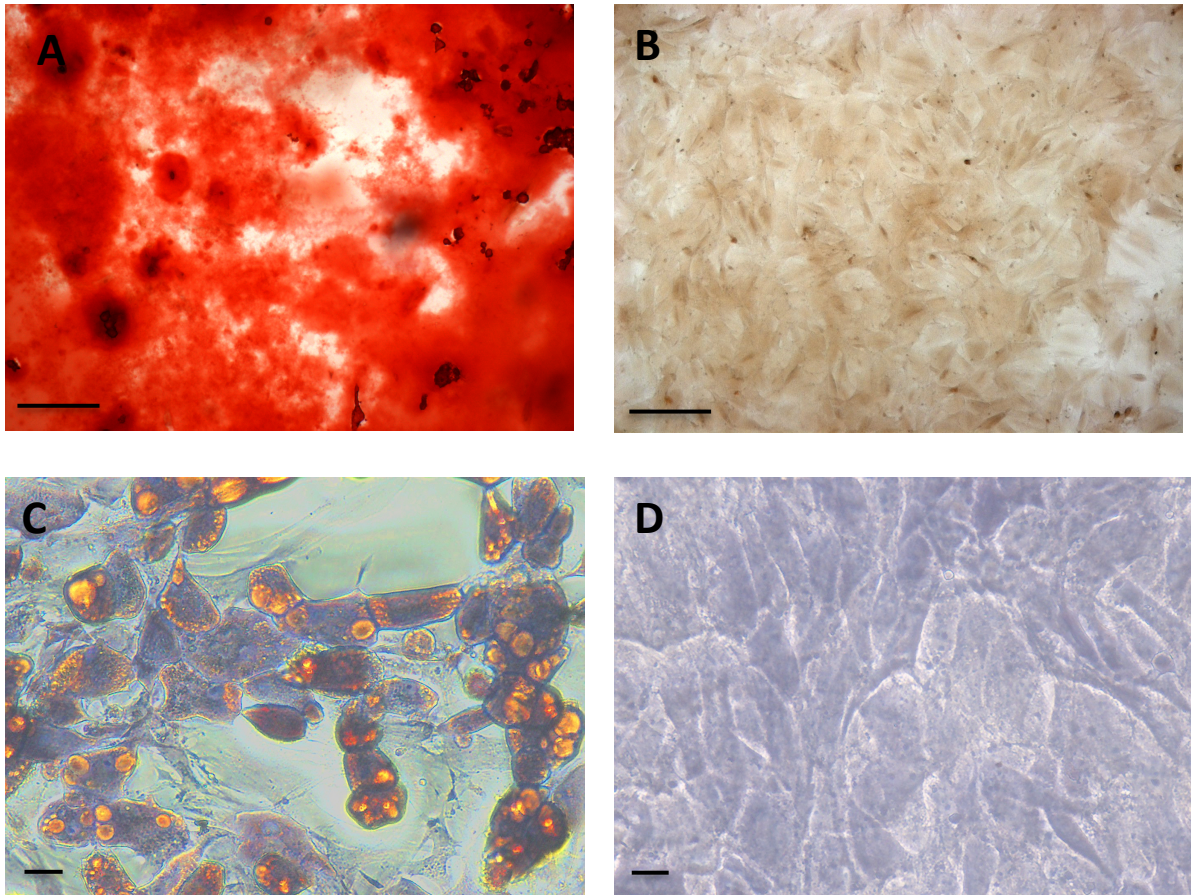


FIGURA 3. Fotomicrografias da diferenciação das células-tronco mesenquimais (MSC) em terceira passagem, *in vitro*, em osteoblastos e adipócitos. **Painel A:** A coloração *Alizarin Red* evidencia a presença de depósitos de cálcio e mostra a diferenciação osteoblástica das MSCs, após seu cultivo em meio indutor de diferenciação osteogênica. **Painel B:** Cultura controle osteogênica na qual as MSCs não foram cultivadas em meio indutor de diferenciação osteogênica, e coradas com *Alizarin Red*. **Painel C:** A coloração com *Oil Red* evidenciou a presença de depósitos lipídicos, proeminentes no citoplasma das células, indicando a diferenciação das MSCs em adipócitos, após seu cultivo em meio indutor de diferenciação adipogênica. **Painel D:** Cultura controle adipogênica na qual as MSCs não foram cultivadas em meio de diferenciação adipogênica, e foram coradas com *Oil Red* e Hematoxilina. (A e B: Aumento de 100x, barra de 200 μm ; C e D: Aumento de 400x, barra de 50 μm).

4.1.3 MORFOLOGIA

As MSCs apresentaram, *in vitro*, morfologia fibroblastóide característica destas células, a qual se manteve durante várias passagens em cultura (Figura 4).

4.1.4 MARCAÇÃO DA MSC

Para analisar a migração das MSCs, estas foram marcadas com o corante *CM-Dil* imediatamente antes de serem transplantadas. A análise em microscopia de fluorescência de amostra destas células injetadas, cultivadas *in vitro*, demonstrou a marcação do corante (Figura 5). Após um mês do transplante, não foram identificadas MSCs marcadas no coração dos animais tratados.

4.2 CINTILOGRAFIA MIOCÁRDICA DE PERFUSÃO COM SPECT-SESTAMIBI-TC^{99M} (SPECT: TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA POR EMISSÃO DE FÓTON ÚNICO)

A avaliação da perfusão miocárdica foi realizada pela aquisição de imagens tomográficas por emissão de fóton único (SPECT), para mensuração do tamanho do infarto antes do tratamento com MSC ou salina. Demonstrou-se que ambos os grupos, previamente ao tratamento, apresentaram áreas de lesão semelhantes após o IM (IC + Salina: $51 \pm 2\%$ e IC + MSC: $51 \pm 2\%$) (Figuras 6 e 7). Os animais controles (SHAM), submetidos à cirurgia fictícia da ligadura coronariana, não apresentaram, como esperado, defeito de perfusão (Figuras 6 e 7).

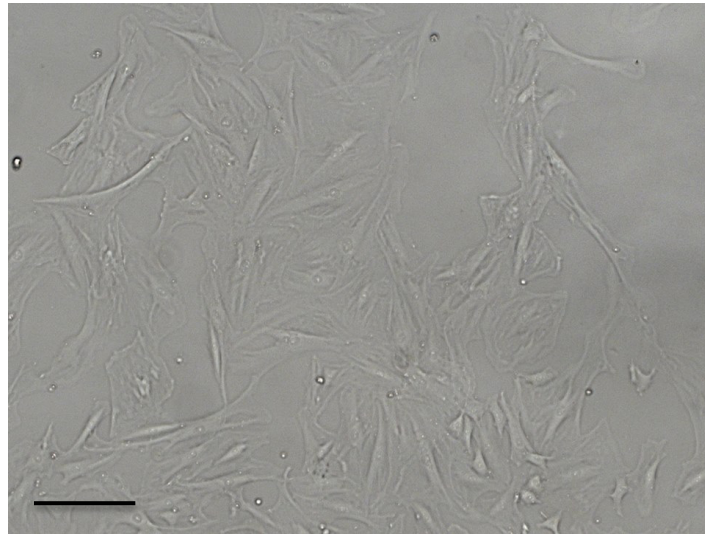


FIGURA 4. Fotomicrografia das células-tronco mesenquimais (MSC) em cultura, na terceira passagem, demonstrando morfologia fibroblástóide. Aumento de 100x. Barra: 200 μm .

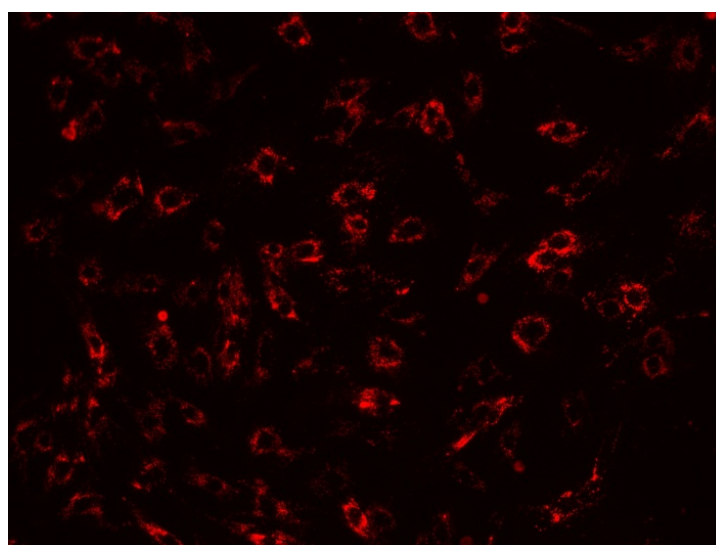


FIGURA 5. Fotomicrografia das células-tronco mesenquimais (MSC), em vermelho, marcadas com o corante *CM-Dil*. Aumento de 100x.

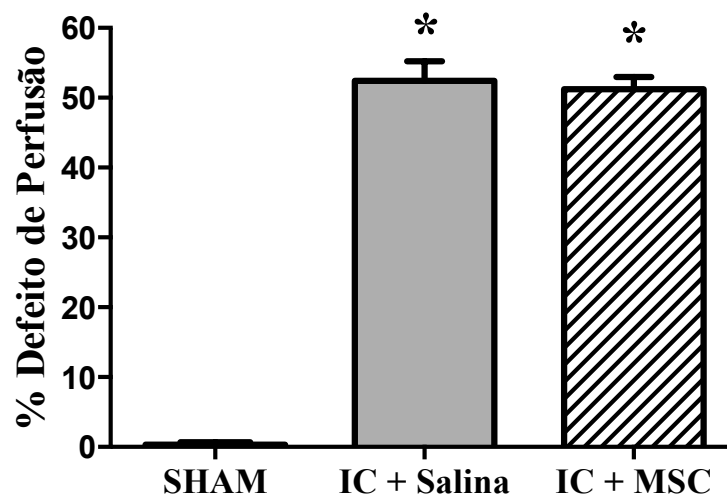


FIGURA 6. Tamanho do infarto (% do defeito de perfusão) determinado pelo SPECT (Tomografia computadorizada por emissão de fóton único) após a cirurgia fictícia nos animais controles (SHAM), e após a ligadura da artéria coronária esquerda nos animais com insuficiência cardíaca (IC), antes do tratamento com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC). Grupos: SHAM (n = 14); IC + Salina (n = 16); IC + MSC (n = 15). * $p < 0,05$ comparado ao grupo SHAM.

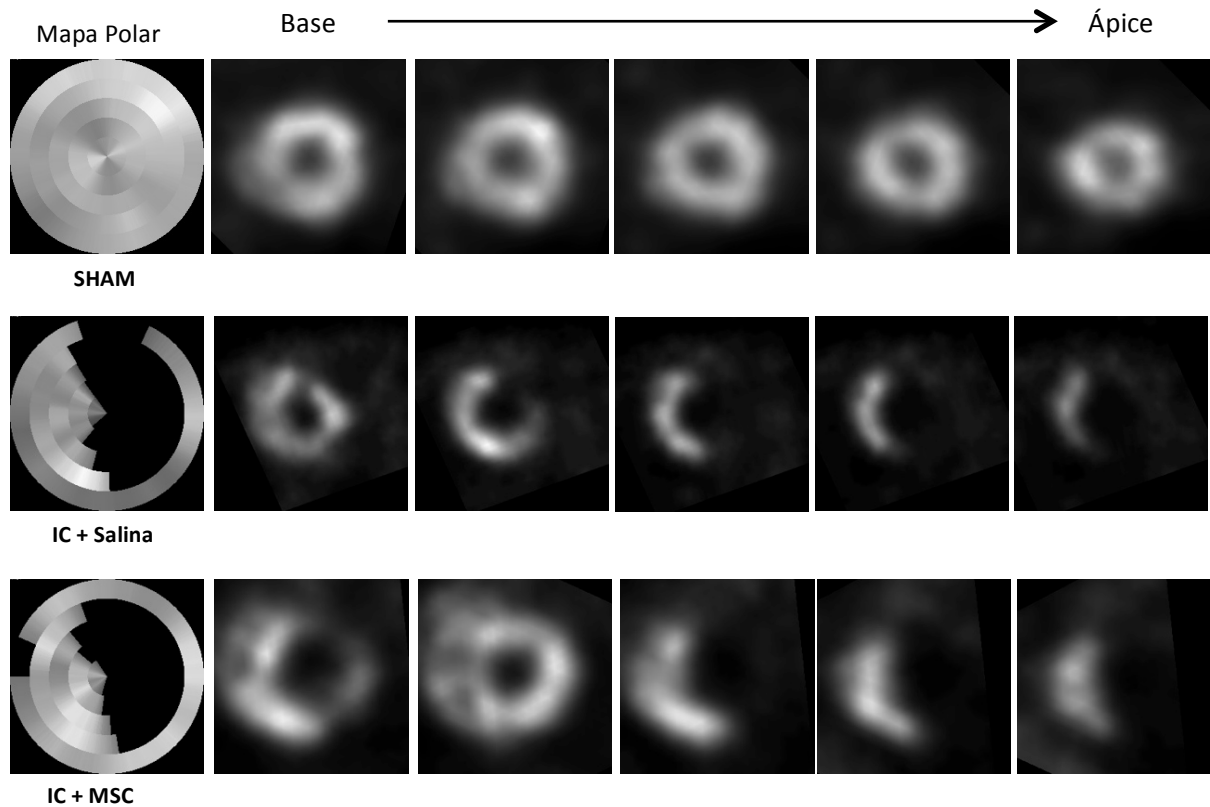


FIGURA 7. Imagens cintilográficas de perfusão miocárdica, obtidas pelo SPECT (Tomografia computadorizada por emissão de fóton único), após a cirurgia fictícia nos animais controles (SHAM), e após a ligadura da artéria coronária esquerda nos animais com insuficiência cardíaca (IC), antes do tratamento com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC). O Mapa Polar representa, na coluna vertical à esquerda, o coração como um todo. Cortes segmentados da base ao ápice do coração estão representados nas colunas horizontais. A área escura contida no círculo prata representa a lesão cardíaca.

4.3 VENTRICULOGRAFIA RADIOISOTÓPICA

A função ventricular foi examinada pela Ventriculografia Radioisotópica. Verificou-se redução da FEVE após a ligadura coronariana, e previamente ao tratamento com salina ($21 \pm 3\%$) ou MSC ($18 \pm 2\%$), quando comparada aos animais controles ($48 \pm 5\%$) (Figura 8A). Um mês após o tratamento com MSC, ou salina, não houve melhora da FEVE em ambos os grupos com IC (IC + MSC: $20 \pm 4\%$ e IC + Salina: $20 \pm 2\%$) quando comparada com o grupo controle ($54 \pm 3\%$) (Figura 8B). O grupo controle não apresentou variação da FEVE antes e um mês após a administração de salina ($48 \pm 5\%$ antes *versus* $54 \pm 3\%$ após a administração) (Figuras 9A). Da mesma maneira, os grupos com IC tratados com salina ($21 \pm 3\%$ antes *versus* $20 \pm 2\%$ após a administração) ou com MSC ($18 \pm 2\%$ antes *versus* $20 \pm 4\%$ após a administração), não apresentaram alteração da FEVE antes e um mês após o tratamento (Figura 9B e 9C).

4.4 REGISTRO ELETROCARDIOGRÁFICO

Para o acesso às consequências da IC e o efeito das MSCs na atividade elétrica cardíaca, o ECG foi realizado, após um mês do tratamento, com os animais anestesiados. Os valores médios (\pm erro padrão) dos parâmetros eletrocardiográficos estão mostrados na Tabela 1. O prolongamento do intervalo QRS foi observado no grupo IC não tratado, comparado ao grupo controle. No entanto, este prolongamento não foi observado com o tratamento pelas MSCs. Observou-se, também, aumento nos intervalos QT e QTc dos grupos com IC, tratados ou não com MSC, comparados ao grupo controle. Os demais parâmetros eletrocardiográficos foram similares entre os três grupos (Tabela 1).

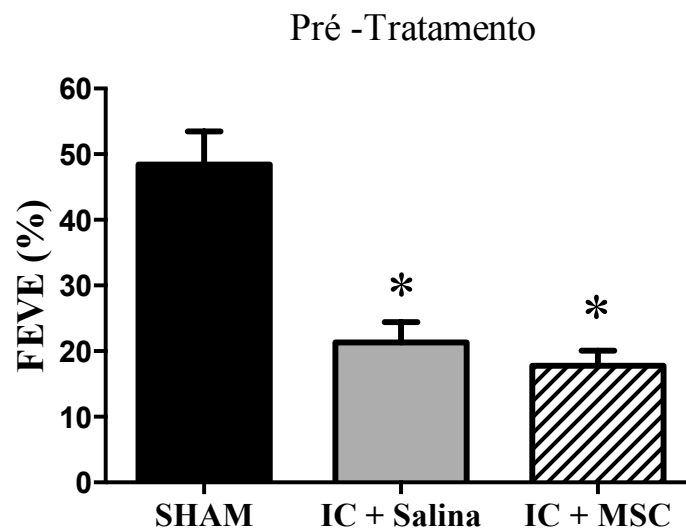
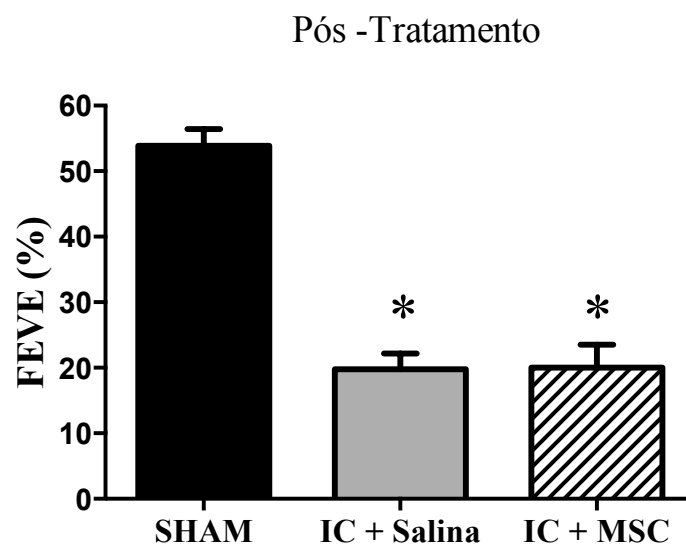
A**B**

FIGURA 8. Fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) determinada por Ventriculografia Radioisotópica. **Painel A:** antes (pré-tratamento) e **Painel B:** um mês após o tratamento (pós-tratamento) dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC). Grupos: SHAM (n = 9); IC + Salina (n = 9); IC + MSC (n = 7). * $p < 0,05$ comparado ao grupo SHAM.

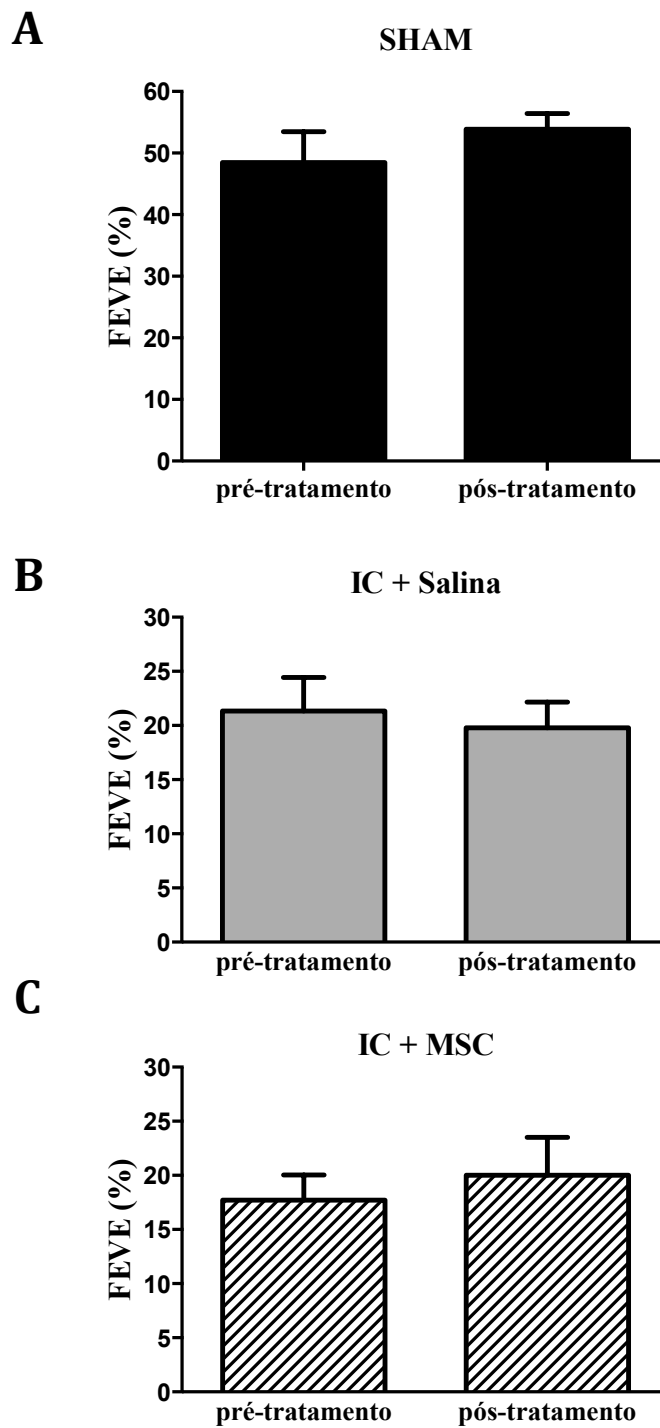


FIGURA 9. Fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE), determinada por meio da Ventriculografia Radioisotópica, antes (pré-tratamento) e um mês após o tratamento (pós-tratamento). **Painel A:** grupo controle (SHAM); **Painel B:** grupo com insuficiência cardíaca (IC) tratado com salina; e **Painel C:** grupo com insuficiência cardíaca (IC) tratado com células-tronco mesenquimais (MSC). Grupos: SHAM (n = 9); IC + Salina (n = 9); IC + MSC (n = 7).

TABELA 1. Parâmetros eletrocardiográficos dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC). Os parâmetros eletrocardiográficos são expressos como média \pm erro padrão da média (EPM).

	SHAM (n = 7)	IC + Salina (n = 7)	IC + MSC (n = 8)
iPR (ms)	58,2 \pm 1,4	61,2 \pm 1,9	61,1 \pm 2,7
dP (ms)	29,9 \pm 1,2	29,7 \pm 2,5	29,2 \pm 2,6
dQRS (ms)	24,9 \pm 1	30,1 \pm 1,7 *	29,6 \pm 1,7
iQT (ms)	84,8 \pm 2,4	96,1 \pm 1,3 *	99,2 \pm 2,5 *
iQTc (ms)	197 \pm 3,2	227,5 \pm 4,9 *	226,3 \pm 4,9 *

iRR: intervalo RR; FC: frequência cardíaca; iPR: intervalo PR; dP: duração da onda P; dQRS: duração do complexo QRS; iQT: intervalo entre o início do QRS e o ápice da onda T; iQTc: iQT corrigido pela fórmula de Bazett. * $p < 0,05$ em relação ao grupo SHAM.

4.5. VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA (VFC)

A VFC permite examinar a modulação autonômica no coração e nos vasos. A tabela 2 mostra os resultados da VFC no domínio do tempo. O intervalo RR (iRR) basal não diferiu entre os grupos. A análise da VFC no domínio do tempo mostrou redução no SDNN e RMSSD do grupo IC não tratado, o que não foi observado no grupo que recebeu MSC. A VFC analisada no domínio da frequência (tabela 3) mostrou que, em valores absolutos, o grupo IC não tratado apresentou menor potência da banda LF e maior potência da banda HF em comparação ao grupo controle, enquanto que o grupo tratado com MSC exibiu maior potência das bandas LF e HF quando comparadas ao grupo IC não tratado (Tabela 3, Figura 10). Em valores normalizados, a potência da banda LF não diferiu entre os grupos, assim como a razão LF/HF (Tabela 3, Figura 10). A análise por métodos não lineares da VFC (Tabela 4) mostrou aumento no DFA no grupo IC não tratado, e as MSCs impediram este aumento no grupo tratado. Por outro lado, a entropia foi reduzida no grupo IC não tratado, entretanto, esta redução não foi observada no grupo IC tratado com MSC.

4.6. VARIABILIDADE DA PRESSÃO ARTERIAL (PA)

A variabilidade da PA permite analisar a modulação autonômica na atividade vasomotora. Os níveis basais da pressão arterial sistólica (PAS) e média (PAM) estão apresentados na Tabela 3. A PAS e PAM encontram-se reduzidas nos grupos com IC, tratados ou não com MSC. A variabilidade da PAS no domínio do tempo apresentou redução do SDNN em ambos os grupos IC; e no domínio da frequência, os animais com IC exibiram uma menor potência da banda de LF do espectro da PAS em relação aos controles (Tabela 3).

TABELA 2. Índices de variabilidade da frequência cardíaca (VFC) no domínio do tempo: intervalo RR (ms), SDNN (ms) e RMSSD (ms) dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC).

	SHAM	IC + Salina	IC + MSC
	(n = 9)	(n = 10)	(n = 8)
iRR (ms)	190 ± 4	187 ± 4	195 ± 4
SDNN (ms)	7,7 ± 0,7	4,9 ± 0,4 *	6,8 ± 1,3
RMSSD (ms)	5 ± 0,4	3,4 ± 0,4 *	4,7 ± 1

SDNN: desvio padrão de intervalos RR; e RMSSD: raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RR normais adjacentes. * p<0,05 em relação ao grupo SHAM.

TABELA 3. Índices de variabilidade da frequência cardíaca (VFC) no domínio da frequência (análise espectral): valores das potências das bandas de baixa (LF) e de alta (HF) frequência, e razão LF/HF dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC).

	SHAM	IC + Salina	IC + MSC
	(n = 9)	(n = 10)	(n = 6)
LF abs (ms²)	1,64 ± 0,34	0,48 ± 0,09 *	1,55 ± 0,69 #
HF abs (ms²)	6,53 ± 1,03	2,57 ± 0,57 *	5,3 ± 1,28 #
LF nu	18,38 ± 2,69	16,18 ± 1,55	20,82 ± 2,64
LF/HF	0,29 ± 0,06	0,22 ± 0,03	0,32 ± 0,06

Abs: Valor absoluto; nu: unidade normalizada. * p<0,05 em relação ao grupo SHAM; # p<0,05 em comparação com o grupo de IC + Salina.

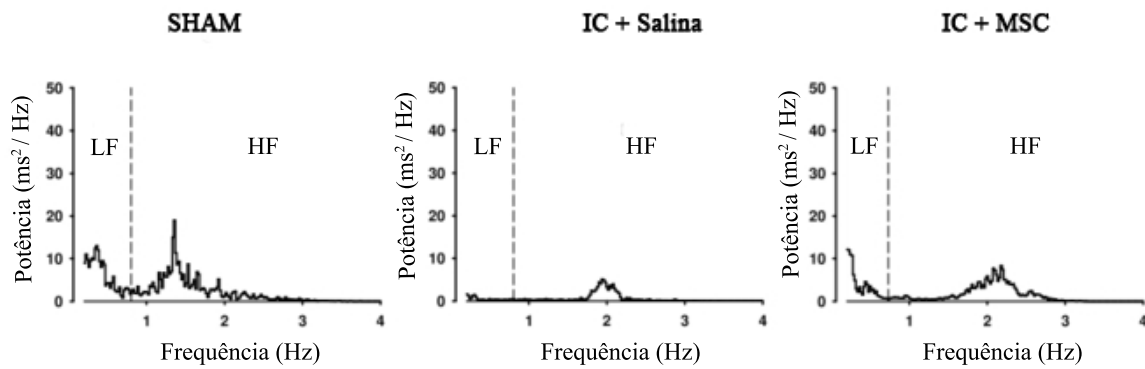


FIGURA 10. Espectro representativo da variabilidade da frequência cardíaca (VFC), no domínio da frequência (análise espectral), dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC).

TABELA 4. Índices dos métodos não lineares da variabilidade da frequência cardíaca (VFC): DFA (análise de flutuação depurada de tendências) e Entropia dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC).

	SHAM (n = 9)	IC + Salina (n = 10)	IC + MSC (n = 6)
DFA	1,12 ± 0,01	1,18 ± 0,02 *	1,12 ± 0,03 #
Entropia	1,32 ± 0,06	0,98 ± 0,05 *	1,08 ± 0,15

* p<0,05 em relação ao grupo SHAM; # p<0,05 em comparação com o grupo de IC + Salina.

TABELA 5. Pressões arteriais, média (PAM) e sistólica (PAS), e índices de variabilidade da pressão arterial no domínio do tempo (SDNN) e da frequência (LF), dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC).

	SHAM (n = 9)	IC + Salina (n = 12)	IC + MSC (n = 8)
PAM (mmHg)	107 ± 4	88 ± 2*	94 ± 2*
PAS (mmHg)	121 ± 5	100 ± 2*	104 ± 2*
SDNN (mmHg)	4,6 ± 0,2	3,3 ± 0,1*	3,5 ± 0,2*
LF (mmHg²)	4,3 ± 0,9	1 ± 0,2*	1,5 ± 0,3*

Valores são apresentados como média ± EPM. SDNN: desvio padrão de intervalos RR; LF: banda de baixa frequência. * p<0,05 em relação ao grupo SHAM.

4.7. CONTROLE AUTONÔMICO CARDÍACO E FREQUÊNCIA INTRÍNSECA DE MARCAPASSO (FIMP)

A função autonômica cardíaca foi avaliada pela resposta bradicárdica após a administração de propranolol (tono simpático cardíaco), e resposta taquicárdica após a administração de metil-atropina (tono vagal cardíaco). Foi observado menor tono vagal no grupo IC não tratado em comparação ao grupo controle (53 ± 7 bpm *versus* 84 ± 7 bpm), enquanto o tratamento com MSC aumentou o tono vagal (97 ± 10 bpm) (Figura 11). O tono simpático não apresentou diferença entre os grupos (SHAM: -9 ± 3 bpm, IC + Salina: -14 ± 3 bpm e IC + MSC: -11 ± 4 bpm) (Figura 12).

Após o duplo bloqueio farmacológico, obteve-se a FC desprovida da modulação autonômica, ou seja, a FIMP. As figuras 13 e 14 mostram, respectivamente, a FC basal e FIMP dos grupos controle e IC, tratado, ou não, com MSC. A FC basal não diferiu entre os grupos (SHAM: 313 ± 6 bpm, IC + Salina: 313 ± 6 bpm e IC + MSC: 300 ± 6 bpm) (Figura 13). Entretanto, observou-se redução da FIMP no grupo IC não tratado (344 ± 5 bpm) em comparação ao SHAM (365 ± 7 bpm), enquanto o tratamento com MSC preservou esta atenuação na IC (371 ± 7 bpm) (Figura 14).

4.8. SENSIBILIDADE DO BARORREFLEXO

A sensibilidade do barorreflexo, determinada pela razão entre as alterações reflexas da FC e as alterações na PA em resposta à administração de fenilefrina ou nitroprussiato de sódio, está apresentada nas Figuras 15 a 17. A sensibilidade do barorreflexo em resposta à bradicardia foi menor no grupo IC não tratado ($0,98 \pm 0,19$ bpm/mmHg) em comparação aos animais controles ($1,81 \pm 0,22$ bpm/mmHg) (Figura 15 e 17). A terapia com MSC aumentou a sensibilidade barorreflexa às respostas bradicárdica ($1,74 \pm 0,21$ bpm/mmHg) e taquicárdica ($3,02 \pm 0,53$ bpm/mmHg) em relação ao grupo IC não tratado ($0,98 \pm 0,19$ e $1,71 \pm 0,34$ bpm/mmHg, respectivamente). Na resposta bradicárdica, os animais controles ($2,32 \pm 0,33$ bpm/mmHg) não diferenciaram dos animais com IC (Figura 16).

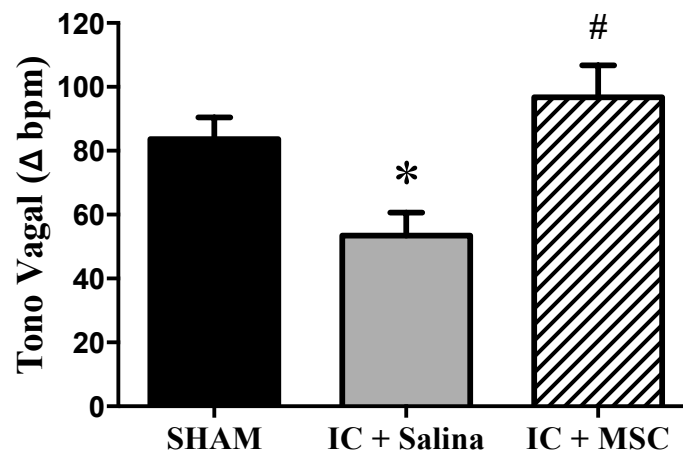


FIGURA 11. Tono vagal (Δ frequência cardíaca em bpm) dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC). Grupos: SHAM (n = 14); IC + Salina (n = 13); IC + MSC (n = 11). * p<0,05 em relação ao grupo SHAM; # p< 0,05 em relação ao grupo IC + Salina.

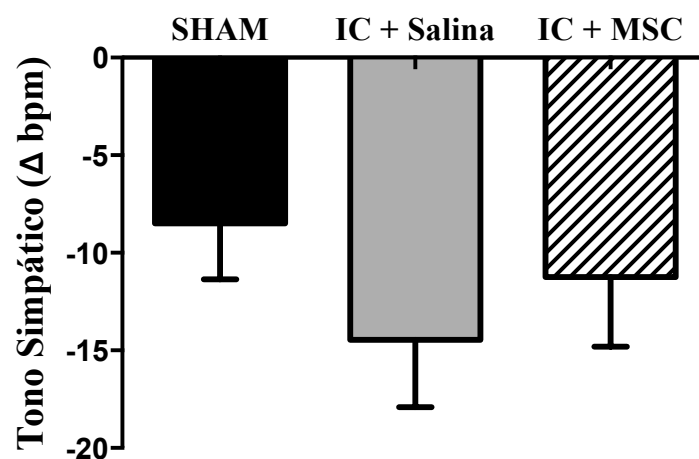


FIGURA 12. Tono simpático (Δ frequência cardíaca em bpm) dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC). Grupos: SHAM (n = 8); IC + Salina (n = 11); IC + MSC (n = 8).

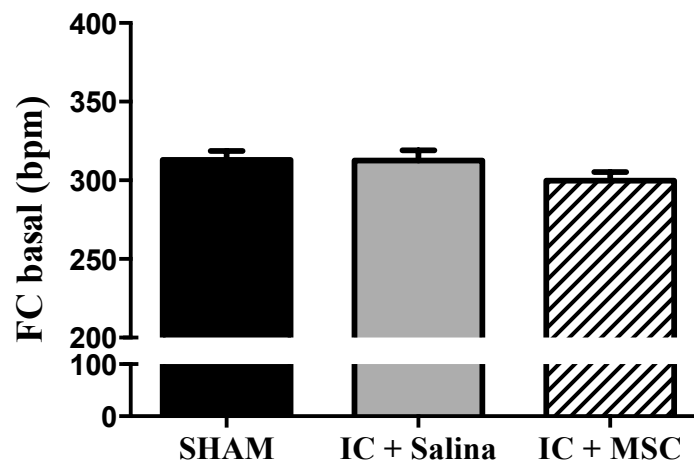


FIGURA 13. Frequência cardíaca (FC) basal de animais acordados dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC). Grupos: SHAM (n = 14); IC + Salina (n = 13); IC + MSC (n = 11).

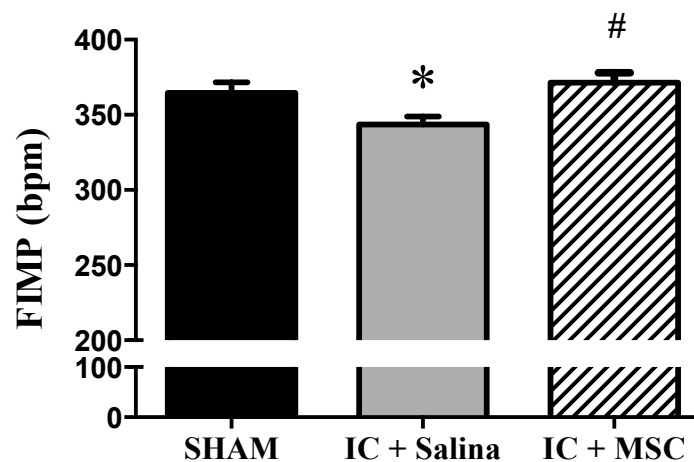


FIGURA 14. Frequência cardíaca intrínseca de marca-passo (FIMP), de animais acordados, após o duplo bloqueio farmacológico com metil-atropina e propranolol, nos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC). Grupos: SHAM (n = 14); IC + Salina (n = 13); IC + MSC (n = 11). * $p < 0,05$ em relação ao grupo SHAM; # $p < 0,05$ em comparação com o grupo de IC + Salina.

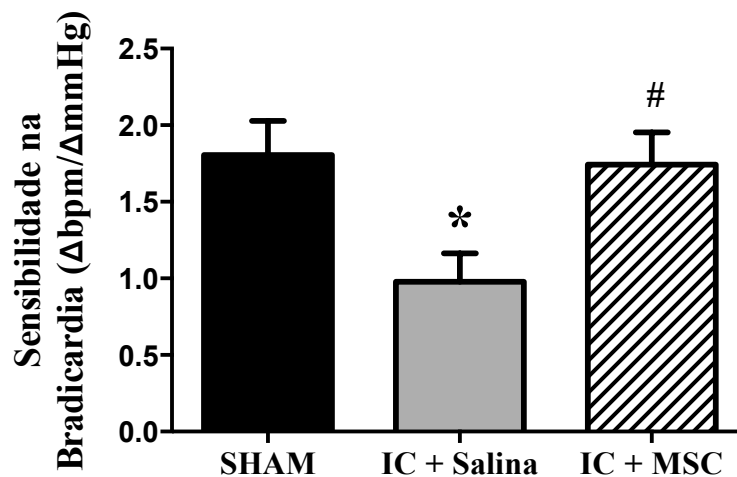


FIGURA 15. Índice barorreflexo ($\Delta FC/\Delta PAM$ bpm/mmHg) da resposta bradicárdica reflexa dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC). Grupos: SHAM (n = 5); IC + Salina (n = 7); IC + MSC (n = 4). * $p < 0,05$ em relação ao grupo SHAM; # $p < 0,05$ em comparação com o grupo de IC + Salina.

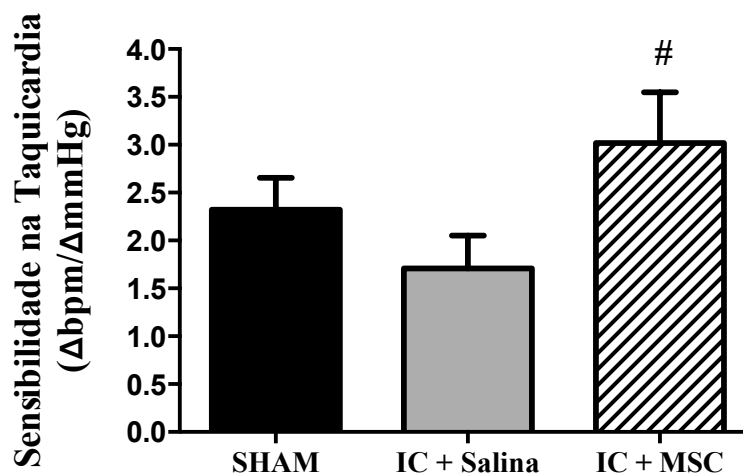


FIGURA 16. Índice barorreflexo ($\Delta FC/\Delta PAM$ bpm/mmHg) da resposta taquicárdica reflexa dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC). Grupos: SHAM (n = 6); IC + Salina (n = 5); IC + MSC (n = 4). * $p < 0,05$ em relação ao grupo SHAM; # $p < 0,05$ em comparação com o grupo de IC + Salina.

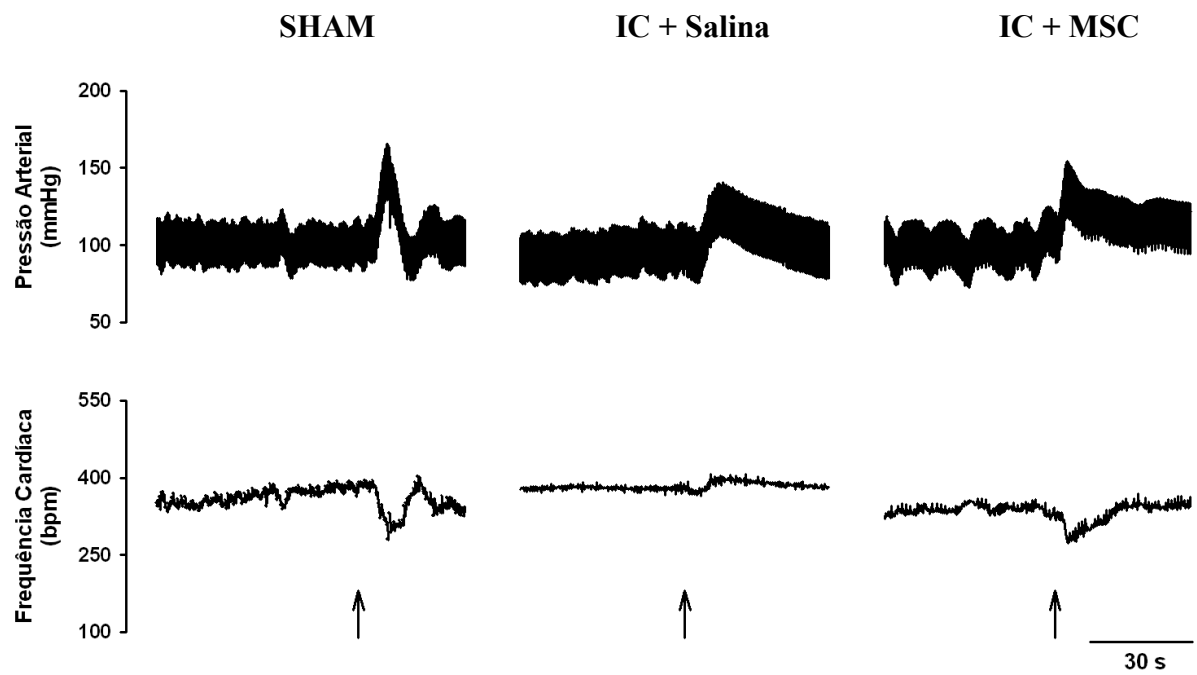


FIGURA 17. Traçados ilustrativos da pressão arterial sistólica (PAS) e frequência cardíaca (FC), da resposta bradicárdica à administração de fenilefrina, de um animal representativo dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC).

4.9 ANÁLISE HISTOLÓGICA DO CORAÇÃO

Extensão da área isquêmica. Após um mês de terapia com MSC, observou-se redução significativa da extensão do infarto quando comparado com o grupo que recebeu salina ($41 \pm 2\%$ versus $50 \pm 2\%$) (Figura 18).

Fibrose intersticial. Houve maior acúmulo de colágeno intersticial no miocárdio sobrevivente da área da parede livre do ventrículo esquerdo no grupo IC não tratado ($14,6 \pm 1,5\%$) quando comparado ao grupo SHAM ($10,3 \pm 0,8\%$). Observou-se que este acúmulo de colágeno estava reduzido com o tratamento pelas MSCs ($11 \pm 0,7\%$) (Figuras 19 e 20).

Hipertrofia dos cardiomiócitos. Os miócitos cardíacos sobreviventes da área septal de animais com IC, tratados com salina ($13,4 \pm 0,2 \mu\text{m}$) ou com MSC ($13,5 \pm 0,2 \mu\text{m}$), apresentaram maior diâmetro, quando comparados aos animais controle ($10,2 \pm 0,2 \mu\text{m}$) (Figura 21).

4.10 ESPESSURA CARDÍACA

Foi observada reduzida espessura mínima do VE nos grupos IC tratados com salina ou MSC (IC + Salina: $0,72 \pm 0,06 \text{ mm}$ e IC + MSC: $0,71 \pm 0,07 \text{ mm}$), quando comparados aos animais controles ($2,29 \pm 0,10 \text{ mm}$), indicando lesão transmural (Figura 22).

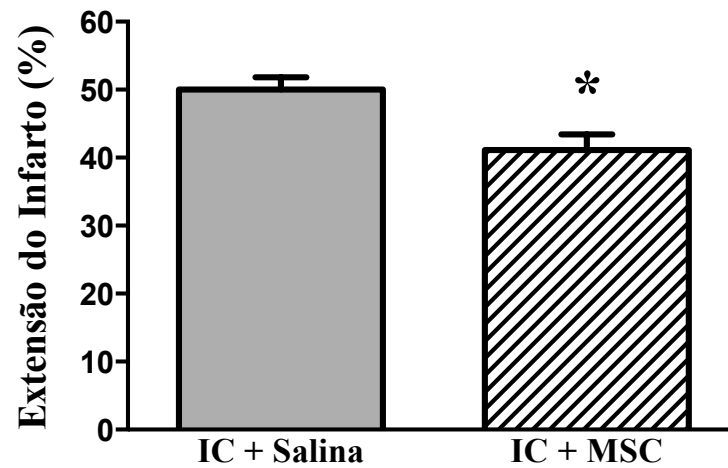
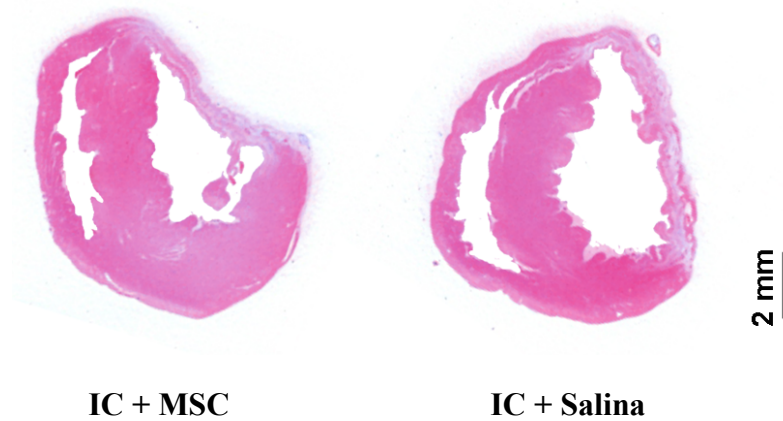
A**B**

FIGURA 18. Painel A: Extensão do infarto (%) no ventrículo esquerdo dos animais com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC). **Painel B:** Fotomicrografia corada com hematoxilina-eosina (HE). Grupos: IC + Salina (n = 16); IC + MSC (n = 14). * $p < 0,05$ em relação ao grupo IC + Salina.

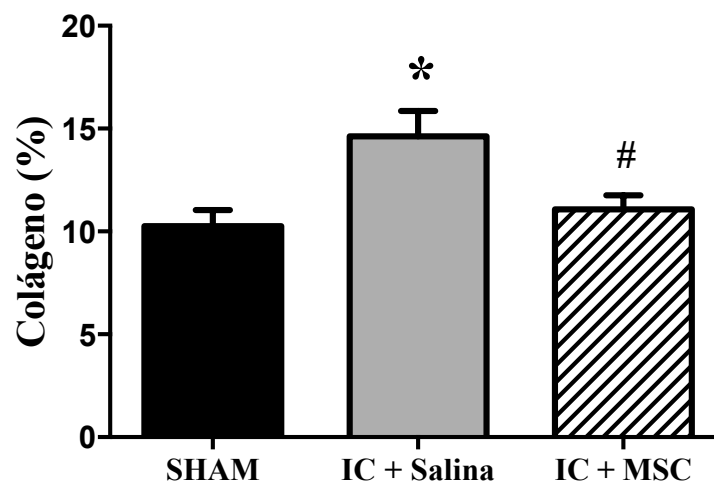


FIGURA 19. Porcentagem de colágeno intersticial no miocárdio sobrevivente do ventrículo esquerdo dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC). Grupos: SHAM (n = 9); IC + Salina (n = 9); IC + MSC (n = 7). * $p < 0,05$ em relação ao grupo SHAM; # $p < 0,05$ em relação ao grupo IC + Salina.

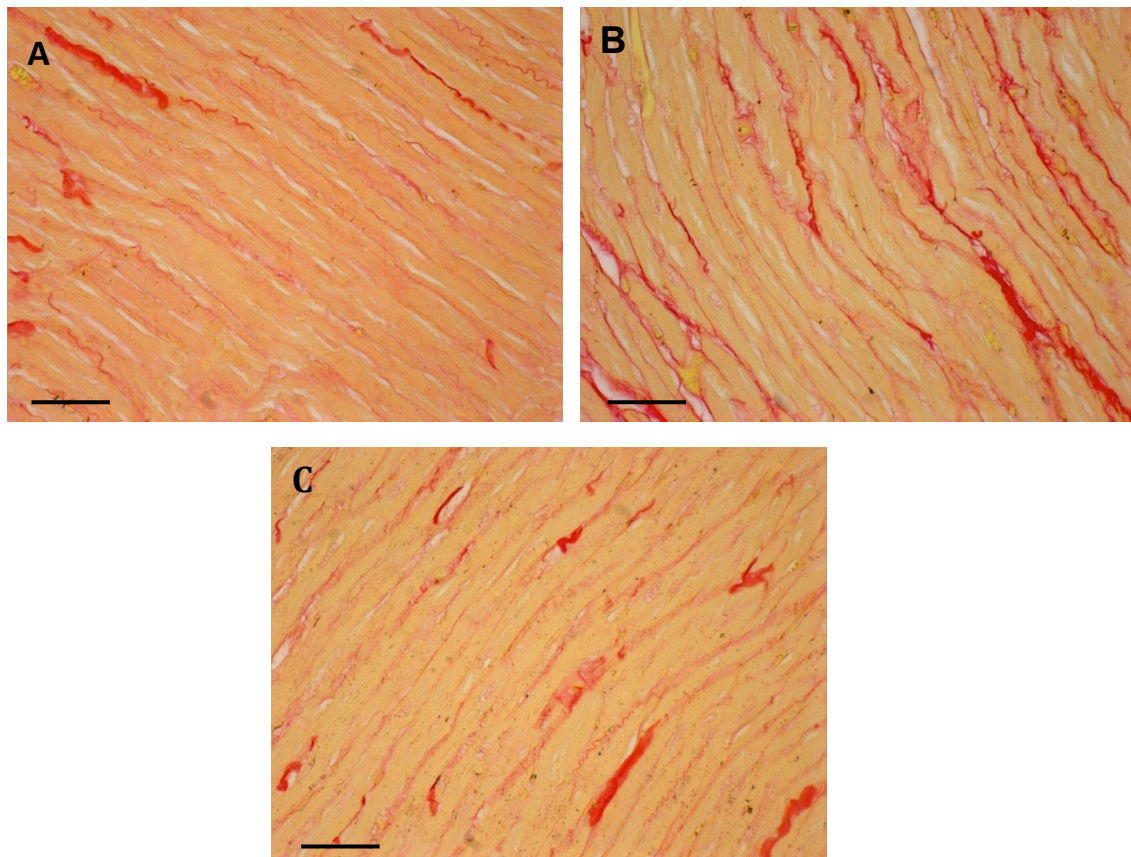


FIGURA 20. Fotomicrografia da fibrose intersticial do miocárdio remanescente na parede livre do ventrículo esquerdo. **Painel A:** grupo controle (SHAM); **Painel B:** grupo com insuficiência cardíaca (IC) tratado com salina; e **Painel C:** grupo com insuficiência cardíaca (IC) tratado com células-tronco mesenquimais (MSC). Coloração de Picrosirius. Aumento 400x. Barra: 50 μ m.

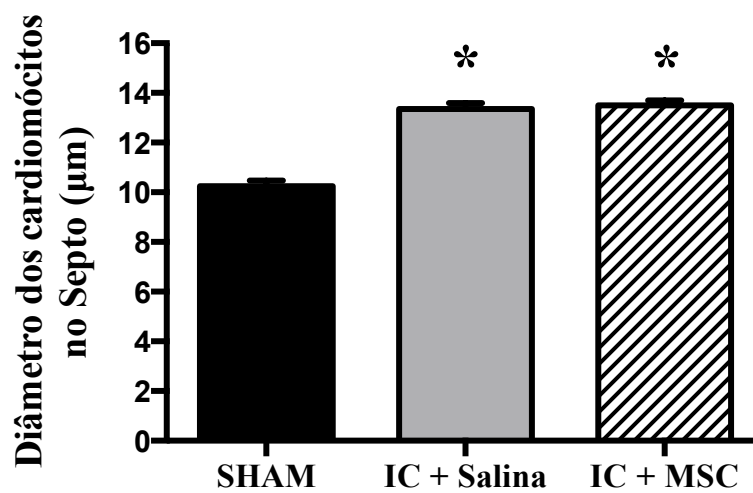


FIGURA 21. Diâmetro dos cardiomiócitos remanescentes, no septo, dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC). Grupos: SHAM (n = 7); IC + Salina (n = 11); IC + MSC (n = 10). * p<0,05 em relação ao grupo SHAM; # p<0,05 em relação ao grupo IC + Salina.

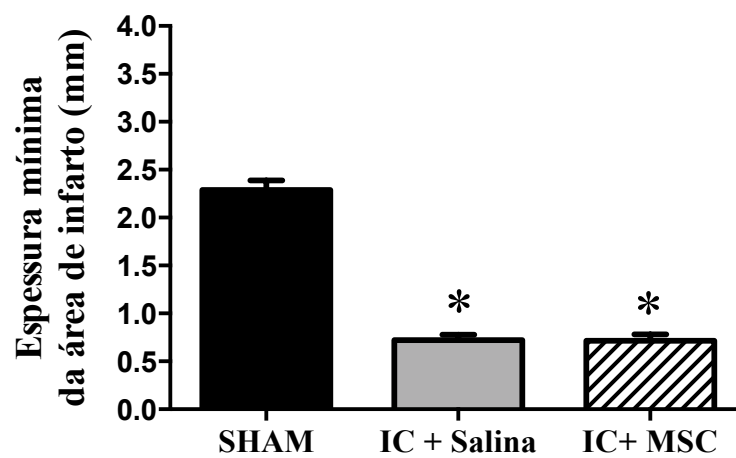


FIGURA 22. Espessura mínima da área de infarto no ventrículo esquerdo dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC). Grupos: SHAM (n = 15); IC + Salina (n = 15); IC + MSC (n = 14). * p<0,05 em relação ao grupo SHAM.

4.11 PESO

O peso dos animais no início do estudo (anterior à cirurgia, fictícia ou não, da ligadura coronariana) foi semelhante entre os grupos estudados (SHAM: 296 ± 12 g, IC + Salina: 283 ± 8 g, e IC + MSC: 300 ± 10 g) (Figura 23A). Ao final dos experimentos, portanto, um mês após o tratamento, o peso entre os grupos não diferiu (SHAM: 461 ± 20 g, IC + Salina: 469 ± 12 g, e IC + MSC: 452 ± 13 g) (Figura 23B); além disso, o ganho de peso não diferiu, também, entre os animais (SHAM: 165 ± 21 g, IC + Salina: 186 ± 15 g, e IC + MSC: 152 ± 16 g) (Figura 23C).

Os animais com IC (IC + Salina: 2032 ± 120 mg; e IC + MSC: 1979 ± 140 mg) apresentaram peso cardíaco maior quando comparados com os animais controles (1496 ± 50 mg) (Figura 24A). O peso corporal dos animais ao final dos experimentos não diferiu entre os grupos SHAM (461 ± 20 g, IC + Salina: 462 ± 11 g e IC + MSC: 452 ± 10 g) (Figura 24B). Quando o peso cardíaco foi analisado em relação ao peso corporal, os grupos com IC (IC + Salina: $4,42 \pm 0,27$ g, e IC + MSC: $4,40 \pm 0,31$ g) apresentaram o índice de peso cardíaco maior que o grupo SHAM ($3,25 \pm 0,11$ g) (Figura 24C).

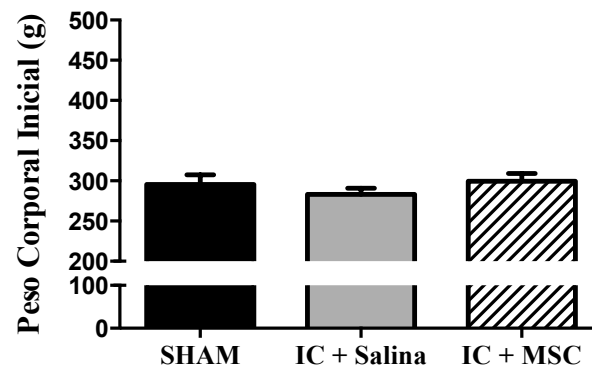
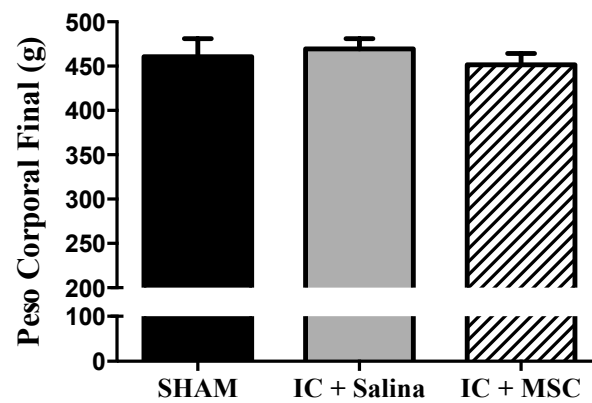
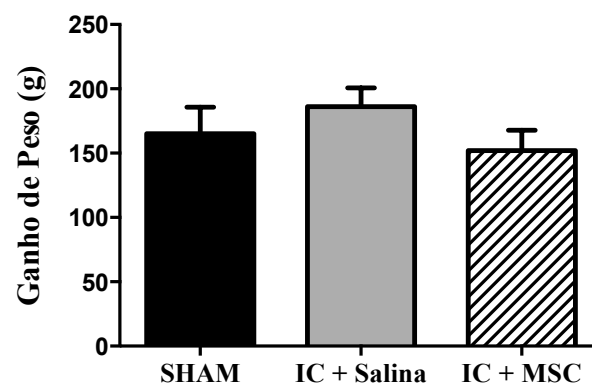
A**B****C**

FIGURA 23. Painel A: Peso corporal antes do infarto do miocárdio; **Painel B:** peso corporal um mês após o tratamento; e **Painel C:** ganho de peso dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC). Grupos: SHAM (n = 10); IC + Salina (n = 12); IC + MSC (n = 8).

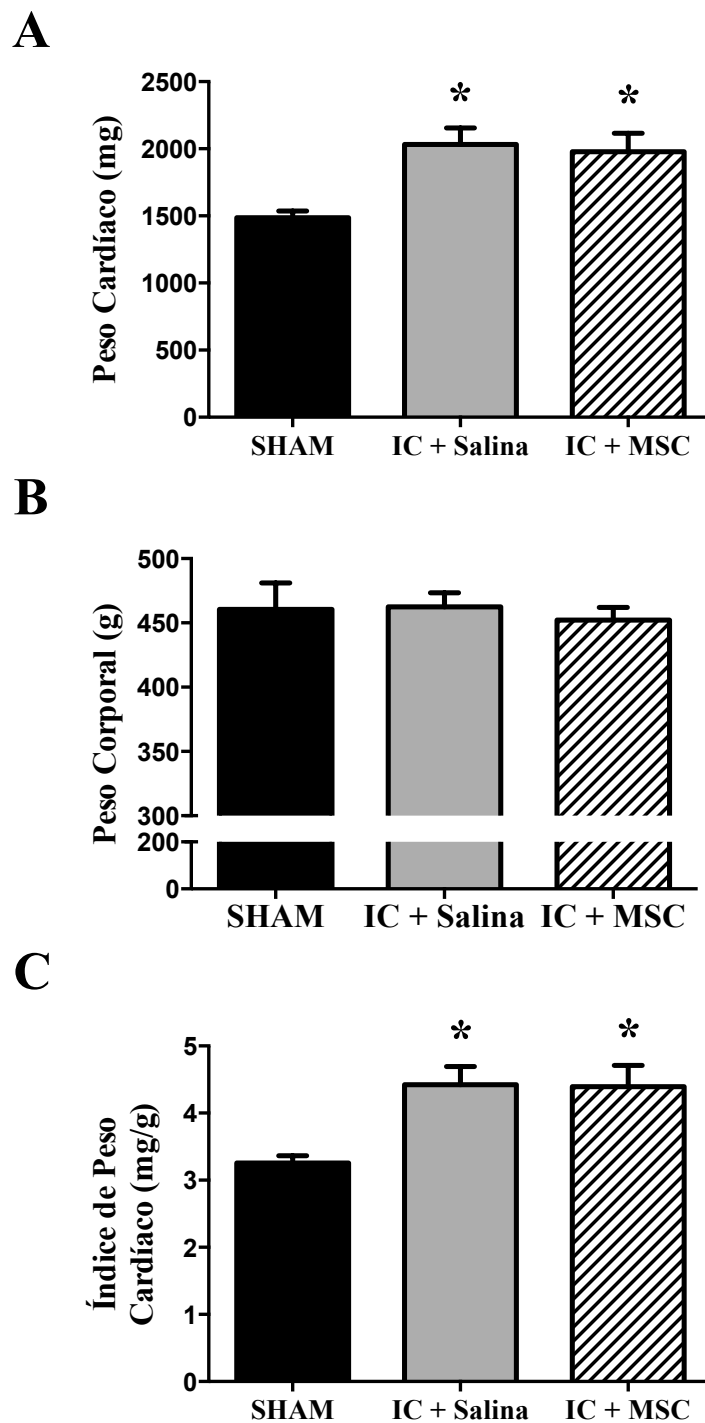


FIGURA 24. Painel A: Peso cardíaco; **Painel B:** peso corporal; e **Painel C:** índice de peso cardíaco dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC). Grupos: SHAM (n = 10); IC + Salina (n = 16); IC + MSC (n = 10). * p<0,05 em relação ao grupo SHAM.

5. DISCUSSÃO

Esse é o primeiro estudo a avaliar o efeito da terapia com MSC sobre a sensibilidade do barorreflexo, a variabilidade da FC e da PA, e o tono autonômico na IC. Mostra-se que, após cinco semanas do IM e um mês após o tratamento, as MSCs melhoraram a VFC, como indicado pelas análises no domínio do tempo e da frequência (análise espectral), bem como por métodos não-lineares (entropia e DFA). Também se beneficiaram do tratamento com MSCs, a sensibilidade do barorreflexo, o tono vagal, a FIMP, a extensão da área isquêmica e a densidade de colágeno. No entanto, as MSCs não foram capazes de melhorar a FEVE, os intervalos QT e QTc do eletrocardiograma, a hipotensão, a variabilidade da PA e a hipertrofia cardíaca.

A caracterização das células de medula óssea, que foram cultivadas e utilizadas no transplante dos animais após o IM, mostrou que as células apresentavam as características estabelecidas pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (DOMINICI et al., 2006; HORWITZ et al., 2005), a saber, a plasticidade, a expressão de determinadas proteínas de membranas, e a capacidade de aderência ao plástico, confirmando, desta forma, a linhagem celular utilizada neste trabalho para o tratamento dos animais com IC.

A IC pode ser induzida após um episódio de IM, no qual o coração é submetido a um processo descrito como remodelamento cardíaco. Este processo envolve alterações na arquitetura da câmara ventricular, tais como o desenvolvimento de cicatriz à base de colágeno na área isquêmica, hipertrofia compensatória do miócito, e fibrose intersticial no miocárdio sobrevivente combinada com insuficiência da função cardíaca (JUGDUTT, 2003; MURDOCH et al., 2006). No rato, estas alterações morfológicas, funcionais e clínicas se expressam em lesões da ordem de 36%, 38% e 40%, respectivamente (MINICUCCI et al., 2011).

Portanto, no presente estudo, foram selecionados animais que apresentaram lesão miocárdica superior, ou no mínimo igual, a 40%. Vale ressaltar, que ambos os grupos com IC, antes de receberem o tratamento, apresentaram similaridade no tamanho da lesão, determinada pelas imagens do *SPECT* (Tomografia computadorizada por emissão de fóton único), a qual provê a extensão do miocárdio viável, e, também, do miocárdio comprometido (OLIVEIRA et al., 2013). Esta ferramenta de análise independe da mobilidade das paredes, a qual pode induzir imprecisões na quantificação da lesão; este método é considerado padrão ouro para classificação das áreas de risco, ou seja, o miocárdio atordado (miocárdio viável, mas transitoriamente comprometido) é corretamente considerado como área viável; enquanto que as áreas de fibrose exibindo mobilidade por estarem ancoradas em segmentos contráteis são consideradas inviáveis (BØTKER et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013).

Logo após o IM, os cardiomiócitos localizados na área isquêmica entram em necrose e apoptose, e inicia-se o processo de cicatrização da região infartada. Este processo é caracterizado pela proliferação de fibroblastos e deposição de colágeno (PFEFFER; BRAUNWALD, 1990). Assim, a cicatriz é composta por matriz extracelular e tecido fibrótico, e substitui os cardiomiócitos lesionados que não podem ser regenerados (CLEUTJENS et al., 1999). Os animais com IC tratados com MSC apresentaram menor extensão da cicatriz (extensão do infarto) em relação ao grupo que recebeu salina; achado consistente com outros estudos (GNECCHI et al., 2006; LIM et al., 2006; NAGAYA et al., 2004; GAEBEL et al., 2011). Assim, o tratamento com MSC mostra efeito benéfico reduzindo a perda de tecido cardíaco após o evento isquêmico.

O IM induz, primariamente, alterações na região infartada e, secundariamente, tempo dependente, na região não infartada (PFEFFER; BRAUNWALD, 1990). A perda de cardiomiócitos induz deposição de colágeno e hipertrofia do miocárdio remanescente.

A fibrose miocárdica é o resultado da síntese, e deposição, excessiva de colágeno sem degradação balanceada; a qual, sob estresse biomecânico, modifica a arquitetura do miocárdio, e, assim, altera as propriedades mecânicas, elétricas e vasomotoras, promovendo o desenvolvimento de IC, arritmias e isquemias (HEYMANS et al., 2015). Os animais com IC apresentaram aumento da quantidade de colágeno intersticial no VE sobrevivente, e o tratamento com MSC preveniu este acúmulo. Estes achados vêm a corroborar estudos de outros autores (BERRY et al., 2006; NAGAYA et al., 2005; GAEBEL et al., 2011; WEN et al., 2011) e mostram efeito benéfico do tratamento com MSC, uma vez que o acúmulo de colágeno determina a evolução clínica na IC (HEYMANS et al., 2015; WEBER, 2004; WOODIWISS et al., 2001).

Além da perda de cardiomiócitos, a fibrose intersticial também contribui, e se constitui em importante determinante da hipertrofia patológica na IC (BRILLA, 2000; PETROVIC, 2004; SABBAH et al., 1998). Desta forma, a hipertrofia ocorre logo após o IM, e consiste de um mecanismo compensatório para preservar a função ventricular (SUTTON; SHARPE, 2000). No presente estudo, a hipertrofia cardíaca foi avaliada por meio de métodos indireto (peso cardíaco) e direto (diâmetro dos miócitos). Ressalta-se que os dois métodos mostraram hipertrofia cardíaca nos ratos com IC, independentemente do tratamento. Neste contexto, embora as MSCs tenham reduzido a extensão da lesão e a fibrose miocárdica, não houve efeito na prevenção da hipertrofia cardíaca. (BRILLA, 2000; MORITA et al., 2004; PETROVIC, 2004)

O efeito benéfico das MSCs sobre a redução da lesão isquêmica e o acúmulo de colágeno podem ser explicados pela secreção de fatores, tais como citocinas e quimiocinas, as quais possuem efeitos tróficos (anti-apoptótico, de suporte, e angiogênicos), imunomoduladores, anti-cicatrizantes, e quimioatrativos, constituindo-se no seu papel biológico mais significativo sob condições fisiopatológicas (MEIRELLES et al., 2009). Logo, pode-se inferir que o tratamento com as MSCs melhorou os efeitos deletérios provocados pela isquemia sobre a morfologia cardíaca, revelando maior preservação tecidual do VE.

A perda do miocárdio e, conseqüentemente, da contratilidade cardíaca, induzem sobrecargas de volume e pressão no coração, levando à disfunção do VE, resultando em baixo débito cardíaco (DC), e aumento dos volumes sistólico e diastólico final do VE, com congestão pulmonar. Igualmente, o IM é o principal causador da redução da FEVE na IC, por induzir perda funcional miocárdica (TASK FORCE, 2013; KEMP; CONTE, 2012). A FEVE é classificada como reduzida quando a mesma se apresenta menor, ou igual, a 40% (TASK FORCE, 2013).

No presente trabalho, a função cardíaca foi avaliada pela ventriculografia radioisotópica, método altamente reproduzível e considerado “padrão ouro” para avaliação da FEVE (MOHAN et al., 2004; VAN ROYEN et al., 1996), tendo demonstrado redução da FEVE nos animais com IC. Apesar do efeito benéfico sobre a estrutura morfológica do coração, as MSCs não melhoraram a FEVE, a qual ainda permaneceu deprimida nos ratos com IC tratados com MSC. Estes dados corroboram outros achados na literatura (AMADO et al., 2006; CHENG et al., 2008; GUARITA-SOUZA et al., 2006). A redução da FEVE se manifesta um dia após a ligadura coronária, porém, não apresenta alterações significativas ao longo do tempo (FRANCIS et al., 2001). Os resultados do presente estudo se assemelham àqueles de FRANCIS et al.(2001), uma vez que não se observou alteração na FEVE 1 e 4 semanas após o IM, ou seja, a mesma permaneceu reduzida durante todo o tempo do estudo, independente do tratamento.

A redução da FEVE implica em menor DC, sendo este determinado pelo volume sistólico e pela FC. É notório que a isquemia altera a atuação da inervação cardíaca por meio: 1) redução do aporte sanguíneo; 2) aumento de metabólitos, como radicais livres, agentes purinérgicos, ATP, adenosina; e 3) alteração da expressão de receptores (ARMOUR, 1999). Portanto, a isquemia pode alterar o controle neural das células marca-passo cardíacas, resultando em bradicardia ou taquicardia. Todavia, as alterações da FC na IC são controversas. Estudos mostraram aumento (ABBATE et al., 2003; BIBEVSKI; DUNLAP, 1999; CHEN et al., 1991; OSTERZIEL et al., 1995; RADAELLI et al., 1999), redução

(BIBEVSKI; DUNLAP, 1999; DU et al., 1998), ou inalteração da FC (ANDO et al., 1997; DU et al., 1998; GAO et al., 2005; KAWAI et al., 2000; KRISTEN et al., 2002; PFEFFER et al., 1979; DU et al., 2007) nesta condição patológica. No presente estudo, a FC não diferiu entre os grupos, o que aliás é consistente com estudos anteriores (BERRY et al., 2006; DAI et al., 2007; NAGAYA et al., 2004; SHIM et al., 2010).

A FC desprovida da modulação autonômica é denominada de FIMP e se encontra afetada na IC. Desta forma, a FIMP foi analisada após o bloqueio farmacológico dos componentes parassimpático e simpático do sistema nervoso autônomo, por meio da metil-atropina e propranolol, respectivamente. A redução da FIMP na IC tem sido bem documentada no âmbito clínico, como também em condições experimentais (DU et al., 2007; SABINO et al., 2013; VATNER et al., 1974). No presente estudo, a FIMP mostrou-se atenuada nos ratos com IC, enquanto que as MSCs preveniram esta alteração.

A FC é determinada pelas células marca-passo do nodo sinoatrial. No entanto, pouco se sabe sobre o efeito da IC na atividade marca-passo das células sinoatriais (VERKERK et al., 2003). Nesta patologia, foi observada redução na taxa de despolarização diastólica, devido à diminuição da densidade da corrente de marca-passo, ou seja, a corrente *funny* (I_f) (VERKERK et al., 2003). Esta diminuição, pode ocorrer devido à redução das subunidades dos canais ativadas por hiperpolarização (HCN2 e HCN4), os quais estão presentes na corrente I_f (ZICHA et al., 2005). A redução da I_f diminui a automaticidade do nodo sinusal (VERKERK et al., 2003), aumentando o aparecimento de arritmias cardíacas. Tem sido relatado que as bradiarritmias contribuem para a morte súbita na IC (FAGGIANO et al., 2001). Desta forma, marca-passos biológicos baseados na superexpressão das subunidades HCN são ferramentas promissoras na abordagem da ritmicidade cardíaca inadequada (PLOTNIKOV et al., 2004), e pode ser útil para pacientes com IC, os quais apresentam disfunção sinusal.

Neste contexto, as MSC podem ter papel benéfico na prevenção de arritmias e morte súbita, devido ao seu efeito protetor sobre a FIMP, demonstrado no presente trabalho. Estudos têm mostrado, também, a expressão de HCN2 e HCN4 após a diferenciação de MSC em células do nodo sinusal (SONG et al., 2012; YANG et al., 2012); podendo, assim, contribuir para a determinação da atividade marca-passo cardíaca. Além disso, as MSCs podem ser utilizadas como marca-passos biológicos na entrega de genes, como já demonstrado (JUN et al., 2012; POTAPOVA et al., 2004; TONG et al., 2010; YANG et al., 2012; ROSEN et al., 2007), potencializando, desta maneira, seu efeito protetor sobre a FIMP.

Em ratos com IC foi demonstrada diminuição acentuada da expressão do canal de sódio (Nav1.1 e Nav1.6) nas células do nodo sinoatrial (DU et al., 2007). Assim, a redução da expressão do canal de sódio contribui para a disfunção do nodo sinoatrial induzida pela IC (DU et al., 2007), e pode ser responsável pela diminuição da FIMP. Na literatura há estudo demonstrando que as MSCs não possuem efeito aparente sobre os níveis de transcrição de genes de canais de sódio na área infartada (LAI et al., 2013). Entretanto, salvo melhor juízo, não se encontrou nenhum estudo avaliando a influência destas células sobre os canais de sódio no nodo sinoatrial.

Estudos *in vitro* têm demonstrado a diferenciação das MSCs de medula óssea em células do nodo sinusal (SONG et al., 2012; YANG et al., 2012); enquanto que o contato direto, célula a célula, entre MSC e célula do nodo pode induzir a diferenciação das MSCs nessa linhagem celular (GUAN et al., 2009; SONG et al., 2012). Na literatura há poucos dados sobre essa linha de estudo. Assim, os mecanismos pelos quais as MSCs podem atuar na determinação da FIMP, e a interação destas células com as do nodo sinusal, carecem de melhor esclarecimento.

A disfunção do VE pode ser caracterizada, além do baixo DC e FEVE, também, por menor PAS (FLETCHER et al., 1981; HOSTETTER et al., 1983; PFEFFER et al., 1979). Pacientes com baixa PAS, ou seja, níveis pressóricos menores que 120 mmHg, apresentam maior taxa de mortalidade intra-hospitalar e no pós-alta, e, também, são identificados, na admissão hospitalar, com prognósticos desfavoráveis (GHEORGHIADÉ et al., 2006). A PAM é definida como o produto do DC pela resistência periférica total. Pacientes com IC apresentam DC reduzido, o qual leva à redução da PAM, e, portanto, hipoperfusão tecidual (GHEORGHIADÉ et al., 2013; KEMP; CONTE, 2012). Vale destacar, que a redução da PA é um preditor, independente, de mortalidade em pacientes com IC (OSTERZIEL et al., 1995).

Dados do laboratório têm demonstrado, em ratos, taquicardia sem alteração da PAM, 4 semanas após a ligadura coronariana (LATARO et al., 2010); enquanto que 6 e 7 semanas pós-IM foi detectada redução da PAM, sem alteração da FC (SABINO et al., 2013). Demonstrou-se no presente estudo que ratos com IC, 5 semanas após a ligadura coronariana, apresentaram redução da PAS e PAM, sem alterações da FC; observações consistentes com trabalhos deste (SABINO et al., 2013) e outros (DU et al., 2007; PFEFFER et al., 1979) laboratórios. Dessa forma, pode-se inferir que um comprometimento dos níveis pressóricos, com normalização do cronotropismo, ocorre com a evolução da fisiopatologia da IC.

A terapia com MSC não alterou a hipotensão causada pela IC. Contudo, considerando-se que a hipotensão no IM pode estar relacionada à redução do DC (GHEORGHIADÉ et al.,

2013; KEMP; CONTE, 2012), e que nos animais com IC tratados, ou não, com MSC, a FEVE apresentou-se reduzida; assim, o efeito hipotensor observado pode ser atribuído à redução do DC causado pela atenuação da função cardíaca. Vale destacar, que no presente estudo, o DC não foi medido, entretanto a disfunção cardíaca foi demonstrada pela avaliação da FEVE.

Vários trabalhos têm demonstrado importante atuação do barorreflexo na manutenção do controle da PA (THOMAS, 2011; THRASHER, 2005). A sensibilidade barorreflexa é um marcador da integridade da regulação da PA pelo sistema nervoso autônomo (SAPOZNIKOV et al., 2010). Em doenças cardíacas, tais como IC, um distúrbio da função barorreflexa tem sido, consistentemente, documentado (CHEN et al., 1991; FLORAS, 2009; KAR et al., 2011). Dessa forma, a atenuação da sensibilidade do barorreflexo pode ser fator importante no prognóstico de pacientes com falência cardíaca (NOLAN et al., 1998; OLIVARI et al., 1983).

O presente estudo demonstrou atenuação da bradicardia reflexa nos animais com IC, enquanto que a taquicardia reflexa não foi alterada. Estes resultados são consistentes com observações anteriores (DIBNER-DUNLAP; THAMES, 1989; ECKBERG et al., 1971b; SABINO et al., 2013). O tratamento com MSC aumentou a sensibilidade do barorreflexo pós-IM, mostrando um efeito benéfico no controle cardiovascular de ratos com IC. Destaca-se que estes dados são inéditos em ratos com IC tratados com MSC.

Trabalhos têm demonstrado que a atenuação do controle barorreflexo sobre a FC, presentes em pacientes com IC, pode ser atribuída ao déficit vagal (ECKBERG et al., 1971b; GRASSI et al., 1995; LA ROVERE et al., 2009). Tem sido demonstrado que a reposta bradicárdica à elevação da PA, induzida pela fenilefrina, foi abolida pelo bloqueio parassimpático com atropina, tanto em indivíduos normais, como com IC (ECKBERG et al., 1971b). Assim, a redução da sensibilidade barorreflexa na IC está diretamente relacionada à baixa atividade vagal cardíaca observada nesta situação patológica (ECKBERG et al., 1971b; SCHWARTZ; DE FERRARI, 2011).

A análise da variabilidade cardiovascular (FC e PA) é considerada ferramenta não invasiva, e robusta, para avaliação da modulação autonômica do sistema cardiocirculatório (PAGANI et al., 1986a; STAUSS, 2007; TASK FORCE, 1996). A variabilidade cardiovascular relaciona-se, intimamente, com os fenômenos biológicos, e os índices de variabilidade podem auxiliar na prevenção de complicações cardíacas em diversas patologias, inclusive na IC.

Métodos lineares e não lineares têm sido aplicados à VFC para descrever a interação fisiológica entre o intervalo cardíaco e o sistema nervoso autônomo (TASK FORCE, 1996; HUIKURI et al., 2009; VOSS et al., 2009). Encontra-se bem documentado que a VFC está

atenuada na IC, e esta intercorrência tem sido aceita como preditor de mortalidade cardíaca em enfermidades tais como IM ou IC (LA ROVERE et al., 1998; PONIKOWSKI et al., 1997). Diversos estudos têm demonstrado que pacientes com doenças cardíacas, especialmente aqueles com IM, possuem maior modulação simpática e/ou menor modulação vagal, quando submetidos à avaliação da VFC pela análise espectral (TASK FORCE, 1996; MONTANO et al., 2009). Vale destacar que o presente estudo, em ratos com IC tratados com MSC, é pioneiro na análise da VFC.

Os índices de VFC nos domínios do tempo (RMSSD e SDNN) e da frequência (potências das bandas HF_{abs} e LF_{abs}) se apresentaram reduzidos em ratos com IC, indicando o desequilíbrio autonômico nestes animais. Alterações da VFC no domínio do tempo têm sido consideradas como preditores de mortalidade (MÄKIKALLIO et al., 2001; MALAVE et al., 2003; NOLAN et al., 1998; LA ROVERE et al., 2003; BILCHICK et al., 2002; ARONSON et al., 2004) e intercorrências cardíacas futuras (FAUCHIER et al., 1997). Adicionalmente, os parâmetros do domínio da frequência também predizem mortalidade (BILCHICK et al., 2002; BONADUCE et al., 1999; LUCREZIOTTI et al., 2000; MÄKIKALLIO et al., 2001; MALAVE et al., 2003), morte súbita (GALINIER et al., 2000; LA ROVERE et al., 2003), e eventual necessidade de transplante cardíaco (LUCREZIOTTI et al., 2000). A terapia com MSC impediu a atenuação da modulação autonômica desencadeada pelo evento isquêmico, indicando melhor prognóstico.

É consenso na literatura que a potência, em valor absoluto, da banda HF (HF_{abs}) corresponde à modulação vagal da FC (AKSELROD et al., 1981; TASK FORCE, 1996; KAMATH; FALLEN, 1993). Contudo, a potência da banda LF ainda suscita discussões. Vários autores acreditam que a potência da banda LF em unidade absoluta (LF_{abs}) representa a modulação simpática e vagal da FC (AKSELROD et al., 1981; POMERANZ et al., 1985). Alguns autores sugerem que a potência desta banda, quando expressa em unidade normalizada, representa a modulação simpática cardíaca; já outros, acreditam ainda ser a representação de ambas as modulações autonômicas (TASK FORCE, 1996). Vários estudos utilizando manobra postural passiva (*tilt test*) progressiva demonstraram que a potência da banda de HF em unidade absoluta (HF_{abs}), juntamente com a potência da banda de LF em unidade normalizada, representam de maneira adequada as modulações parassimpática e simpática cardíacas, respectivamente. Por outro lado, demonstrou-se que a potência da banda de LF em unidade absoluta (LF_{abs}) não apresenta alterações com a inclinação da mesa de *tilt test*, indicando não ser um índice adequado para a representação da modulação simpática cardíaca (MALLIANI et al., 1997; PORTA et al., 2011).

No presente estudo, a potência da banda LF em unidade normalizada (LF_{nu}) não diferiu entre os grupos, levando a crer que os animais com IC não apresentaram alteração da modulação simpática. Analisando a potência de LF em unidade absoluta (LF_{abs}) observou-se redução nos animais com IC, sendo que o tratamento com MSC impede esta redução. Considerando o valor absoluto como representante de ambas as modulações, acredita-se que a alteração observada no LF_{abs} pode ter sido induzida pela redução da modulação vagal.

A razão LF/HF representa o balanço simpatovagal e é linearmente equivalente ao LF_{nu} (BURR, 2007; MONTANO et al., 1994; PAGANI et al., 1986a). Desta forma, esta razão, assim como o LF_{nu} , não apresentou diferença entre os grupos. Estudos afirmam que esta razão distingue a modulação simpática da parassimpática (MALLIANI, 1999; TASK FORCE, 1996; GREENWOOD et al., 1998). Entretanto, esta afirmação é ainda questionada e deve ser vista com certa precaução; embora os sistemas parassimpático e simpático atuem de forma recíproca, os mesmos não necessariamente se encontram “balanceados” (ECKBERG, 1997).

No presente estudo, a VFC também foi examinada usando métodos não-lineares, por meio da análise das flutuações depuradas de tendências (DFA) e entropia amostral (SampEn). A entropia amostral mede o grau de regularidade das séries de intervalo cardíaco, o que está diretamente relacionado com o grau de previsibilidade da série. Quanto mais regular a série, mais previsível ela é e menor será sua entropia. Por outro lado, o DFA é um método que quantifica as propriedades fractais da dinâmica do intervalo cardíaco (HUIKURI et al., 2000; PENG et al., 1995; RICHMAN; MOORMAN, 2000). Irregularidade (previsibilidade) e estrutura fractal são propriedades associadas à complexidade dos sistemas.

O nível de complexidade das series temporais é uma medida importante para se avaliar o sistema cardiovascular (SILVA; MURTA, 2012). Tem sido demonstrado que a complexidade diminui com a idade (PIKKUJÄMSÄ et al., 1999; TAKAHASHI et al., 2012), e, também, em doenças cardíacas (KUNZ et al., 2011; PORTA, A. et al., 2007). Assim, diminuições dos valores de entropia estão muitas vezes ligadas à perda da complexidade cardiovascular (PORTA, ALBERTO; GNECCHI-RUSCONE; et al., 2007). Os resultados obtidos no presente estudo mostram que a entropia amostral estava reduzida nos ratos com IC, e o tratamento com MSC impediu essa redução.

Tem sido, amplamente, relatado que uma redução no índice de DFA de curto prazo (α_1) é o indicador mais forte de mortalidade em pacientes com IC (HUIKURI et al., 2000; MÄKIKALLIO et al., 2001; TAPANAINEN et al., 2002). No presente estudo, um único índice DFA foi extraído (α). Neste caso, embora não tenha sido considerada qualquer distinção entre as propriedades fractais de curto e longo prazo, o índice único é mais

correlacionado com as propriedades de longo alcance (PENG et al., 1995). Os resultados mostram que o aumento do índice fractal do DFA na IC se recupera após o tratamento com as MSCs, retornando para níveis mais próximos de 1.0, que é o grau máximo de fractalidade, geralmente encontrados para indivíduos saudáveis (IYENGAR et al., 1996; PENG et al., 1995). Isso indica que os mecanismos fractais envolvidos na VFC são degradados pela IC e restaurados pelo tratamento com MSC.

No presente estudo, a variabilidade da PA também foi analisada nos animais com IC. Observou-se nos animais com IC a redução dos parâmetros pertinentes ao domínio do tempo (SDNN), como demonstrado em trabalhos anteriores (ARZENO et al., 2007; FEI et al., 1996; MALAVE et al., 2003; SAUL et al., 1988; SCALVINI et al., 1998). O tratamento com MSC não afetou este parâmetro. A análise espectral demonstrou haver redução da potência da banda de LF nos animais com IC, corroborando outros estudos do laboratório (LATARO et al., 2010; SABINO et al., 2013). A banda de LF, no caso da variabilidade da PA, representa o grau de modulação simpática para o coração e vasos, (DING et al., 2012; PAGANI et al., 1986b; STAUSS, 2007). Como se sabe que a atividade simpática está aumentada na IC, esperava-se também um aumento na sua modulação, e conseqüentemente, na banda de LF, que no entanto, está reduzida. Entretanto, este fenômeno pode ser explicado de várias maneiras, tais como: 1) saturação da neurotransmissão sináptica, impedindo as oscilações normais da PA (RADAELLI et al., 1999); 2) disfunção endotelial, a qual reduz a disponibilidade de óxido nítrico (HIROOKA et al., 1994) e aumenta a síntese de endotelina nos vasos (PACHER et al., 1996); 3) atenuação da sensibilidade barorreflexa (JACOB et al., 1995). Apesar das MSCs melhorarem a VFC, a variabilidade da PA permaneceu atenuada nos ratos com IC tratados com MSC.

A redução da VFC em pacientes com IC pode ser consequência da atividade simpática aumentada (BURGER; ARONSON, 2001; TYGESEN et al., 2001; YOSHIKAWA et al., 1999), disfunção neuroendócrina (PUMPRLA et al., 2002), elevação nos níveis de citocinas (Aronson e cols., 2001), e, ainda, atividade vagal reduzida (ECKBERG, 2000). No presente trabalho, os tonos simpático e vagal foram verificadas por meio do duplo bloqueio farmacológico. Nos animais com IC não tratados, o tono vagal, avaliado por meio da administração de metil-atropina, se apresentou atenuado, corroborando dados clínicos e experimentais (CHEN et al., 1991; ECKBERG et al., 1971b; LATARO et al., 2010; SABINO et al., 2013). O tratamento com MSC impediu a redução do tono vagal, demonstrando o restabelecimento da atividade parassimpática. Considerando-se que a redução do tono parassimpático está associada ao aumento da mortalidade de pacientes com IC

(OLSHANSKY et al., 2008; OSTERZIEL et al., 1995), o tratamento desta patologia com as MSCs pode trazer um efeito benéfico para a sobrevivência destes pacientes.

Estudos experimentais e clínicos indicam que a redução do tônus parassimpático na IC influencia na redução da sensibilidade do barorreflexo (CHEN et al., 1991; ECKBERG et al., 1971b; GOLDSTEIN et al., 1975). Dados do presente estudo mostram redução, tanto do tônus parassimpático como da sensibilidade barorreflexa, corroborando dados existentes na literatura (CHEN et al., 1991; ECKBERG et al., 1971b; GOLDSTEIN et al., 1975; GRASSI et al., 1995; LATARO et al., 2010; LA ROVERE et al., 2009; SABINO et al., 2013); enquanto que o tratamento com MSC preveniu esta intercorrência nos animais com IC.

O tônus simpático, avaliado por meio da administração de propranolol, não diferiu entre os animais controles e com IC, tratados, ou não com MSC. A hiperatividade simpática se encontra bem descrita na IC (MANCIA et al., 1992; MARK, 1995; ZUCKER et al., 1995). Porém, em longo prazo, alterações ocorrem durante o desenvolvimento da IC e podem promover uma falha na neurotransmissão sináptica da inervação simpática cardíaca, por meio da atenuação dos seguintes mecanismos: 1) captação de noradrenalina da fenda sináptica; 2) densidade dos receptores β -adrenérgicos no miocárdio; 3) concentração de noradrenalina na terminação simpática; e 4) atividade da adenilato ciclase (DELEHANTY et al., 1994; KAWAI et al., 2000).

Desta forma, o tônus simpático, o LF_{nu} da VFC, e a sensibilidade barorreflexa à taquicardia inalterados, conjuntamente, demonstram que os animais com IC do presente estudo, não apresentaram alteração da modulação e atividade simpática cardíaca. Por outro lado, nos animais com IC foram encontradas redução do tônus e modulação parassimpática, e da sensibilidade barorreflexa à bradicardia, demonstrando um acometimento do componente parassimpático do sistema autonômico, cujo tratamento com MSC impediu este acometimento.

O intervalo QT no ECG corresponde ao tempo entre a despolarização ventricular até o fim da sua recuperação elétrica (repolarização ventricular). Seu prolongamento tem sido considerado como marcador prognóstico de risco arritmogênico, e também está associado à disfunção ventricular esquerda, predizendo morte súbita em pacientes com doenças cardíacas (AHNVE; VALLIN, 1982; KARJALAINEN et al., 1997; PADMANABHAN et al., 2003; SCHWARTZ; WOLF, 1978; YI et al., 1998), embora haja desacordo em relação a estas interpretações (PEDRETTI et al., 1999).

Mudanças no tônus autonômico podem condicionar, diretamente, o iQT, alterando a cinética de repolarização das células miocárdicas, por influências mediadas por receptores em

correntes iônicas individuais; e, também, indiretamente, modulando a FC basal (CHOY et al., 1998). Sendo o intervalo QT influenciado pela FC (AHNVE; VALLIN, 1982; FUNCK-BRENTANO; JAILLON, 1993), o mesmo é corrigido pela fórmula de Bazett (BAZETT, 1920). No presente trabalho, tanto o iQT, quanto o iQT corrigido apresentaram-se maior nos animais com IC, tratados ou não com MSC.

A disfunção autonômica cardíaca pode estar associada ao prolongamento da repolarização ventricular, refletida pelo alargamento do iQTc (AHNVE; VALLIN, 1982; ANNILA et al., 1993; BROWNE et al., 1982; DARBAR et al., 1996). A contribuição independente da FC, e do tônus simpático e parassimpático, ao intervalo QT, tem sido difícil de separar porque o iQT é uma função desta influência dinâmica modulatória (CHOY et al., 1998). No entanto, estudos sugerem que o tônus parassimpático é importante para manter o iQT, mantendo, assim, um período refratário crítico (AHNVE; VALLIN, 1982; BROWNE et al., 1982; CHOY et al., 1998).

Tem sido bem documentado que o prolongamento do potencial de ação caracteriza a falência cardíaca e a hipertrofia. Desta forma, tem sido descrito que o prolongamento do intervalo QT seja uma resposta adaptativa à sobrecarga mecânica (SWYNGHEDAUW, 2005). A hipertrofia do miocárdio remanescente estava presente nos animais tratados, ou não, com MSC, o que pode explicar o prolongamento do iQT e iQTc, em ambos os grupos; uma vez que não houve alteração da FC entre os grupos e o tono vagal foi recuperado no grupo tratado com MSC.

Em síntese, a partir dos dados hemodinâmicos do presente estudo, foi demonstrado que o tratamento com MSC promoveu melhora da sensibilidade do barorreflexo. É conhecido que a sensibilidade barorreflexa está correlacionada com a integridade do controle autonômico. Isso está de acordo com os dados obtidos do presente estudo, no qual foi observada restauração do controle autonômico colinérgico nos animais com IC tratados com MSC. Este achado sugere que as MSCs produziram um efeito positivo sobre os ratos com IC. No entanto, as MSCs não tiveram nenhum efeito na variabilidade da PA. Contudo, tem sido descrito que o controle barorreflexo arterial não está relacionado com a variabilidade da PA em ratos não anestesiados, hipertensos ou normotensos (SU et al., 1992). Os resultados do presente estudo sugerem que as MSCs melhoraram o desequilíbrio autonômico e a sensibilidade do barorreflexo, mas não afetaram a resposta hipotensora e a variabilidade da PA.

A hipotensão após o IM está relacionada à redução do DC, enquanto que a resistência periférica pode se apresentar em níveis normais ou aumentados; ou então, a resistência

periférica pode estar reduzida, mas o DC normal (ROSS, 1969). A FEVE se apresentou reduzida nos animais com IC, tratados, ou não com MSC. Portanto, o efeito hipotensor pode ser atribuído à redução do DC, resultante da atenuação da função cardíaca, a qual, por sua vez, está relacionada ao tamanho do infarto. A lesão causada pela isquemia comprometeu grande parte do ventrículo. E mesmo com a redução da extensão do infarto observada nos animais tratados com MSC, a perda miocárdica ainda permaneceu apreciável, não permitindo a recuperação da FEVE. Lesões menores talvez possam demonstrar melhora da FEVE, e, possivelmente, da hipotensão.

Tem sido demonstrado no IM e na IC que as MSCs se diferenciam em cardiomiócitos funcionais (KOCHER et al., 2001; ORLIC et al., 2001; SHAKE et al., 2002), diminuem a apoptose (BERRY et al., 2006; GNECCHI et al., 2005; LI et al., 2010), e induzem a angiogênese e a neovascularização (DAVANI et al., 2003; FUCHS et al., 2001; JIANG et al., 2006; KOCHER et al., 2001; NAGAYA et al., 2004; TOMITA et al., 2002; LI et al., 2010). Estes efeitos podem resultar da secreção de fatores solúveis, atuando de maneira parácrina (GNECCHI et al., 2005, 2006; KINNAIRD et al., 2004), por meio de efeitos pró-angiogênicos, anti-apoptóticos, anti-fibróticos e imunorreguladores (MEIRELLES et al., 2009), contribuindo, assim, para a melhora do quadro fisiopatológico da IC.

É possível que as MSCs possam facilitar o desenvolvimento neural por meio dessas via parácrinas, por indução do remodelamento da matriz extracelular (PAK et al., 2003), e a diferenciação das mesmas em células neurais (AZIZI et al., 1998; LOU et al., 2003; ORTIZ et al., 2003). As MSCs têm sido muito estudadas em vários modelos de doenças neurodegenerativas, como as doenças de Parkinson, Alzheimer, Huntington, Esclerose múltipla, Esclerose lateral amiotrófica, e lesão de medula espinhal (TANNA; SACHAN, 2014; VAQUERO; ZURITA, 2011). Estudos demonstraram que o tratamento com MSC promove reparo tecidual, aumento da inervação no sítio lesionado, e, também, a melhora da função neurológica, com recuperação de movimentos perdidos após a lesão (TANNA; SACHAN, 2014; VAQUERO; ZURITA, 2011). Desta maneira, estas células podem influenciar o restabelecimento da modulação autonômica. No entanto, estudos para melhor compreensão dos mecanismos de interação das MSCs com o sistema nervoso autonômico ainda são necessários, e se apresentam como extremamente oportunos.

Os mecanismos subjacentes aos efeitos benéficos das MSCs não estão completamente esclarecidos. Além disso, várias questões importantes sobre o método e a via de entrega, a quantidade de células a serem transplantadas, e, acima de tudo, o momento do transplante das

células-tronco em pacientes com doença isquêmica do coração permanecem sem respostas (MADONNA et al., 2014; MAZHARI; HARE, 2012; VRTOVEC et al., 2013).

O transplante intravenoso é o método de acesso mais fácil, e prático, por requerer a via venosa periférica. Também, é um método pouco invasivo. Assim, os animais receberam o transplante de MSC pela veia jugular, anatomicamente próxima ao coração. Todavia, as células passam pela circulação pulmonar, e grande parte fica retida nos pulmões, e, em menor grau, no fígado, coração e baço (BARBASH et al., 2003). Considerando que as MSCs possuem alto poder parácrino, e grande capacidade migratória para sítios lesionados, a via intravenosa não inviabiliza o transplante, e pode ser considerada uma alternativa bastante atrativa. Entretanto, é interessante e devem ser executados para melhor conhecimento do efeito destas células, o estudo hemodinâmico utilizando, também, outras vias de administração.

Estudos que analisaram diferentes tempos de entrega de MSC demonstraram que o benefício do transplante foi maior nos animais que receberam o tratamento após 1 semana do IM (HU et al., 2007; JIANG et al., 2008). BARTUNEK et al. (2006) relataram o curso temporal dos fatores que poderiam afetar a migração e sobrevivência celular. Foi demonstrado que a maior probabilidade de otimização da enxertia e sobrevivência parece ser entre o terceiro e sétimo dia após o IM, devido à coincidência dos picos dos fatores de adesão, quimiotaxia, mobilização de células-tronco e de citocinas (BARTUNEK et al., 2006). Considerando tais fatos, no presente trabalho, as MSCs foram injetadas no sétimo dia após a ligadura coronariana.

Outro ponto debatido, e a ser determinado, é o tipo de transplante. O transplante alogênico de MSC tem se tornado bastante atrativo para a prática clínica, uma vez que o uso autólogo de MSC promove vários desafios. O transplante autólogo requer determinado tempo para expansão das células, até que se obtenha um número adequado para o transplante; e também, pacientes doentes, idosos, ou com comorbidades crônicas apresentam células-tronco imaturas, e disfuncionais (PSALTIS et al., 2014). A disponibilidade de banco de doadores de MSC, obtidas a partir de dadores saudáveis, e jovens, iria permitir um acesso rápido ao transplante das células nas fases iniciais do IM. Também, assegurariam garantia de qualidade na preparação das células (PSALTIS et al., 2014), tornando o transplante alogênico muito atrativo. Portanto, no presente estudo, foi feita a escolha da utilização de transplante alogênico nos animais.

Estas questões, no entanto, sem dúvida, requerem mais estudos para a otimização da abordagem da terapia celular, e representam um foco de futuras pesquisas neste campo (MADONNA et al., 2014; MAZHARI; HARE, 2012; VRTOVEC et al., 2013).

Em resumo, a terapia com MSC é uma abordagem importante para a manutenção de mecanismos fisiológicos normais durante o desenvolvimento da IC. Depois de cinco semanas do IM, e um mês após o transplante com MSC, foi demonstrada melhora da sensibilidade do barorreflexo, da modulação e tono autonômico vagal, da extensão do IM e da densidade de colágeno no coração, demonstrando, assim, os efeitos benéficos da terapia com MSC sobre a IC.

6. CONCLUSÃO

Em conclusão, o transplante de MSC em ratos com IC, induzida pelo infarto do miocárdio, melhorou a VFC, como indicado pelas análises no domínio do tempo e da frequência (análise espectral), bem como a não linear (entropia e DFA). Também foram beneficiados pelas MSCs, a sensibilidade do barorreflexo, o tono vagal, a frequência intrínseca de marca-passo, a extensão da área isquêmica e a densidade de colágeno. No entanto, as MSCs não foram capazes de melhorar a FEVE, os intervalos QT e QTc do eletrocardiograma, a PAM, a variabilidade da PA e a hipertrofia cardíaca.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBATE, A.; BIONDI-ZOCCAI, G. G. L.; BUSSANI, R.; DOBRINA, A.; CAMILOT, D.; FEROCCE, F.; ROSSIELLO, R.; BALDI, F.; SILVESTRI, F.; BIASUCCI, L. M.; BALDI, A. **Increased myocardial apoptosis in patients with unfavorable left ventricular remodeling and early symptomatic post-infarction heart failure.** *Journal of the American College of Cardiology*, 41(5):753–760, 2003.

AHNVE, S.; VALLIN, H. **Influence of heart rate and inhibition of autonomic tone on the QT interval.** *Circulation*, 65(3):435–439, 1982.

AIRES M. **Fisiologia.** Terceira Edição. Ed. Guanabara. 2008.

AKSELROD, S.; GORDON, D.; UBEL, F. A.; SHANNON, D. C.; BERGER, A. C.; COHEN, R. J. **Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: a quantitative probe of beat-to-beat cardiovascular control.** *Science (New York, N.Y.)*, 213(4504):220–222, 1981.

AMADO, L. C.; SCHULERI, K. H.; SALIARIS, A. P.; BOYLE, A. J.; HELM, R.; OSKOU EI, B.; CENTOLA, M.; ENEBOE, V.; YOUNG, R.; LIMA, J. A. C.; LARDO, A. C.; HELDMAN, A. W.; HARE, J. M. **Multimodality noninvasive imaging demonstrates in vivo cardiac regeneration after mesenchymal stem cell therapy.** *Journal of the American College of Cardiology*, 48(10):2116–2124, 2006.

ANDO, S.; DAJANI, H. R.; FLORAS, J. S. **Frequency domain characteristics of muscle sympathetic nerve activity in heart failure and healthy humans.** *The American Journal of Physiology*, 273(1 Pt 2):R205–212, 1997.

ANJOS-AFONSO, F.; SIAPATI, E. K.; BONNET, D. **In vivo contribution of murine mesenchymal stem cells into multiple cell-types under minimal damage conditions.** *Journal of Cell Science*, 117(Pt 23):5655–5664, 2004.

ANNILA, P.; YLI-HANKALA, A.; LINDGREN, L. **Effect of atropine on the QT interval and T-wave amplitude in healthy volunteers.** *British Journal of Anaesthesia*, 71(5):736–737, 1993.

ANVERSA, P.; BEGHI, C.; KIKKAWA, Y.; OLIVETTI, G. **Myocardial infarction in rats. Infarct size, myocyte hypertrophy, and capillary growth.** *Circulation Research*, 58(1):26–37, 1986.

ANVERSA, P.; LOUD, A. V.; LEVICKY, V.; GUIDERI, G. **Left ventricular failure induced by myocardial infarction. I. Myocyte hypertrophy.** *The American Journal of Physiology*, 248(6 Pt 2):H876–882, 1985.

ARMOUR, J. A. **Myocardial ischaemia and the cardiac nervous system.** *Cardiovascular Research*, 41(1):41–54, 1999.

ARONSON, D.; MITTLEMAN, M. A.; BURGER, A. J. **Measures of heart period variability as predictors of mortality in hospitalized patients with decompensated congestive heart failure.** *The American Journal of Cardiology*, 93(1):59–63, 2004.

ARZENO, N. M.; KEARNEY, M. T.; ECKBERG, D. L.; NOLAN, J.; POON, C.-S. **Heart rate chaos as a mortality predictor in mild to moderate heart failure.** Conference proceedings: ... Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Annual Conference, 2007:5051–5054, 2007.

AZIZI, S. A.; STOKES, D.; AUGELLI, B. J.; DIGIROLAMO, C.; PROCKOP, D. J. **Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats--similarities to astrocyte grafts.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95(7):3908–3913, 1998.

BALLARD, V. L. T.; EDELBERG, J. M. **Stem cells for cardiovascular repair - the challenges of the aging heart.** Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 45(4):582–592, 2008.

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: feasibility, cell migration, and body distribution.** Circulation, 108(7):863–868, 2003.

BARTUNEK, J.; WIJNS, W.; HEYNDRIKX, G. R.; VANDERHEYDEN, M. **Timing of intracoronary bone-marrow-derived stem cell transplantation after ST-elevation myocardial infarction.** Nature Clinical Practice. Cardiovascular Medicine, 3 Suppl 1:S52–56, 2006.

BAYES-GENIS, A.; ROURA, S.; PRAT-VIDAL, C.; FARRÉ, J.; SOLER-BOTIJA, C.; DE LUNA, A. B.; CINCA, J. **Chimerism and microchimerism of the human heart: evidence for cardiac regeneration.** Nature Clinical Practice. Cardiovascular Medicine, 4 Suppl 1:S40–45, 2007.

BAZZET, H. D. **An analysis of the time relations of electrocardiograms.** Heart, 7:353-70, 1920.

BERRY, M. F.; ENGLER, A. J.; WOO, Y. J.; PIROLI, T. J.; BISH, L. T.; JAYASANKAR, V.; MORINE, K. J.; GARDNER, T. J.; DISCHER, D. E.; SWEENEY, H. L. **Mesenchymal stem cell injection after myocardial infarction improves myocardial compliance.** American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology, 290(6):H2196–2203, 2006.

BIBEVSKI, S.; DUNLAP, M. E. **Ganglionic mechanisms contribute to diminished vagal control in heart failure.** Circulation, 99(22):2958–2963, 1999.

BILCHICK, K. C.; FETICS, B.; DJOUKENG, R.; FISHER, S. G.; FLETCHER, R. D.; SINGH, S. N.; NEVO, E.; BERGER, R. D. **Prognostic value of heart rate variability in chronic congestive heart failure (Veterans Affairs' Survival Trial of Antiarrhythmic Therapy in Congestive Heart Failure).** The American Journal of Cardiology, 90(1):24–28, 2002.

BONADUCE, D.; PETRETTA, M.; MARCIANO, F.; VICARIO, M. L.; APICELLA, C.; RAO, M. A.; NICOLAI, E.; VOLPE, M. **Independent and incremental prognostic value of heart rate variability in patients with chronic heart failure.** *American Heart Journal*, 138(2 Pt 1):273–284, 1999.

BOOMSMA, R. A.; SWAMINATHAN, P. D.; GEENEN, D. L. **Intravenously injected mesenchymal stem cells home to viable myocardium after coronary occlusion and preserve systolic function without altering infarct size.** *International Journal of Cardiology*, 122(1):17–28, 2007.

BØTKER, H. E.; KALTOFT, A. K.; PEDERSEN, S. F.; KIM, W. Y. **Measuring myocardial salvage.** *Cardiovascular Research*, 94(2):266–275, 2012.

BRILLA, C. G. **Aldosterone and myocardial fibrosis in heart failure.** *Herz*, 25(3):299–306, 2000.

BROWNE, K. F.; ZIPES, D. P.; HEGER, J. J.; PRYSTOWSKY, E. N. **Influence of the autonomic nervous system on the Q-T interval in man.** *The American Journal of Cardiology*, 50(5):1099–1103, 1982.

BURGER, A. J.; ARONSON, D. **Activity of the neurohormonal system and its relationship to autonomic abnormalities in decompensated heart failure.** *Journal of Cardiac Failure*, 7(2):122–128, 2001.

BURR, R. L. **Interpretation of normalized spectral heart rate variability indices in sleep research: a critical review.** *Sleep*, 30(7):913–919, 2007.

CAO, F.; LIN, S.; XIE, X.; RAY, P.; PATEL, M.; ZHANG, X.; DRUKKER, M.; DYLLA, S. J.; CONNOLLY, A. J.; CHEN, X.; WEISSMAN, I. L.; GAMBHIR, S. S.; WU, J. C. **In vivo visualization of embryonic stem cell survival, proliferation, and migration after cardiac delivery.** *Circulation*, 113(7):1005–1014, 2006.

CAPLAN, A. I. **Mesenchymal stem cells.** *Journal of Orthopaed Research*, 9:641-650, 1991.

CAPLAN, A. I. **Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine.** *Journal of Cellular Physiology*, 213(2):341–347, 2007.

CERUTTI, C.; GUSTIN, M. P.; PAULTRE, C. Z.; LO, M.; JULIEN, C.; VINCENT, M.; SASSARD, J. **Autonomic nervous system and cardiovascular variability in rats: a spectral analysis approach.** *The American Journal of Physiology*, 261(4 Pt 2):H1292–1299, 1991.

CHAPLEAU, M. W.; HAJDUCZOK, G.; ABBOUD, F. M. **Mechanisms of resetting of arterial baroreceptors: an overview.** *The American Journal of the Medical Sciences*, 295(4):327–334, 1988.

CHAPLEAU, M. W.; SABHARWAL, R. **Methods of assessing vagus nerve activity and reflexes.** *Heart Failure Reviews*, 16(2):109–127, 2011.

CHENG, Z.; LIU, X.; OU, L.; ZHOU, X.; LIU, Y.; JIA, X.; ZHANG, J.; LI, Y.; KONG, D. **Mobilization of mesenchymal stem cells by granulocyte colony-stimulating factor in rats with acute myocardial infarction.** *Cardiovascular Drugs and Therapy / Sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy*, 22(5):363–371, 2008.

CHEN, J. S.; WANG, W.; BARTHOLET, T.; ZUCKER, I. H. **Analysis of baroreflex control of heart rate in conscious dogs with pacing-induced heart failure.** *Circulation*, 83(1):260–267, 1991.

CHEN, S.; LIU, Z.; TIAN, N.; ZHANG, J.; YEI, F.; DUAN, B.; ZHU, Z.; LIN, S.; KWAN, T. W. **Intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells for ischemic cardiomyopathy due to isolated chronic occluded left anterior descending artery.** *The Journal of Invasive Cardiology*, 18(11):552–556, 2006.

CHOY, A. M.; LANG, C. C.; RODEN, D. M.; ROBERTSON, D.; WOOD, A. J.; ROBERTSON, R. M.; BIAGGIONI, I. **Abnormalities of the QT interval in primary disorders of autonomic failure.** *American Heart Journal*, 136(4 Pt 1):664–671, 1998.

CLELAND, J. G. F.; DAUBERT, J.-C.; ERDMANN, E.; FREEMANTLE, N.; GRAS, D.; KAPPENBERGER, L.; TAVAZZI, L.; CARDIAC RESYNCHRONIZATION-HEART FAILURE (CARE-HF) STUDY INVESTIGATORS. **The effect of cardiac resynchronization on morbidity and mortality in heart failure.** *The New England Journal of Medicine*, 352(15):1539–1549, 2005.

CLEUTJENS, J. P.; BLANKESTEIJN, W. M.; DAEMEN, M. J.; SMITS, J. F. **The infarcted myocardium: simply dead tissue, or a lively target for therapeutic interventions.** *Cardiovascular Research*, 44(2):232–241, 1999.

COHN, J. N.; FERRARI, R.; SHARPE, N. **Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling.** *Journal of the American College of Cardiology*, 35(3):569–582, 2000.

COHN, J. N.; LEVINE, T. B.; OLIVARI, M. T.; GARBERG, V.; LURA, D.; FRANCIS, G. S.; SIMON, A. B.; RECTOR, T. **Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure.** *The New England Journal of Medicine*, 311(13):819–823, 1984.

CREAGER, M. A.; FAXON, D. P.; HALPERIN, J. L.; MELIDOSSIAN, C. D.; MCCABE, C. H.; SCHICK, E. C.; RYAN, T. J. **Determinants of clinical response and survival in patients with congestive heart failure treated with captopril.** *American Heart Journal*, 104(5 Pt 2):1147–1154, 1982.

CURRY, C. W.; NELSON, G. S.; WYMAN, B. T.; DECLERCK, J.; TALBOT, M.; BERGER, R. D.; MCVEIGH, E. R.; KASS, D. A. **Mechanical dyssynchrony in dilated cardiomyopathy with intraventricular conduction delay as depicted by 3D tagged magnetic resonance imaging.** *Circulation*, 101(1):E2, 2000.

DAI, W.; HALE, S. L.; KLONER, R. A. **Role of a paracrine action of mesenchymal stem cells in the improvement of left ventricular function after coronary artery occlusion in rats.** *Regenerative Medicine*, 2(1):63–68, 2007.

DAI, W.; HALE, S. L.; MARTIN, B. J.; KUANG, J.-Q.; DOW, J. S.; WOLD, L. E.; KLONER, R. A. **Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short- and long-term effects.** *Circulation*, 112(2):214–223, 2005.

DARBAR, D.; SMITH, M.; MÖRIKE, K.; RODEN, D. M. **Epinephrine-induced changes in serum potassium and cardiac repolarization and effects of pretreatment with propranolol and diltiazem.** *The American Journal of Cardiology*, 77(15):1351–1355, 1996.

DAVANI, S.; MARANDIN, A.; MERSIN, N.; ROYER, B.; KANTELIP, B.; HERVÉ, P.; ETIEVENT, J.-P.; KANTELIP, J.-P. **Mesenchymal progenitor cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a rat cellular cardiomyoplasty model.** *Circulation*, 108 Suppl 1:II253–258, 2003.

DELEHANTY, J. M.; HIMURA, Y.; ELAM, H.; HOOD, W. B.; LIANG, C. S. **Beta-adrenoceptor downregulation in pacing-induced heart failure is associated with increased interstitial NE content.** *The American Journal of Physiology*, 266(3 Pt 2):H930–935, 1994.

DIAS DA SILVA, V. J.; SALGADO, H. C.; FAZAN R Jr. **Variabilidade da pressão arterial: mecanismos e aplicações clínicas.** Em: MAPA: Monitorização Residual da Pressão Arterial, ed. Mion DJr, Nobre F, Gomes MAM 2: 11-27, Manole, 2006.

DIB, N.; MENASCHE, P.; BARTUNEK, J. J.; ZEIHNER, A. M.; TERZIC, A.; CHRONOS, N. A.; HENRY, T. D.; PETERS, N. S.; FERNÁNDEZ-AVILÉS, F.; YACOUB, M.; SANBORN, T. A.; DEMARIA, A.; SCHATZ, R. A.; TAYLOR, D. A.; FUCHS, S.; ITESCU, S.; MILLER, L. W.; DINSMORE, J. H.; DANGAS, G. D.; POPMA, J. J.; HALL, J. L.; HOLMES, D. R. JR. INTERNATIONAL SOCIETY FOR CARDIOVASCULAR TRANSLATIONAL RESEARCH. **The first US study to assess the feasibility and safety of endocardial delivery of allogenic mesenchymal precursor cells in patient with heart failure: Three-month interim analysis.** *Circulation*, 120:S810, 2009.

DIBNER-DUNLAP, M. E.; THAMES, M. D. **Baroreflex control of renal sympathetic nerve activity is preserved in heart failure despite reduced arterial baroreceptor sensitivity.** *Circulation Research*, 65(6):1526–1535, 1989.

DIBONA, G. F.; JONES, S. Y.; BROOKS, V. L. **ANG II receptor blockade and arterial baroreflex regulation of renal nerve activity in cardiac failure.** *The American Journal of Physiology*, 269(5 Pt 2):R1189–1196, 1995.

DING, F.; ZHANG, G.; LIU, L.; JIANG, L.; WANG, R.; ZHENG, Y.; WANG, G.; XIE, M.; DUAN, Y. **Involvement of cationic channels in proliferation and migration of human mesenchymal stem cells.** *Tissue & Cell*, 44(6):358–364, 2012.

DJOUSSE, L.; DRIVER, J. A.; GAZIANO, J. M. **Relation between modifiable lifestyle factors and lifetime risk of heart failure.** *JAMA*, 302(4):394–400, 2009.

DOGGRELL, S. A.; BROWN, L. **Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure.** *Cardiovascular Research*, 39(1):89–105, 1998.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D.; HORWITZ, E. **Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.** *Cytotherapy*, 8(4):315–317, 2006.

DONOVAN, P. J.; GEARHART, J. **The end of the beginning for pluripotent stem cells.** *Nature*, 414(6859):92–97, 2001.

DUQUE, J. J.; SILVA, L. E. V.; MURTA, L. O. **Open architecture software platform for biomedical signal analysis.** Conference proceedings: ... Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Annual Conference, 2013:2084–2087, 2013.

DU, X. J.; COX, H. S.; DART, A. M.; ESLER, M. D. **Depression of efferent parasympathetic control of heart rate in rats with myocardial infarction: effect of losartan.** *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 31(6):937–944, 1998.

DU, Y.; HUANG, X.; WANG, T.; HAN, K.; ZHANG, J.; XI, Y.; WU, G.; MA, A. **Downregulation of neuronal sodium channel subunits Nav1.1 and Nav1.6 in the sinoatrial node from volume-overloaded heart failure rat.** *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, 454(3):451–459, 2007.

ECKBERG, D. L. **Sympathovagal balance: a critical appraisal.** *Circulation*, 96(9):3224–3232, 1997.

ECKBERG, D. L. **Physiological basis for human autonomic rhythms.** *Annals of Medicine*, 32(5):341–349, 2000.

ECKBERG, D. L.; DRABINSKY, M.; BRAUNWALD, E. **Defective cardiac parasympathetic control in patients with heart disease.** *The New England Journal of Medicine*, 285(16):877–883, 1971a.

ECKBERG, D. L.; DRABINSKY, M.; BRAUNWALD, E. **Defective cardiac parasympathetic control in patients with heart disease.** *The New England Journal of Medicine*, 285(16):877–883, 1971b.

ECKFELDT, C. E.; MENDENHALL, E. M.; VERFAILLIE, C. M. **The molecular repertoire of the “almighty” stem cell.** *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 6(9):726–737, 2005.

EVANS, M. J.; KAUFMAN, M. H. **Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos.** *Nature*, 292(5819):154–156, 1981.

FAGGIANO, P.; D’ ALOIA, A.; GUALENI, A.; GARDINI, A.; GIORDANO, A. **Mechanisms and immediate outcome of in-hospital cardiac arrest in patients with advanced heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy.** *The American Journal of Cardiology*, 87(5):655–657, A10–11, 2001.

FARAH, V. M.; MOREIRA, E. D.; PIRES, M. D.; IRIGOYEN, M. C.; KRIEGER, E. M. **Comparison of three methods for the determination of baroreflex sensitivity in conscious rats.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Médicas E Biológicas / Sociedade Brasileira De Biofísica ... [et Al.]*, 32(3):361–369, 1999.

FAUCHIER, L.; BABUTY, D.; COSNAY, P.; AUTRET, M. L.; FAUCHIER, J. P. **Heart rate variability in idiopathic dilated cardiomyopathy: characteristics and prognostic value.** *Journal of the American College of Cardiology*, 30(4):1009–1014, 1997.

FEI, L.; KEELING, P. J.; SADOUL, N.; COPIE, X.; MALIK, M.; MCKENNA, W. J.; CAMM, A. J. **Decreased heart rate variability in patients with congestive heart failure and chronotropic incompetence.** *Pacing and clinical electrophysiology: PACE*, 19(4 Pt 1):477–483, 1996.

FEI, L. **Effects of pharmacological interventions on heart rate variability: Animal experiments and clinical observations.** In: Malik M, Camm A J, eds. *Heart Rate Variability*. Armonk, NY: Futura, 1995:275-292.

FELDER, R. B.; FRANCIS, J.; WEISS, R. M.; ZHANG, Z. H.; WEI, S. G.; JOHNSON, A. K. **Neurohumoral regulation in ischemia-induced heart failure. Role of the forebrain.** *Annals of the New York Academy of Sciences*, 940:444–453, 2001.

FERRARI, G.; CUSELLA-DE ANGELIS, G.; COLETTA, M.; PAOLUCCI, E.; STORNAIUOLO, A.; COSSU, G.; MAVILIO, F. **Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors.** *Science (New York, N.Y.)*, 279(5356):1528–1530, 1998.

FEYGIN, J.; MANSOOR, A.; ECKMAN, P.; SWINGEN, C.; ZHANG, J. **Functional and bioenergetic modulations in the infarct border zone following autologous mesenchymal stem cell transplantation.** *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 293(3):H1772–1780, 2007.

FLETCHER, P. J.; PFEFFER, J. M.; PFEFFER, M. A.; BRAUNWALD, E. **Left ventricular diastolic pressure-volume relations in rats with healed myocardial infarction. Effects on systolic function.** *Circulation Research*, 49(3):618–626, 1981.

FLORAS, J. S. **Sympathetic nervous system activation in human heart failure: clinical implications of an updated model.** *Journal of the American College of Cardiology*, 54(5):375–385, 2009.

FONAROW, G. C.; ABRAHAM, W. T.; ALBERT, N. M.; STOUGH, W. G.; GHEORGHIADE, M.; GREENBERG, B. H.; O'CONNOR, C. M.; PIEPER, K.; SUN, J. L.; YANCY, C. W.; YOUNG, J. B.; OPTIMIZE-HF INVESTIGATORS AND HOSPITALS. **Factors identified as precipitating hospital admissions for heart failure and clinical outcomes: findings from OPTIMIZE-HF.** *Archives of Internal Medicine*, 168(8):847–854, 2008.

FRANCIS, G. S. **Neurohumoral activation and progression of heart failure: hypothetical and clinical considerations.** *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 32 Suppl 1:S16–21, 1998.

FRANCIS, J.; WEISS, R. M.; WEI, S. G.; JOHNSON, A. K.; FELDER, R. B. **Progression of heart failure after myocardial infarction in the rat.** *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 281(5):R1734–1745, 2001.

FRENNEAUX, M. P. **Autonomic changes in patients with heart failure and in post-myocardial infarction patients.** *Heart (British Cardiac Society)*, 90(11):1248–1255, 2004.

FRIEDENSTEIN, A. J.; GORSKAJA, J. F.; KULAGINA, N. N. **Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs.** *Experimental Hematology*, 4(5):267–274, 1976.

FUCHS, J. R.; NASSERI, B. A.; VACANTI, J. P. **Tissue engineering: a 21st century solution to surgical reconstruction.** *The Annals of Thoracic Surgery*, 72(2):577–591, 2001.

FUNCK-BRENTANO, C.; JAILLON, P. **Rate-corrected QT interval: techniques and limitations.** *The American Journal of Cardiology*, 72(6):17B–22B, 1993.

GAEBEL, R.; FURLANI, D.; SORG, H.; POLCHOW, B.; FRANK, J.; BIEBACK, K.; WANG, W.; KLOPSCH, C.; ONG, L.-L.; LI, W.; MA, N.; STEINHOFF, G. **Cell origin of human mesenchymal stem cells determines a different healing performance in cardiac regeneration.** *PloS One*, 6(2):e15652, 2011.

GALINIER, M.; PATHAK, A.; FOURCADE, J.; ANDRODIAS, C.; CURNIER, D.; VARNOUS, S.; BOVEDA, S.; MASSABUAU, P.; FAUVEL, M.; SENARD, J. M.; BOUNHOURE, J. P. **Depressed low frequency power of heart rate variability as an independent predictor of sudden death in chronic heart failure.** *European Heart Journal*, 21(6):475–482, 2000.

GAO, L.; SCHULTZ, H. D.; PATEL, K. P.; ZUCKER, I. H.; WANG, W. **Augmented input from cardiac sympathetic afferents inhibits baroreflex in rats with heart failure.** *Hypertension*, 45(6):1173–1181, 2005.

GHEORGHIADÉ, M.; ABRAHAM, W. T.; ALBERT, N. M.; GREENBERG, B. H.; O'CONNOR, C. M.; SHE, L.; STOUGH, W. G.; YANCY, C. W.; YOUNG, J. B.; FONAROW, G. C.; OPTIMIZE-HF INVESTIGATORS AND COORDINATORS. **Systolic blood pressure at admission, clinical characteristics, and outcomes in patients hospitalized with acute heart failure.** *JAMA*, 296(18):2217–2226, 2006.

GHEORGHIADÉ, M.; VADUGANATHAN, M.; AMBROSY, A.; BÖHM, M.; CAMPIA, U.; CLELAND, J. G. F.; FEDELE, F.; FONAROW, G. C.; MAGGIONI, A. P.; MEBAZAA, A.; MEHRA, M.; METRA, M.; NODARI, S.; PANG, P. S.; PONIKOWSKI, P.; SABBAAH, H. N.; KOMAJDA, M.; BUTLER, J. **Current management and future directions for the treatment of patients hospitalized for heart failure with low blood pressure.** *Heart Failure Reviews*, 18(2):107–122, 2013.

GHOSTINE, S.; CARRION, C.; SOUZA, L. C. G.; RICHARD, P.; BRUNÉVAL, P.; VILQUIN, J.-T.; POUZET, B.; SCHWARTZ, K.; MENASCHÉ, P.; HAGÈGE, A. A. **Long-term efficacy of myoblast transplantation on regional structure and function after myocardial infarction.** *Circulation*, 106(12 Suppl 1):I131–136, 2002.

GNECCHI, M.; HE, H.; LIANG, O. D.; MELO, L. G.; MORELLO, F.; MU, H.; NOISEUX, N.; ZHANG, L.; PRATT, R. E.; INGWALL, J. S.; DZAU, V. J. **Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells.** *Nature Medicine*, 11(4):367–368, 2005.

GNECCHI, M.; HE, H.; NOISEUX, N.; LIANG, O. D.; ZHANG, L.; MORELLO, F.; MU, H.; MELO, L. G.; PRATT, R. E.; INGWALL, J. S.; DZAU, V. J. **Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement.** *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(6):661–669, 2006.

GO, A. S.; MOZAFFARIAN, D.; ROGER, V. L.; BENJAMIN, E. J.; BERRY, J. D.; BORDEN, W. B.; BRAVATA, D. M.; DAI, S.; FORD, E. S.; FOX, C. S.; FRANCO, S.; FULLERTON, H. J.; GILLESPIE, C.; HAILPERN, S. M.; HEIT, J. A.; HOWARD, V. J.; HUFFMAN, M. D.; KISSELA, B. M.; KITTNER, S. J.; LACKLAND, D. T.; LICHTMAN, J. H.; LISABETH, L. D.; MAGID, D.; MARCUS, G. M.; MARELLI, A.; MATCHAR, D. B.; MCGUIRE, D. K.; MOHLER, E. R.; MOY, C. S.; MUSSOLINO, M. E.; NICHOL, G.; PAYNTER, N. P.; SCHREINER, P. J.; SORLIE, P. D.; STEIN, J.; TURAN, T. N.; VIRANI, S. S.; WONG, N. D.; WOO, D.; TURNER, M. B.; AMERICAN HEART ASSOCIATION STATISTICS COMMITTEE AND STROKE STATISTICS SUBCOMMITTEE. **Heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association.** *Circulation*, 127(1):e6–e245, 2013.

GOJO, S.; GOJO, N.; TAKEDA, Y.; MORI, T.; ABE, H.; KYO, S.; HATA, J.; UMEZAWA, A. **In vivo cardiovascularogenesis by direct injection of isolated adult mesenchymal stem cells.** *Experimental Cell Research*, 288(1):51–59, 2003.

GOLDBERGER, A. L. **Non-linear dynamics for clinicians: chaos theory, fractals, and complexity at the bedside.** *Lancet (London, England)*, 347(9011):1312–1314, 1996.

GOLDBERGER, A. L.; AMARAL, L. A. N.; HAUSDORFF, J. M.; IVANOV, P. C.; PENG, C.-K.; STANLEY, H. E. **Fractal dynamics in physiology: alterations with disease and aging**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99 Suppl 1:2466–2472, 2002.

GOLDSTEIN, R. E.; BEISER, G. D.; STAMPFER, M.; EPSTEIN, S. E. **Impairment of autonomically mediated heart rate control in patients with cardiac dysfunction**. Circulation Research, 36(5):571–578, 1975.

GOLPANIAN, S.; EL-KHORAZATY, J.; MENDIZABAL, A.; DIFEDE, D. L.; SUNCION, V. Y.; KARANTALIS, V.; FISHMAN, J. E.; GHERSIN, E.; BALKAN, W.; HARE, J. M. **Effect of aging on human mesenchymal stem cell therapy in ischemic cardiomyopathy patients**. Journal of the American College of Cardiology, 65(2):125–132, 2015.

GRASSI, G.; SERAVALLE, G.; CATTANEO, B. M.; LANFRANCHI, A.; VAILATI, S.; GIANNATTASIO, C.; DEL BO, A.; SALA, C.; BOLLA, G. B.; POZZI, M. **Sympathetic activation and loss of reflex sympathetic control in mild congestive heart failure**. Circulation, 92(11):3206–3211, 1995.

GREENWOOD JP, BATIN PD, NOLAN J. **Assessment of cardiac autonomic function**. Br J Cardiol, 4:154–157, 1997.

GUAN, S.; MA, A.; JIANG, W. **[Sinoatrial node cells phenotype expression is induced by direct bone marrow stem cells contact with sinoatrial node cells]**. Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi, 37(1):73–76, 2009.

GUARITA-SOUZA, L. C.; CARVALHO, K. A. T.; SIMEONE, B. R.; FRANCISCO, J. C.; MIYAGUE, N.; OLANDOSKI, M. **Functional outcome of bone marrow stem cells: mononuclear versus mesenchymal stem cells after cellular therapy in myocardial scar in Wistar rats**. Transplantation Proceedings, 38(6):1953–1954, 2006.

GULLESTAD, L.; UELAND, T.; VINGE, L. E.; FINSEN, A.; YNDESTAD, A.; AUKRUST, P. **Inflammatory cytokines in heart failure: mediators and markers**. Cardiology, 122(1):23–35, 2012.

HAMANO, K.; LI, T.-S.; KOBAYASHI, T.; HIRATA, K.; YANO, M.; KOHNO, M.; MATSUZAKI, M. **Therapeutic angiogenesis induced by local autologous bone marrow cell implantation**. The Annals of Thoracic Surgery, 73(4):1210–1215, 2002.

HARE, J. M.; TRAVERSE, J. H.; HENRY, T. D.; DIB, N.; STRUMPF, R. K.; SCHULMAN, S. P.; GERSTENBLITH, G.; DEMARIA, A. N.; DENKTAS, A. E.; GAMMON, R. S.; HERMILLER, J. B.; REISMAN, M. A.; SCHAEER, G. L.; SHERMAN, W. **A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction**. Journal of the American College of Cardiology, 54(24):2277–2286, 2009.

Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Circulation*, 93(5):1043–1065, 1996.

HE, J.; OGDEN, L. G.; BAZZANO, L. A.; VUPPUTURI, S.; LORIA, C.; WHELTON, P. K. **Risk factors for congestive heart failure in US men and women: NHANES I epidemiologic follow-up study.** *Archives of Internal Medicine*, 161(7):996–1002, 2001.

HELDMAN, A. W.; DIFEDE, D. L.; FISHMAN, J. E.; ZAMBRANO, J. P.; TRACHTENBERG, B. H.; KARANTALIS, V.; MUSHTAQ, M.; WILLIAMS, A. R.; SUNCION, V. Y.; MCNIECE, I. K.; GHERSIN, E.; SOTO, V.; LOPERA, G.; MIKI, R.; WILLENS, H.; HENDEL, R.; MITRANI, R.; PATTANY, P.; FEIGENBAUM, G.; OSKOUEI, B.; BYRNES, J.; LOWERY, M. H.; SIERRA, J.; PUJOL, M. V.; DELGADO, C.; GONZALEZ, P. J.; RODRIGUEZ, J. E.; BAGNO, L. L.; ROUY, D.; ALTMAN, P.; FOO, C. W. P.; DA SILVA, J.; ANDERSON, E.; SCHWARZ, R.; MENDIZABAL, A.; HARE, J. M. **Transendocardial mesenchymal stem cells and mononuclear bone marrow cells for ischemic cardiomyopathy: the TAC-HFT randomized trial.** *JAMA*, 311(1):62–73, 2014.

HEO, S.; DOERING, L. V.; WIDENER, J.; MOSER, D. K. **Predictors and effect of physical symptom status on health-related quality of life in patients with heart failure.** *American Journal of Critical Care: An Official Publication, American Association of Critical-Care Nurses*, 17(2):124–132, 2008.

HE, S.; NAKADA, D.; MORRISON, S. J. **Mechanisms of stem cell self-renewal.** *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 25:377–406, 2009.

HEYMANS, S.; GONZÁLEZ, A.; PIZARD, A.; PAPAGEORGIOU, A. P.; LÓPEZ-ANDRÉS, N.; JAISSE, F.; THUM, T.; ZANNAD, F.; DÍEZ, J. **Searching for new mechanisms of myocardial fibrosis with diagnostic and/or therapeutic potential.** *European Journal of Heart Failure*, 2015.

HIROOKA, Y.; IMAIZUMI, T.; TAGAWA, T.; SHIRAMOTO, M.; ENDO, T.; ANDO, S.; TAKESHITA, A. **Effects of L-arginine on impaired acetylcholine-induced and ischemic vasodilation of the forearm in patients with heart failure.** *Circulation*, 90(2):658–668, 1994.

HODGSON, D. M.; BEHFAR, A.; ZINGMAN, L. V.; KANE, G. C.; PEREZ-TERZIC, C.; ALEKSEEV, A. E.; PUCÉAT, M.; TERZIC, A. **Stable benefit of embryonic stem cell therapy in myocardial infarction.** *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 287(2):H471–479, 2004.

HODSMAN, G. P.; KOHZUKI, M.; HOWES, L. G.; SUMITHRAN, E.; TSUNODA, K.; JOHNSTON, C. I. **Neurohumoral responses to chronic myocardial infarction in rats.** *Circulation*, 78(2):376–381, 1988.

HORWITZ, E. M.; LE BLANC, K.; DOMINICI, M.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F. C.; DEANS, R. J.; KRAUSE, D. S.; KEATING, A.; INTERNATIONAL SOCIETY FOR CELLULAR THERAPY. **Clarification of the**

nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 7(5):393–395, 2005.

HOSTETTER, T. H.; PFEFFER, J. M.; PFEFFER, M. A.; DWORKIN, L. D.; BRAUNWALD, E.; BRENNER, B. M. **Cardiorenal hemodynamics and sodium excretion in rats with myocardial infarction.** *The American Journal of Physiology*, 245(1):H98–103, 1983.

HUANG, X. P.; SUN, Z.; MIYAGI, Y.; MCDONALD, KINKAID, H.; ZHANG, L.; WEISEL, R. D.; LI, R. K. **Differentiation of allogeneic mesenchymal stem cells induces immunogenicity and limits their long-term benefits for myocardial repair.** *Circulation*, 122(23):2419–29, 2010.

HUIKURI, H. V.; MÄKIKALLIO, T. H.; PENG, C. K.; GOLDBERGER, A. L.; HINTZE, U.; MØLLER, M. **Fractal correlation properties of R-R interval dynamics and mortality in patients with depressed left ventricular function after an acute myocardial infarction.** *Circulation*, 101(1):47–53, 2000.

HUIKURI, H. V.; PERKIÖMÄKI, J. S.; MAESTRI, R.; PINNA, G. D. **Clinical impact of evaluation of cardiovascular control by novel methods of heart rate dynamics.** *Philosophical Transactions. Series A, Mathematical, Physical, and Engineering Sciences*, 367(1892):1223–1238, 2009.

HU, X.; WANG, J.; CHEN, J.; LUO, R.; HE, A.; XIE, X.; LI, J. **Optimal temporal delivery of bone marrow mesenchymal stem cells in rats with myocardial infarction.** *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery: Official Journal of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery*, 31(3):438–443, 2007.

INGLIS, S. C.; CLARK, R. A.; MCALISTER, F. A.; BALL, J.; LEWINTER, C.; CULLINGTON, D.; STEWART, S.; CLELAND, J. G. **Structured telephone support or telemonitoring programmes for patients with chronic heart failure.** *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, (8):CD007228, 2010.

IYENGAR, N.; PENG, C. K.; MORIN, R.; GOLDBERGER, A. L.; LIPSITZ, L. A. **Age-related alterations in the fractal scaling of cardiac interbeat interval dynamics.** *The American Journal of Physiology*, 271(4 Pt 2):R1078–1084, 1996.

JACOB, H. J.; RAMANTHAN, A.; PAN, S. G.; BRODY, M. J.; MYERS, G. A. **Spectral analysis of arterial pressure lability in rats with sinoaortic deafferentation.** *The American Journal of Physiology*, 269(6 Pt 2):R1481–1488, 1995.

JIANG, C.; GUI, C.; HE, A.; HU, X.; CHEN, J.; JIANG, Y.; WANG, J. **Optimal time for mesenchymal stem cell transplantation in rats with myocardial infarction.** *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 9(8):630–637, 2008.

JIANG, S.; HAIDER, H. K.; IDRIS, N. M.; SALIM, A.; ASHRAF, M. **Supportive interaction between cell survival signaling and angiocompetent factors enhances donor**

cell survival and promotes angiomyogenesis for cardiac repair. *Circulation Research*, 99(7):776–784, 2006.

JIN, J.; ZHAO, Y.; TAN, X.; GUO, C.; YANG, Z.; MIAO, D. **An improved transplantation strategy for mouse mesenchymal stem cells in an acute myocardial infarction model.** *PloS One*, 6(6):e21005, 2011.

JOHANSSON, P.; DAHLSTRÖM, U.; BROSTRÖM, A. **Factors and interventions influencing health-related quality of life in patients with heart failure: a review of the literature.** *European Journal of Cardiovascular Nursing: Journal of the Working Group on Cardiovascular Nursing of the European Society of Cardiology*, 5(1):5–15, 2006.

DE JONG, M. J.; RANDALL, D. C. **Heart rate variability analysis in the assessment of autonomic function in heart failure.** *The Journal of Cardiovascular Nursing*, 20(3):186–195; quiz 196–197, 2005.

JUGDUTT, B. I. **Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix: when is enough enough?.** *Circulation*, 108(11):1395–1403, 2003.

JULIEN, C.; ZHANG, Z. Q.; CERUTTI, C.; BARRÈS, C. **Hemodynamic analysis of arterial pressure oscillations in conscious rats.** *Journal of the Autonomic Nervous System*, 50(3):239–252, 1995.

JUN, C.; ZHIHUI, Z.; LU, W.; YAOMING, N.; LEI, W.; YAO, Q.; ZHIYUAN, S. **Canine bone marrow mesenchymal stromal cells with lentiviral mHCN4 gene transfer create cardiac pacemakers.** *Cytotherapy*, 14(5):529–539, 2012.

KAJSTURA, J.; URBANEK, K.; ROTA, M.; BEARZI, C.; HOSODA, T.; BOLLI, R.; ANVERSA, P.; LERI, A. **Cardiac stem cells and myocardial disease.** *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 45(4):505–513, 2008.

KAMATH, M. V.; FALLEN, E. L. **Power spectral analysis of heart rate variability: a noninvasive signature of cardiac autonomic function.** *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, 21(3):245–311, 1993.

KARANTALIS, V.; HARE, J. M. **Use of mesenchymal stem cells for therapy of cardiac disease.** *Circulation Research*, 116(8):1413–1430, 2015.

KARJALAINEN, J.; REUNANEN, A.; RISTOLA, P.; VIITASALO, M. **QT interval as a cardiac risk factor in a middle aged population.** *Heart (British Cardiac Society)*, 77(6):543–548, 1997.

KAR, S.; GAO, L.; BELATTI, D. A.; CURRY, P. L.; ZUCKER, I. H. **Central angiotensin (1-7) enhances baroreflex gain in conscious rabbits with heart failure.** *Hypertension*, 58(4):627–634, 2011.

KATRITSIS, D. G.; SOTIROPOULOU, P. A.; KARVOUNI, E.; KARABINOS, I.; KOROVESIS, S.; PEREZ, S. A.; VORIDIS, E. M.; PAPAMICHAIL, M. **Transcoronary transplantation of autologous mesenchymal stem cells and endothelial progenitors into infarcted human myocardium.** *Catheterization and Cardiovascular Interventions: Official Journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions*, 65(3):321–329, 2005.

KAYE DM, ESLER MD. **Abnormalities of the autonomic nervous system in heart failure.** *Cardiol Rev* 1995; 3: 184-195.

KAWAI, H.; MOHAN, A.; HAGEN, J.; DONG, E.; ARMSTRONG, J.; STEVENS, S. Y.; LIANG, C. S. **Alterations in cardiac adrenergic terminal function and beta-adrenoceptor density in pacing-induced heart failure.** *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 278(5):H1708–1716, 2000.

KEMP, C. D.; CONTE, J. V. **The pathophysiology of heart failure.** *Cardiovascular Pathology: The Official Journal of the Society for Cardiovascular Pathology*, 21(5):365–371, 2012.

KIM, S. K.; PAK, H.-N.; PARK, J. H.; FANG, Y. F.; KIM, G. I.; PARK, Y. D.; HWANG, C.; KIM, Y.-H.; KIM, B. S. **Cardiac cell therapy with mesenchymal stem cell induces cardiac nerve sprouting, angiogenesis, and reduced connexin43-positive gap junctions, but concomitant electrical pacing increases connexin43-positive gap junctions in canine heart.** *Cardiology in the Young*, 20(3):308–317, 2010.

KINNAIRD, T.; STABILE, E.; BURNETT, M. S.; SHOU, M.; LEE, C. W.; BARR, S.; FUCHS, S.; EPSTEIN, S. E. **Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms.** *Circulation*, 109(12):1543–1549, 2004.

KIRCHHEIM, H. R. **Systemic arterial baroreceptor reflexes.** *Physiological Reviews*, 56(1):100–177, 1976.

KIRCHHEIM, H. R.; JUST, A.; EHMKE, H. **Physiology and pathophysiology of baroreceptor function and neuro-hormonal abnormalities in heart failure.** *Basic Research in Cardiology*, 93 Suppl 1:1–22, 1998.

KLEIGER, R. E.; MILLER, J. P.; BIGGER, J. T.; MOSS, A. J. **Decreased heart rate variability and its association with increased mortality after acute myocardial infarction.** *The American Journal of Cardiology*, 59(4):256–262, 1987.

KOCHER, A. A.; SCHUSTER, M. D.; SZABOLCS, M. J.; TAKUMA, S.; BURKHOF, D.; WANG, J.; HOMMA, S.; EDWARDS, N. M.; ITESCU, S. **Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function.** *Nature Medicine*, 7(4):430–436, 2001.

KRAUSE, U.; HARTER, C.; SECKINGER, A.; WOLF, D.; REINHARD, A.; BEA, F.; DENGLER, T.; HARDT, S.; HO, A.; KATUS, H. A.; KUECHERER, H.; HANSEN, A. **Intravenous delivery of autologous mesenchymal stem cells limits infarct size and improves left ventricular function in the infarcted porcine heart.** *Stem Cells and Development*, 16(1):31–37, 2007.

KRIEGER, E. M.; SALGADO, H. C.; MICHELINI, L. C. **Resetting of the baroreceptors.** *International Review of Physiology*, 26:119–146, 1982.

KRISTEN, A. V.; JUST, A.; HAASS, M.; SELLER, H. **Central hypercapnic chemoreflex modulation of renal sympathetic nerve activity in experimental heart failure.** *Basic Research in Cardiology*, 97(2):177–186, 2002.

KUNZ, V. C.; SOUZA, R. B.; TAKAHASHI, A. C. M.; CATAI, A. M.; SILVA, E. **The relationship between cardiac autonomic function and clinical and angiographic characteristics in patients with coronary artery disease.** *Revista Brasileira De Fisioterapia (São Carlos (São Paulo, Brazil))*, 15(6):503–510, 2011.

LA ROVERE, M. T.; BIGGER, J. T.; MARCUS, F. I.; MORTARA, A.; SCHWARTZ, P. J. **Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. ATRAMI (Autonomic Tone and Reflexes After Myocardial Infarction) Investigators.** *Lancet (London, England)*, 351(9101):478–484, 1998.

LA ROVERE, M. T.; PINNA, G. D.; MAESTRI, R.; MORTARA, A.; CAPOMOLLA, S.; FEBO, O.; FERRARI, R.; FRANCHINI, M.; GNEMMI, M.; OPASICH, C.; RICCARDI, P. G.; TRAVERSI, E.; COBELLI, F. **Short-term heart rate variability strongly predicts sudden cardiac death in chronic heart failure patients.** *Circulation*, 107(4):565–570, 2003.

LA ROVERE, M. T.; PINNA, G. D.; MAESTRI, R.; ROBBI, E.; CAPOROTONDI, A.; GUAZZOTTI, G.; SLEIGHT, P.; FEBO, O. **Prognostic implications of baroreflex sensitivity in heart failure patients in the beta-blocking era.** *Journal of the American College of Cardiology*, 53(2):193–199, 2009.

LAI, P. F. H.; PANAMA, B. K.; MASSÉ, S.; LI, G.; ZHANG, Y.; KUSHA, M.; FARID, T. A.; ASTA, J.; BACKX, P. H.; YAU, T. M.; NANTHAKUMAR, K. **Mesenchymal stem cell transplantation mitigates electrophysiological remodeling in a rat model of myocardial infarction.** *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 24(7):813–821, 2013.

LATARO, R. M.; CASTANIA, J. A.; CHAPLEAU, M. W.; SALGADO, H. C.; FAZAN, R. **Baroreceptor and chemoreceptor contributions to the hypertensive response to bilateral carotid occlusion in conscious mice.** *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 299(6):H1990–1995, 2010.

LEE, A. S.; TANG, C.; RAO, M. S.; WEISSMAN, I. L.; WU, J. C. **Tumorigenicity as a Clinical Hurdle for Pluripotent Stem Cell Therapies.** *Nature medicine*, 19(8):998–1004, 2013.

LEOBON, B.; GARCIN, I.; MENASCHE, P.; VILQUIN, J.-T.; AUDINAT, E.; CHARPAK, S. **Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100(13):7808–7811, 2003.

LESMAN-LEEGTE, I.; JAARSMA, T.; COYNE, J. C.; HILLEGE, H. L.; VAN VELDHUISEN, D. J.; SANDERMAN, R. **Quality of life and depressive symptoms in the elderly: a comparison between patients with heart failure and age- and gender-matched community controls.** Journal of Cardiac Failure, 15(1):17–23, 2009.

LEVY, D.; KENCHIAIAH, S.; LARSON, M. G.; BENJAMIN, E. J.; KUPKA, M. J.; HO, K. K. L.; MURABITO, J. M.; VASAN, R. S. **Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure.** The New England Journal of Medicine, 347(18):1397–1402, 2002.

LIECHTY, K. W.; MACKENZIE, T. C.; SHAABAN, A. F.; RADU, A.; MOSELEY, A. M.; DEANS, R.; MARSHAK, D. R.; FLAKE, A. W. **Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep.** Nature Medicine, 6(11):1282–1286, 2000.

LIM, S. Y.; KIM, Y. S.; AHN, Y.; JEONG, M. H.; HONG, M. H.; JOO, S. Y.; NAM, K. I.; CHO, J. G.; KANG, P. M.; PARK, J. C. **The effects of mesenchymal stem cells transduced with Akt in a porcine myocardial infarction model.** Cardiovascular Research, 70(3):530–542, 2006.

LI, Q.; TURDI, S.; THOMAS, D. P.; ZHOU, T.; REN, J. **Intra-myocardial delivery of mesenchymal stem cells ameliorates left ventricular and cardiomyocyte contractile dysfunction following myocardial infarction.** Toxicology Letters, 195(2-3):119–126, 2010.

LITWIN, S. E.; KATZ, S. E.; MORGAN, J. P.; DOUGLAS, P. S. **Serial echocardiographic assessment of left ventricular geometry and function after large myocardial infarction in the rat.** Circulation, 89(1):345–354, 1994.

LIU, Z.; TANG, Y.; LÜ, S.; ZHOU, J.; DU, Z.; DUAN, C.; LI, Z.; WANG, C. **The tumorigenicity of iPS cells and their differentiated derivatives.** Journal of Cellular and Molecular Medicine, 17(6):782–791, 2013.

LI, Y.-L.; GAO, L.; ZUCKER, I. H.; SCHULTZ, H. D. **NADPH oxidase-derived superoxide anion mediates angiotensin II-enhanced carotid body chemoreceptor sensitivity in heart failure rabbits.** Cardiovascular Research, 75(3):546–554, 2007.

LOEHR, L. R.; ROSAMOND, W. D.; CHANG, P. P.; FOLSOM, A. R.; CHAMBLESS, L. E. **Heart failure incidence and survival (from the Atherosclerosis Risk in Communities study).** The American Journal of Cardiology, 101(7):1016–1022, 2008.

LOU, S. JIE; GU, P.; CHEN, F.; HE, C.; WANG, M. WEI; LU, C. LIN. **The effect of bone marrow stromal cells on neuronal differentiation of mesencephalic neural stem cells in Sprague-Dawley rats.** *Brain Research*, 968(1):114–121, 2003.

LUCREZIOTTI, S.; GAVAZZI, A.; SCELSI, L.; INSERRA, C.; KLERSY, C.; CAMPANA, C.; GHIO, S.; VANOLI, E.; TAVAZZI, L. **Five-minute recording of heart rate variability in severe chronic heart failure: correlates with right ventricular function and prognostic implications.** *American Heart Journal*, 139(6):1088–1095, 2000.

MADONNA, R.; FERDINANDY, P.; DE CATERINA, R.; WILLERSON, J. T.; MARIAN, A. J. **Recent developments in cardiovascular stem cells.** *Circulation Research*, 115(12):e71–78, 2014.

MAJANI, G.; GIARDINI, A.; OPASICH, C.; GLAZER, R.; HESTER, A.; TOGNONI, G.; COHN, J. N.; TAVAZZI, L. **Effect of valsartan on quality of life when added to usual therapy for heart failure: results from the Valsartan Heart Failure Trial.** *Journal of Cardiac Failure*, 11(4):253–259, 2005.

MÄKIKALLIO, T. H.; HUIKURI, H. V.; HINTZE, U.; VIDEBAEK, J.; MITRANI, R. D.; CASTELLANOS, A.; MYERBURG, R. J.; MØLLER, M.; DIAMOND STUDY GROUP (DANISH INVESTIGATIONS OF ARRHYTHMIA AND MORTALITY ON DOFETILIDE). **Fractal analysis and time- and frequency-domain measures of heart rate variability as predictors of mortality in patients with heart failure.** *The American Journal of Cardiology*, 87(2):178–182, 2001.

MÄKIKALLIO, T. H.; SEPPÄNEN, T.; AIRAKSINEN, K. E.; KOISTINEN, J.; TULPPO, M. P.; PENG, C. K.; GOLDBERGER, A. L.; HUIKURI, H. V. **Dynamic analysis of heart rate may predict subsequent ventricular tachycardia after myocardial infarction.** *The American Journal of Cardiology*, 80(6):779–783, 1997.

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.** *The Journal of Clinical Investigation*, 103(5):697–705, 1999.

MALAVE, H. A.; TAYLOR, A. A.; NATTAMA, J.; DESWAL, A.; MANN, D. L. **Circulating levels of tumor necrosis factor correlate with indexes of depressed heart rate variability: a study in patients with mild-to-moderate heart failure.** *Chest*, 123(3):716–724, 2003.

MALLIANI, A. **Cardiovascular sympathetic afferent fibers.** *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 94:11–74, 1982.

MALLIANI, A. **The Pattern of Sympathovagal Balance Explored in the Frequency Domain.** *News in Physiological Sciences: An International Journal of Physiology Produced Jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society*, 14:111–117, 1999.

MALLIANI, A.; PAGANI, M.; FURLAN, R.; GUZZETTI, S.; LUCINI, D.; MONTANO, N.; CERUTTI, S.; MELA, G. S. **Individual recognition by heart rate variability of two different autonomic profiles related to posture.** *Circulation*, 96(12):4143–4145, 1997.

MANCIA, G.; SERAVALLE, G.; GIANNATTASIO, C.; BOSSI, M.; PRETI, L.; CATTANEO, B. M.; GRASSI, G. **Reflex cardiovascular control in congestive heart failure.** *The American Journal of Cardiology*, 69(18):17G–22G; discussion 22G–23G, 1992.

MARK, A. L. **Sympathetic dysregulation in heart failure: mechanisms and therapy.** *Clinical Cardiology*, 18(3 Suppl I):I3–8, 1995.

MATHIASSEN, A. B.; JØRGENSEN, E.; QAYYUM, A. A.; HAACK-SØRENSEN, M.; EKBLOND, A.; KASTRUP, J. **Rationale and design of the first randomized, double-blind, placebo-controlled trial of intramyocardial injection of autologous bone-marrow derived Mesenchymal Stromal Cells in chronic ischemic Heart Failure (MSC-HF Trial).** *American Heart Journal*, 164(3):285–291, 2012.

MAZHARI, R.; HARE, J. M. **Translational findings from cardiovascular stem cell research.** *Trends in Cardiovascular Medicine*, 22(1):1–6, 2012.

MCALISTER, F. A.; STEWART, S.; FERRUA, S.; MCMURRAY, J. J. J. V. **Multidisciplinary strategies for the management of heart failure patients at high risk for admission: a systematic review of randomized trials.** *Journal of the American College of Cardiology*, 44(4):810–819, 2004.

MEIRELLES, L. DA S.; FONTES, A. M.; COVAS, D. T.; CAPLAN, A. I. **Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells.** *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 20(5-6):419–427, 2009.

MEIRELLES, L. DA S.; NARDI, N. B. **Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization.** *British Journal of Haematology*, 123(4):702–711, 2003.

MEIRELLES, L. DA S.; NARDI, N. B. **Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells.** *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 14:4281–4298, 2009.

MEJIA, J.; GALVIS-ALONSO, O. Y.; CASTRO, A. A. DE; BRAGA, J.; LEITE, J. P.; SIMÕES, M. V. **A clinical gamma camera-based pinhole collimated system for high resolution small animal SPECT imaging.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Médicas E Biológicas / Sociedade Brasileira De Biofísica ... [et Al.]*, 43(12):1160–1166, 2010.

MÉNARD, C.; HAGÈGE, A. A.; AGBULUT, O.; BARRO, M.; MORICHETTI, M. C.; BRASSELET, C.; BEL, A.; MESSAS, E.; BISSERY, A.; BRUNEVAL, P.; DESNOS, M.; PUCÉAT, M.; MENASCHÉ, P. **Transplantation of cardiac-committed mouse embryonic stem cells to infarcted sheep myocardium: a preclinical study.** *Lancet (London, England)*, 366(9490):1005–1012, 2005.

MIKI, K.; UENAKA, H.; SAITO, A.; MIYAGAWA, S.; SAKAGUCHI, T.; HIGUCHI, T.; SHIMIZU, T.; OKANO, T.; YAMANAKA, S.; SAWA, Y. **Bioengineered myocardium derived from induced pluripotent stem cells improves cardiac function and attenuates cardiac remodeling following chronic myocardial infarction in rats.** *Stem Cells Translational Medicine*, 1(5):430–437, 2012.

MINICUCCI, M. F.; AZEVEDO, P. S.; MARTINEZ, P. F.; LIMA, A. R. R.; BONOMO, C.; GUIZONI, D. M.; POLEGATO, B. F.; OKOSHI, M. P.; OKOSHI, K.; MATSUBARA, B. B.; PAIVA, S. A. R.; ZORNOFF, L. A. M. **Critical infarct size to induce ventricular remodeling, cardiac dysfunction and heart failure in rats.** *International Journal of Cardiology*, 151(2):242–243, 2011.

MIRAGOLI, M.; SALVARANI, N.; ROHR, S. **Myofibroblasts induce ectopic activity in cardiac tissue.** *Circulation Research*, 101(8):755–758, 2007.

MOHAN, H. K.; LIVIERATOS, L.; GALLAGHER, S.; BAILEY, D. L.; CHAMBERS, J.; FOGELMAN, I. **Comparison of myocardial gated single photon emission computerised tomography, planar radionuclide ventriculography and echocardiography in evaluating left ventricular ejection fraction, wall thickening and wall motion.** *International Journal of Clinical Practice*, 58(12):1120–1126, 2004.

MONNET, E.; CHACHQUES, J. C. **Animal models of heart failure: what is new?.** *The Annals of Thoracic Surgery*, 79(4):1445–1453, 2005.

MONTANO, N.; PORTA, A.; COGLIATI, C.; COSTANTINO, G.; TOBALDINI, E.; CASALI, K. R.; IELLAMO, F. **Heart rate variability explored in the frequency domain: a tool to investigate the link between heart and behavior.** *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 33(2):71–80, 2009.

MONTANO, N.; RUSCONE, T. G.; PORTA, A.; LOMBARDI, F.; PAGANI, M.; MALLIANI, A. **Power spectrum analysis of heart rate variability to assess the changes in sympathovagal balance during graded orthostatic tilt.** *Circulation*, 90(4):1826–1831, 1994.

MORITA, H.; SUZUKI, G.; HADDAD, W.; MIKA, Y.; TANHEHCO, E. J.; GOLDSTEIN, S.; BEN-HAIM, S.; SABBAB, H. N. **Long-term effects of non-excitatory cardiac contractility modulation electric signals on the progression of heart failure in dogs.** *European Journal of Heart Failure*, 6(2):145–150, 2004.

MUDERS, F.; ELSNER, D. **Animal model of chronic heart failure.** *Pharmacological Research*, 41(6):605–612, 2000.

MURDOCH, C. E.; ZHANG, M.; CAVE, A. C.; SHAH, A. M. **NADPH oxidase-dependent redox signalling in cardiac hypertrophy, remodelling and failure.** *Cardiovascular Research*, 71(2):208–215, 2006.

NAGAYA, N.; FUJII, T.; IWASE, T.; OHGUSHI, H.; ITOH, T.; UEMATSU, M.; YAMAGISHI, M.; MORI, H.; KANGAWA, K.; KITAMURA, S. **Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis.** *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 287(6):H2670–2676, 2004.

NAGAYA, N.; KANGAWA, K.; ITOH, T.; IWASE, T.; MURAKAMI, S.; MIYAHARA, Y.; FUJII, T.; UEMATSU, M.; OHGUSHI, H.; YAMAGISHI, M.; TOKUDOME, T.; MORI, H.; MIYATAKE, K.; KITAMURA, S. **Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy.** *Circulation*, 112(8):1128–1135, 2005.

NOLAN, J.; BATIN, P. D.; ANDREWS, R.; LINDSAY, S. J.; BROOKSBY, P.; MULLEN, M.; BAIG, W.; FLAPAN, A. D.; COWLEY, A.; PRESCOTT, R. J.; NEILSON, J. M.; FOX, K. A. **Prospective study of heart rate variability and mortality in chronic heart failure: results of the United Kingdom heart failure evaluation and assessment of risk trial (UK-heart).** *Circulation*, 98(15):1510–1516, 1998.

NUSSBAUM, J.; MINAMI, E.; LAFLAMME, M. A.; VIRAG, J. A. I.; WARE, C. B.; MASINO, A.; MUSKHELI, V.; PABON, L.; REINECKE, H.; MURRY, C. E. **Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response.** *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 21(7):1345–1357, 2007.

OLIVARI, M. T.; LEVINE, T. B.; COHN, J. N. **Abnormal neurohumoral response to nitroprusside infusion in congestive heart failure.** *Journal of the American College of Cardiology*, 2(3):411–417, 1983.

OLIVEIRA, L. F. L. DE; MEJIA, J.; CARVALHO, E. E. V. DE; LATARO, R. M.; FRASSETTO, S. N.; FAZAN, R.; SALGADO, H. C.; GALVIS-ALONSO, O. Y.; SIMÕES, M. V. **Myocardial infarction area quantification using high-resolution SPECT images in rats.** *Arquivos Brasileiros De Cardiologia*, 101(1):59–67, 2013.

OLSHANSKY, B.; SABBAH, H. N.; HAUPTMAN, P. J.; COLUCCI, W. S. **Parasympathetic nervous system and heart failure: pathophysiology and potential implications for therapy.** *Circulation*, 118(8):863–871, 2008.

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*, 410(6829):701–705, 2001.

ORTIZ, L. A.; GAMBELLI, F.; MCBRIDE, C.; GAUPP, D.; BADDOO, M.; KAMINSKI, N.; PHINNEY, D. G. **Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(14):8407–8411, 2003.

OSTERZIEL, K. J.; HÄNLEIN, D.; WILLENBROCK, R.; EICHHORN, C.; LUFT, F.; DIETZ, R. **Baroreflex sensitivity and cardiovascular mortality in patients with mild to moderate heart failure.** *British Heart Journal*, 73(6):517–522, 1995.

PACHER, R.; STANEK, B.; HÜLSMANN, M.; KOLLER-STRAMETZ, J.; BERGER, R.; SCHULLER, M.; HARTTER, E.; OGRIS, E.; FREY, B.; HEINZ, G.; MAURER, G. **Prognostic impact of big endothelin-1 plasma concentrations compared with invasive hemodynamic evaluation in severe heart failure.** *Journal of the American College of Cardiology*, 27(3):633–641, 1996.

PADMANABHAN, S.; SILVET, H.; AMIN, J.; PAI, R. G. **Prognostic value of QT interval and QT dispersion in patients with left ventricular systolic dysfunction: results from a cohort of 2265 patients with an ejection fraction of < or =40%.** *American Heart Journal*, 145(1):132–138, 2003.

PAGANI, M.; LOMBARDI, F.; GUZZETTI, S.; RIMOLDI, O.; FURLAN, R.; PIZZINELLI, P.; SANDRONE, G.; MALFATTO, G.; DELL'ORTO, S.; PICCALUGA, E. **Power spectral analysis of heart rate and arterial pressure variabilities as a marker of sympatho-vagal interaction in man and conscious dog.** *Circulation Research*, 59(2):178–193, 1986a.

PAGANI, M.; LOMBARDI, F.; GUZZETTI, S.; RIMOLDI, O.; FURLAN, R.; PIZZINELLI, P.; SANDRONE, G.; MALFATTO, G.; DELL'ORTO, S.; PICCALUGA, E. **Power spectral analysis of heart rate and arterial pressure variabilities as a marker of sympatho-vagal interaction in man and conscious dog.** *Circulation Research*, 59(2):178–193, 1986b.

PAK, H.-N.; QAYYUM, M.; KIM, D. T.; HAMABE, A.; MIYAUCHI, Y.; LILL, M. C.; FRANTZEN, M.; TAKIZAWA, K.; CHEN, L. S.; FISHBEIN, M. C.; SHARIFI, B. G.; CHEN, P.-S.; MAKKAR, R. **Mesenchymal stem cell injection induces cardiac nerve sprouting and increased tenascin expression in a Swine model of myocardial infarction.** *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 14(8):841–848, 2003.

PATTEN, R. D.; HALL-PORTER, M. R. **Small animal models of heart failure: development of novel therapies, past and present.** *Circulation. Heart Failure*, 2(2):138–144, 2009.

PEDRETTI, R. F.; CATALANO, O.; BALLARDINI, L.; DE BONO, D. P.; RADICE, E.; TRAMARIN, R. **Prognosis in myocardial infarction survivors with left ventricular dysfunction is predicted by electrocardiographic RR interval but not QT dispersion.** *International Journal of Cardiology*, 68(1):83–93, 1999.

PENG, C. K.; HAVLIN, S.; STANLEY, H. E.; GOLDBERGER, A. L. **Quantification of scaling exponents and crossover phenomena in nonstationary heartbeat time series.** *Chaos (Woodbury, N.Y.)*, 5(1):82–87, 1995.

PERIN, E. C.; BOROW, K. M.; SILVA, G. V.; DEMARIA, A. N.; MARROQUIN, O. C.; HUANG, P.; TRAVERSE, J. H.; KRUM, H.; SKERRETT, D.; ZHENG, Y.; WILLERSON, J. T.; ITESCU, S.; HENRY, T. D. **A Phase II Dose-Escalation Study of Allogeneic**

Mesenchymal Precursor Cells in Patients With Ischemic or Non-Ischemic Heart Failure. *Circulation Research*, 2015.

PERIN, E. C.; DOHMANN, H. F. R.; BOROJEVIC, R.; SILVA, S. A.; SOUSA, A. L. S.; MESQUITA, C. T.; ROSSI, M. I. D.; CARVALHO, A. C.; DUTRA, H. S.; DOHMANN, H. J. F.; SILVA, G. V.; BELÉM, L.; VIVACQUA, R.; RANGEL, F. O. D.; ESPORCATTE, R.; GENG, Y. J.; VAUGHN, W. K.; ASSAD, J. A. R.; MESQUITA, E. T.; WILLERSON, J. T. **Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure.** *Circulation*, 107(18):2294–2302, 2003.

PETROVIC, D. **Cytopathological basis of heart failure--cardiomyocyte apoptosis, interstitial fibrosis and inflammatory cell response.** *Folia Biologica*, 50(2):58–62, 2004.

PFEFFER, J. M.; PFEFFER, M. A.; BRAUNWALD, E. **Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left ventricle of the rat.** *Circulation Research*, 57(1):84–95, 1985.

PFEFFER, M. A.; BRAUNWALD, E. **Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications.** *Circulation*, 81(4):1161–1172, 1990.

PFEFFER, M. A.; PFEFFER, J. M.; FISHBEIN, M. C.; FLETCHER, P. J.; SPADARO, J.; KLONER, R. A.; BRAUNWALD, E. **Myocardial infarct size and ventricular function in rats.** *Circulation Research*, 44(4):503–512, 1979.

PFEFFER, M. A.; PFEFFER, J. M.; STEINBERG, C.; FINN, P. **Survival after an experimental myocardial infarction: beneficial effects of long-term therapy with captopril.** *Circulation*, 72(2):406–412, 1985.

PIAO, H.; YOUN, T.-J.; KWON, J.-S.; KIM, Y.-H.; BAE, J.-W.; BORA-SOHN, NULL; KIM, D.-W.; CHO, M.-C.; LEE, M.-M.; PARK, Y.-B. **Effects of bone marrow derived mesenchymal stem cells transplantation in acutely infarcting myocardium.** *European Journal of Heart Failure*, 7(5):730–738, 2005.

PIKKUJÄMSÄ, S. M.; MÄKIKALLIO, T. H.; SOURANDER, L. B.; RÄIHÄ, I. J.; PUUKKA, P.; SKYTTÄ, J.; PENG, C. K.; GOLDBERGER, A. L.; HUIKURI, H. V. **Cardiac interbeat interval dynamics from childhood to senescence: comparison of conventional and new measures based on fractals and chaos theory.** *Circulation*, 100(4):393–399, 1999.

PITTENGER, M. F.; MACKAY, A. M.; BECK, S. C.; JAISWAL, R. K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J. D.; MOORMAN, M. A.; SIMONETTI, D. W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D. R. **Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.** *Science (New York, N.Y.)*, 284(5411):143–147, 1999.

PLENTZ, R. D. M. *ClinicalTrials.gov*, Identifier: NCT01252407, 2010.

PLOTNIKOV, A. N.; SOSUNOV, E. A.; QU, J.; SHLAPAKOVA, I. N.; ANYUKHOVSKY, E. P.; LIU, L.; JANSE, M. J.; BRINK, P. R.; COHEN, I. S.; ROBINSON, R. B.; DANILO, P.; ROSEN, M. R. **Biological pacemaker implanted in canine left bundle branch provides ventricular escape rhythms that have physiologically acceptable rates.** *Circulation*, 109(4):506–512, 2004.

POMERANZ, B.; MACAULAY, R. J.; CAUDILL, M. A.; KUTZ, I.; ADAM, D.; GORDON, D.; KILBORN, K. M.; BARGER, A. C.; SHANNON, D. C.; COHEN, R. J. **Assessment of autonomic function in humans by heart rate spectral analysis.** *The American Journal of Physiology*, 248(1 Pt 2):H151–153, 1985.

PONIKOWSKI, P.; ANKER, S. D.; CHUA, T. P.; SZELEMEJ, R.; PIEPOLI, M.; ADAMOPOULOS, S.; WEBB-PEPLOE, K.; HARRINGTON, D.; BANASIAK, W.; WRABEC, K.; COATS, A. J. **Depressed heart rate variability as an independent predictor of death in chronic congestive heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy.** *The American Journal of Cardiology*, 79(12):1645–1650, 1997.

PORTA, A.; BARI, V.; BADILINI, F.; TOBALDINI, E.; GNECCHI-RUSCONE, T.; MONTANO, N. **Frequency domain assessment of the coupling strength between ventricular repolarization duration and heart period during graded head-up tilt.** *Journal of Electrocardiology*, 44(6):662–668, 2011.

PORTA, A.; FAES, L.; MASÉ, M.; D'ADDIO, G.; PINNA, G. D.; MAESTRI, R.; MONTANO, N.; FURLAN, R.; GUZZETTI, S.; NOLLO, G.; MALLIANI, A. **An integrated approach based on uniform quantization for the evaluation of complexity of short-term heart period variability: Application to 24 h Holter recordings in healthy and heart failure humans.** *Chaos (Woodbury, N.Y.)*, 17(1):015117, 2007.

PORTA, A.; GNECCHI-RUSCONE, T.; TOBALDINI, E.; GUZZETTI, S.; FURLAN, R.; MONTANO, N. **Progressive decrease of heart period variability entropy-based complexity during graded head-up tilt.** *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, 103(4):1143–1149, 2007.

PORTA, A.; TOBALDINI, E.; GUZZETTI, S.; FURLAN, R.; MONTANO, N.; GNECCHI-RUSCONE, T. **Assessment of cardiac autonomic modulation during graded head-up tilt by symbolic analysis of heart rate variability.** *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 293(1):H702–708, 2007.

PORTER, T. R.; ECKBERG, D. L.; FRITSCH, J. M.; REA, R. F.; BEIGHTOL, L. A.; SCHMEDTJE, J. F.; MOHANTY, P. K. **Autonomic pathophysiology in heart failure patients. Sympathetic-cholinergic interrelations.** *The Journal of Clinical Investigation*, 85(5):1362–1371, 1990.

POTAPOVA, I.; PLOTNIKOV, A.; LU, Z.; DANILO, P.; VALIUNAS, V.; QU, J.; DORONIN, S.; ZUCKERMAN, J.; SHLAPAKOVA, I. N.; GAO, J.; PAN, Z.; HERRON, A. J.; ROBINSON, R. B.; BRINK, P. R.; ROSEN, M. R.; COHEN, I. S. **Human mesenchymal**

stem cells as a gene delivery system to create cardiac pacemakers. *Circulation Research*, 94(7):952–959, 2004.

POULSOM, R.; ALISON, M. R.; FORBES, S. J.; WRIGHT, N. A. **Adult stem cell plasticity.** *The Journal of Pathology*, 197(4):441–456, 2002.

PSALTIS, P. J.; SPOON, D. B.; WONG, D. T. L.; GULATI, R. **An update on stem cell therapies for acute coronary syndrome.** *Current Cardiology Reports*, 16(9):526, 2014.

PUMPRLA, J.; HOWORKA, K.; GROVES, D.; CHESTER, M.; NOLAN, J. **Functional assessment of heart rate variability: physiological basis and practical applications.** *International Journal of Cardiology*, 84(1):1–14, 2002.

RADAELLI, A.; PERLANGELI, S.; CERUTTI, M. C.; MIRCOLI, L.; MORI, I.; BOSELLI, L.; BONAITA, M.; TERZOLI, L.; CANDOTTI, G.; SIGNORINI, G.; FERRARI, A. U. **Altered blood pressure variability in patients with congestive heart failure.** *Journal of Hypertension*, 17(12 Pt 2):1905–1910, 1999.

REINECKE, H.; MACDONALD, G. H.; HAUSCHKA, S. D.; MURRY, C. E. **Electromechanical coupling between skeletal and cardiac muscle. Implications for infarct repair.** *The Journal of Cell Biology*, 149(3):731–740, 2000.

RICHMAN, J. S.; MOORMAN, J. R. **Physiological time-series analysis using approximate entropy and sample entropy.** *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 278(6):H2039–2049, 2000.

ROGER, V. L.; GO, A. S.; LLOYD-JONES, D. M.; ADAMS, R. J.; BERRY, J. D.; BROWN, T. M.; CARNETHON, M. R.; DAI, S.; DE SIMONE, G.; FORD, E. S.; FOX, C. S.; FULLERTON, H. J.; GILLESPIE, C.; GREENLUND, K. J.; HAILPERN, S. M.; HEIT, J. A.; HO, P. M.; HOWARD, V. J.; KISSELA, B. M.; KITTNER, S. J.; LACKLAND, D. T.; LICHTMAN, J. H.; LISABETH, L. D.; MAKUC, D. M.; MARCUS, G. M.; MARELLI, A.; MATCHAR, D. B.; MCDERMOTT, M. M.; MEIGS, J. B.; MOY, C. S.; MOZAFFARIAN, D.; MUSSOLINO, M. E.; NICHOL, G.; PAYNTER, N. P.; ROSAMOND, W. D.; SORLIE, P. D.; STAFFORD, R. S.; TURAN, T. N.; TURNER, M. B.; WONG, N. D.; WYLIE-ROSETT, J.; AMERICAN HEART ASSOCIATION STATISTICS COMMITTEE AND STROKE STATISTICS SUBCOMMITTEE. **Heart disease and stroke statistics--2011 update: a report from the American Heart Association.** *Circulation*, 123(4):e18–e209, 2011.

ROGER, V. L.; WESTON, S. A.; REDFIELD, M. M.; HELLERMANN-HOMAN, J. P.; KILLIAN, J.; YAWN, B. P.; JACOBSEN, S. J. **Trends in heart failure incidence and survival in a community-based population.** *JAMA*, 292(3):344–350, 2004.

ROSEN, M. R.; BRINK, P. R.; COHEN, I. S.; ROBINSON, R. B. **Biological pacemakers based on I(f).** *Medical & Biological Engineering & Computing*, 45(2):157–166, 2007.

ROSS, R. S. **Hypotension and the shock syndrome in myocardial infarction.** *Journal of the Iowa Medical Society*, 59(9):847–849, 1969.

SABBAH, H. N.; RASTOGI, S.; MISHRA, S.; GUPTA, R. E. C.; ILSAR, I.; IMAI, M.; COHEN, U.; BEN-DAVID, T.; BEN-EZRA, O. **Long-term therapy with neuroselective electric vagus nerve stimulation improves LV function and attenuates global LV remodeling in dogs with chronic heart failure.** *European Journal of Heart Failure*. 166, Suppl. 4, Abstract, 2005.

SABINO, J. P. J.; DA SILVA, C. A. A.; GIUSTI, H.; GLASS, M. L.; SALGADO, H. C.; FAZAN, R. **Parasympathetic activation by pyridostigmine on chemoreflex sensitivity in heart-failure rats.** *Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical*, 179(1-2):43–48, 2013.

SALGADO, H. C.; KRIEGER, E. M. **Time course of baroreceptor resetting in short-term hypotension in the rat.** *The American Journal of Physiology*, 234(5):H552–556, 1978.

SANGANALMATH, S. K.; BOLLI, R. **Cell therapy for heart failure: a comprehensive overview of experimental and clinical studies, current challenges, and future directions.** *Circulation Research*, 113(6):810–834, 2013.

SAPOZNIKOV, D.; BACKENROTH, R.; RUBINGER, D. **Baroreflex sensitivity and sympatho-vagal balance during intradialytic hypotensive episodes.** *Journal of Hypertension*, 28(2):314–324, 2010.

SAUL, J. P.; ARAI, Y.; BERGER, R. D.; LILLY, L. S.; COLUCCI, W. S.; COHEN, R. J. **Assessment of autonomic regulation in chronic congestive heart failure by heart rate spectral analysis.** *The American Journal of Cardiology*, 61(15):1292–1299, 1988.

SCALVINI, S.; VOLTERRANI, M.; ZANELLI, E.; PAGANI, M.; MAZZUERO, G.; COATS, A. J.; GIORDANO, A. **Is heart rate variability a reliable method to assess autonomic modulation in left ventricular dysfunction and heart failure? Assessment of autonomic modulation with heart rate variability.** *International Journal of Cardiology*, 67(1):9–17, 1998.

SCHULTZ, H. D.; LI, Y. L.; DING, Y. **Arterial chemoreceptors and sympathetic nerve activity: implications for hypertension and heart failure.** *Hypertension*, 50(1):6–13, 2007.

SCHWARTZ, P. J.; DE FERRARI, G. M. **Sympathetic-parasympathetic interaction in health and disease: abnormalities and relevance in heart failure.** *Heart Failure Reviews*, 16(2):101–107, 2011.

SCHWARTZ, P. J.; WOLF, S. **QT interval prolongation as predictor of sudden death in patients with myocardial infarction.** *Circulation*, 57(6):1074–1077, 1978.

SCORSIN, M.; HAGÈGE, A.; VILQUIN, J. T.; FISZMAN, M.; MAROTTE, F.; SAMUEL, J. L.; RAPPAPORT, L.; SCHWARTZ, K.; MENASCHÉ, P. **Comparison of the effects of fetal cardiomyocyte and skeletal myoblast transplantation on postinfarction left**

ventricular function. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 119(6):1169–1175, 2000.

SELL, S. **Stem cell origin of cancer and differentiation therapy.** *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 51(1):1–28, 2004.

SHAKE, J. G.; GRUBER, P. J.; BAUMGARTNER, W. A.; SENECHAL, G.; MEYERS, J.; REDMOND, J. M.; PITTENGER, M. F.; MARTIN, B. J. **Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects.** *The Annals of Thoracic Surgery*, 73(6):1919–1925; discussion 1926, 2002.

SHEPHERD JT, VANHOUTTE PM. **Nerohumoral regulation. Em: The human cardiovascular system**, ed. Shepherd JT, Vanhoutte PM 5: 107-155, Raven Press, New York, 1979.

SHIM, W. S. N.; TAN, G.; GU, Y.; QIAN, L.; LI, S.; CHUNG, Y. Y.; LIM, S. Y.; SIM, E.; CHUAH, S. C.; WONG, P. **Dose-dependent systolic contribution of differentiated stem cells in post-infarct ventricular function.** *The Journal of Heart and Lung Transplantation: The Official Publication of the International Society for Heart Transplantation*, 29(12):1415–1426, 2010.

SIGNORINI, M. G.; FERRARIO, M.; MARCHETTI, M.; MARSEGLIA, A. **Nonlinear analysis of heart rate variability signal for the characterization of cardiac heart failure patients.** *Conference proceedings: ... Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Annual Conference*, 1:3431–3434, 2006.

SILVA, L. E. V.; MURTA, L. O. **Evaluation of physiologic complexity in time series using generalized sample entropy and surrogate data analysis.** *Chaos (Woodbury, N.Y.)*, 22(4):043105, 2012.

SMITS, A. M.; VAN VLIET, P.; HASSINK, R. J.; GOUMANS, M.-J.; DOEVENDANS, P. A. **The role of stem cells in cardiac regeneration.** *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 9(1):25–36, 2005.

SONG, B.; LIAO, B.; YU, F.; XIA, Z. **[Expression of connexin 40 and hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel 4 in rat bone marrow mesenchymal stem cells cocultured with sinoatrial node tissues in vitro].** *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi = Zhongguo Xiufu Chongjian Waike Zazhi = Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery*, 26(2):146–151, 2012.

SORDI, V. **Mesenchymal stem cell homing capacity.** *Transplantation*, 87(9 Suppl):S42–45, 2009.

STAUSS, H. M. **Identification of blood pressure control mechanisms by power spectral analysis.** *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 34(4):362–368, 2007.

STRAUER, B. E.; KORNOWSKI, R. **Stem cell therapy in perspective**. *Circulation*, 107(7):929–934, 2003.

SU, D. F.; CERUTTI, C.; BARRÈS, C.; JULIEN, C.; VINCENT, M.; PAULTRE, C.; SASSARD, J. **Arterial baroreflex control of heart period is not related to blood pressure variability in conscious hypertensive and normotensive rats**. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 19(11):767–776, 1992.

SUTTON, M. G.; SHARPE, N. **Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy**. *Circulation*, 101(25):2981–2988, 2000.

SWYNGHEDAUW, B. **Molecular mechanisms of myocardial remodeling**. *Physiological Reviews*, 79(1):215–262, 1999.

SWYNGHEDAUW, B. **Molecular Cardiology for the Cardiologist**. Boston: Kluwer Academics, 1995.

SWYNGHEDAUW, B. **[The acquired long QT during cardiac hypertrophy. Origin, incidence and significance]**. *Bulletin De l'Académie Nationale De Médecine*, 189(1):31–40; discussion 40–42, 2005.

SWYNGHEDAUW, B.; JASSON, S.; CHEVALIER, B.; CLAIRAMBAULT, J.; HARDOUIN, S.; HEYMES, C.; MANGIN, L.; MANSIER, P.; MÉDIGUE, C.; MOALIC, J. M.; THIBAUT, N.; CARRÉ, F. **Heart rate and heart rate variability, a pharmacological target**. *Cardiovascular Drugs and Therapy / Sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy*, 10(6):677–685, 1997.

TAKAHASHI, A. C. M.; PORTA, A.; MELO, R. C.; QUITÉRIO, R. J.; DA SILVA, E.; BORGHI-SILVA, A.; TOBALDINI, E.; MONTANO, N.; CATAI, A. M. **Aging reduces complexity of heart rate variability assessed by conditional entropy and symbolic analysis**. *Internal and Emergency Medicine*, 7(3):229–235, 2012.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. **Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors**. *Cell*, 126(4):663–676, 2006.

TANNA, T.; SACHAN, V. **Mesenchymal stem cells: potential in treatment of neurodegenerative diseases**. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 9(6):513–521, 2014.

TAPANAINEN, J. M.; THOMSEN, P. E. B.; KØBER, L.; TORP-PEDERSEN, C.; MÄKIKALLIO, T. H.; STILL, A.-M.; LINDGREN, K. S.; HUIKURI, H. V. **Fractal analysis of heart rate variability and mortality after an acute myocardial infarction**. *American Journal of Cardiology*, 90(4):347–352, 2002.

TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY THE NORTH AMERICAN SOCIETY OF PACING ELECTROPHYSIOLOGY: **Heart Rate Variability: Standards of Measurement, Physiological Interpretation and Clinical Use**. *Circulation*, 93:1043-1065, 1996.

TASK FORCE OF AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY FOUNDATION / AMERICAN HEART ASSOCIATION ON PRACTICE GUIDELINES. Yancy, C. W.; Jessup, M.; Bozkurt, B.; Butler, J.; Casey, D. E. Jr.; Drazner, M. H.; Fonarow, G. C.; Geraci, S. A.; Horwich, T.; Januzzi, J. L.; Johnson, M. R.; Kasper, E. K.; Levy, W. C.; Masoudi, F. A.; McBride, P. E.; McMurray, J. J.; Mitchell, J. E.; Peterson, P. N.; Riegel, B.; Sam, F.; Stevenson, L. W.; Tang, W. H.; Tsai, E. J.; Wilkoff, B. L. **ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines.** *Circulation*, 128:e240-327, 2013.

TAYLOR, D. A.; ATKINS, B. Z.; HUNGSPREUGS, P.; JONES, T. R.; REEDY, M. C.; HUTCHESON, K. A.; GLOWER, D. D.; KRAUS, W. E. **Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation.** *Nature Medicine*, 4(8):929–933, 1998.

TEN HOVE, W. R.; VERSPAGET, H. W.; BARGE, R.; LAMERS, C. B.; VAN HOEK, B. **Liver chimerism after allogeneic blood stem cell transplantation.** *Transplantation Proceedings*, 39(1):231–236, 2007.

THAMES, M. D.; KINUGAWA, T.; SMITH, M. L.; DIBNER-DUNLAP, M. E. **Abnormalities of baroreflex control in heart failure.** *Journal of the American College of Cardiology*, 22(4 Suppl A):56A–60A, 1993.

THAMES, M. D.; SCHMID, P. G. **Interaction between carotid and cardiopulmonary baroreflexes in control of plasma ADH.** *The American Journal of Physiology*, 241(3):H431–434, 1981.

THOMAS, G. D. **Neural control of the circulation.** *Advances in Physiology Education*, 35(1):28–32, 2011.

THRASHER, T. N. **Baroreceptors, baroreceptor unloading, and the long-term control of blood pressure.** *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 288(4):R819–827, 2005.

TIBIRIÇA E. **Fisiopatologia em Medicina Cardiovascular.** Ed. Revinter. 2001.

TOMITA, S.; LI, R. K.; WEISEL, R. D.; MICKLE, D. A.; KIM, E. J.; SAKAI, T.; JIA, Z. Q. **Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function.** *Circulation*, 100(19 Suppl):II247–256, 1999.

TOMITA, S.; MICKLE, D. A. G.; WEISEL, R. D.; JIA, Z.-Q.; TUMIATI, L. C.; ALLIDINA, Y.; LIU, P.; LI, R.-K. **Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation.** *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 123(6):1132–1140, 2002.

TONG, M.; YANG, X.; GENG, B.; HAN, L.; ZHOU, Y.; ZHAO, X.; LI, H. **Overexpression of connexin 45 in rat mesenchymal stem cells improves the function as cardiac biological pacemakers.** Chinese Medical Journal, 123(12):1571–1576, 2010.

TYGESEN, H.; RUNDQVIST, B.; WAAGSTEIN, F.; WENNERBLOM, B. **Heart rate variability measurement correlates with cardiac norepinephrine spillover in congestive heart failure.** The American Journal of Cardiology, 87(11):1308–1311, 2001.

VAN DEN BORNE, S. W. M.; DIEZ, J.; BLANKESTEIJN, W. M.; VERJANS, J.; HOFSTRA, L.; NARULA, J. **Myocardial remodeling after infarction: the role of myofibroblasts.** Nature Reviews. Cardiology, 7(1):30–37, 2010.

VAN ROYEN, N.; JAFFE, C. C.; KRUMHOLZ, H. M.; JOHNSON, K. M.; LYNCH, P. J.; NATALE, D.; ATKINSON, P.; DEMAN, P.; WACKERS, F. J. **Comparison and reproducibility of visual echocardiographic and quantitative radionuclide left ventricular ejection fractions.** The American Journal of Cardiology, 77(10):843–850, 1996.

VANDERLEI, L. C. M.; PASTRE, C. M.; HOSHI, R. A.; CARVALHO, T. D. DE; GODOY, M. F. DE. **Basic notions of heart rate variability and its clinical applicability.** Revista Brasileira De Cirurgia Cardiovascular: Órgão Oficial Da Sociedade Brasileira De Cirurgia Cardiovascular, 24(2):205–217, 2009.

VAQUERO, J.; ZURITA, M. **Functional recovery after severe CNS trauma: current perspectives for cell therapy with bone marrow stromal cells.** Progress in Neurobiology, 93(3):341–349, 2011.

VATNER, S. F.; HIGGINS, C. B.; BRAUNWALD, E. **Sympathetic and parasympathetic components of reflex tachycardia induced by hypotension in conscious dogs with and without heart failure.** Cardiovascular Research, 8(2):153–161, 1974.

VERKERK, A. O.; WILDERS, R.; CORONEL, R.; RAVESLOOT, J. H.; VERHEIJCK, E. E. **Ionic remodeling of sinoatrial node cells by heart failure.** Circulation, 108(6):760–766, 2003.

VOSS, A.; KURTHS, J.; KLEINER, H. J.; WITT, A.; WESSEL, N.; SAPARIN, P.; OSTERZIEL, K. P.; SCHURATH, R.; DIETZ, R. **The application of methods of non-linear dynamics for the improved and predictive recognition of patients threatened by sudden death.** Cardiovascular Research, 31(3):419–433, 1996.

VOSS, A.; SCHULZ, S.; SCHROEDER, R.; BAUMERT, M.; CAMINAL, P. **Methods derived from nonlinear dynamics for analysing heart rate variability.** Philosophical Transactions. Series A, Mathematical, Physical, and Engineering Sciences, 367(1887):277–296, 2009.

VRTOVEC, B.; POGLAJEN, G.; HADDAD, F. **Stem cell therapy in patients with heart failure.** Methodist DeBakey Cardiovascular Journal, 9(1):6–10, 2013.

VULLIET, P. R.; GREELEY, M.; HALLORAN, S. M.; MACDONALD, K. A.; KITTLESON, M. D. **Intra-coronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs**. *Lancet* (London, England), 363(9411):783–784, 2004.

WEBER, K. T. **From inflammation to fibrosis: a stiff stretch of highway**. *Hypertension*, 43(4):716–719, 2004.

WEN, Z.; ZHENG, S.; ZHOU, C.; WANG, J.; WANG, T. **Repair mechanisms of bone marrow mesenchymal stem cells in myocardial infarction**. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15(5):1032–1043, 2011.

WEXLER, S. A.; DONALDSON, C.; DENNING-KENDALL, P.; RICE, C.; BRADLEY, B.; HOWS, J. M. **Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal “stem” cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not**. *British Journal of Haematology*, 121(2):368–374, 2003.

WOODIWISS, A. J.; TSOTETSI, O. J.; SPROTT, S.; LANCASTER, E. J.; MELA, T.; CHUNG, E. S.; MEYER, T. E.; NORTON, G. R. **Reduction in myocardial collagen cross-linking parallels left ventricular dilatation in rat models of systolic chamber dysfunction**. *Circulation*, 103(1):155–160, 2001.

YANG, J.; SONG, T.; WU, P.; CHEN, Y.; FAN, X.; CHEN, H.; ZHANG, J.; HUANG, C. **Differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissue and bone marrow to sinus node-like cells**. *Molecular Medicine Reports*, 5(1):108–113, 2012.

YI, G.; GUO, X. H.; REARDON, M.; GALLAGHER, M. M.; HNATKOVA, K.; CAMM, A. J.; MALIK, M. **Circadian variation of the QT interval in patients with sudden cardiac death after myocardial infarction**. *The American Journal of Cardiology*, 81(8):950–956, 1998.

YOSHIKAWA, T.; BABA, A.; AKAISHI, M.; MITAMURA, H.; OGAWA, S.; SUZUKI, M.; NEGISHI, K.; TAKAHASHI, T.; MURAYAMA, A. **Neurohumoral activations in congestive heart failure: correlations with cardiac function, heart rate variability, and baroreceptor sensitivity**. *American Heart Journal*, 137(4 Pt 1):666–671, 1999.

ZHANG, F.; SONG, G.; LI, X.; GU, W.; SHEN, Y.; CHEN, M.; YANG, B.; QIAN, L.; CAO, K. **Transplantation of iPSc ameliorates neural remodeling and reduces ventricular arrhythmias in a post-infarcted swine model**. *Journal of Cellular Biochemistry*, 115(3):531–539, 2014.

ZICHA, S.; FERNÁNDEZ-VELASCO, M.; LONARDO, G.; L'HEUREUX, N.; NATTEL, S. **Sinus node dysfunction and hyperpolarization-activated (HCN) channel subunit remodeling in a canine heart failure model**. *Cardiovascular Research*, 66(3):472–481, 2005.

ZUBAIR, A. C.; SILBERSTEIN, L.; RITZ, J. **Adult hematopoietic stem cell plasticity.** *Transfusion*, 42(8):1096–1101, 2002.

ZUCKER, I. H.; WANG, W. **Reflex control of renal sympathetic nervous activity in heart failure.** *Herz*, 16(2):82–91, 1991.

ZUCKER, I. H.; WANG, W.; BRÄNDLE, M.; SCHULTZ, H. D.; PATEL, K. P. **Neural regulation of sympathetic nerve activity in heart failure.** *Progress in Cardiovascular Diseases*, 37(6):397–414, 1995.

8. APÊNDICE

TABELA 1. Defeito de perfusão (%) determinado pelo SPECT (Tomografia computadorizada por emissão de fóton único) no período de pré-tratamento dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC).

	SHAM	IC + Salina	IC + MSC
1	0	58	58
2	0	44	54
3	3	56	50
4	0	40	47
5	0	46	47
6	0	50	45
7	0	55	60
8	0	56	48
9	0	63	50
10	0	44	52
11	0	54	62
12	0	48	57
13	0	49	42
14	0	45	47
15		46	
16		60	
Média	0	51	51
EPM	0	2	2

TABELA 2. Fração de Ejeção (%) no período de pré-tratamento dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC).

	SHAM	IC + Salina	IC + MSC
1	52	10	18
2	36	18	19
3	32	8	12
4	45	18	11
5	44	27	13
6	53	24	24
7	32	21	27
8	66	28	
9	76	38	
Média	48	21	18
EPM	5	3	2

TABELA 3. Fração de Ejeção (%) após um mês do tratamento dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC).

	SHAM	IC + Salina	IC + MSC
1	49	13	16
2	57	14	22
3	59	12	13
4	49	23	13
5	47	26	13
6	55	19	38
7	44	16	25
8	56	21	
9	69	34	
Média	54	20	20
EPM	3	2	4

TABELA 4. Fração de Ejeção (%) antes (pré-tratamento) e após um mês (pós-tratamento) do tratamento dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC).

	SHAM		IC + Salina		IC + MSC	
	Pré- tratamento	Pós- tratamento	Pré- tratamento	Pós- tratamento	Pré- tratamento	Pós- tratamento
1	52	49	10	13	18	16
2	36	57	18	14	19	22
3	32	59	8	12	12	13
4	45	49	18	23	11	13
5	44	47	27	26	13	13
6	53	55	24	19	24	38
7	32	44	21	16	27	25
8	66	56	28	21		
9	76	69	38	34		
Média	48	54	21	20	18	20
EPM	5	3	3	2	2	4

TABELA 5. Parâmetros eletrocardiográficos: intervalo PR (iPR), duração da onda P (dP), intervalo QRS (iQRS), intervalo QT (iQT) e intervalo QT corrigido (iQTc) após um mês do tratamento do grupo controle (SHAM) com salina.

	iPR (ms)	dP (ms)	iQRS (ms)	iQT (ms)	iQTc (ms)
1	60,3	32,2	21,6	84,9	205,2
2	52,4	28,9	20,9	81,0	210,8
3	55,6	27,6	24,5	73,1	198,5
4	61,8	35,6	27,7	89,6	192,7
5	59,8	30,4	26,9	84,3	194,3
6	55,2	26,8	26,8	91,0	189,2
7	62,2	27,9	25,8	89,4	188,5
Média	58,2	29,9	24,9	84,8	197,1
EPM	1,4	1,2	1,0	2,4	3,2

TABELA 6. Parâmetros eletrocardiográficos: intervalo PR (iPR), duração da onda P (dP), intervalo QRS (iQRS), intervalo QT (iQT) e intervalo QT corrigido (iQTc) após um mês do tratamento do grupo com insuficiência cardíaca (IC) tratado com salina.

	iPR (ms)	dP (ms)	iQRS (ms)	iQT (ms)	iQTc (ms)
1	62,7	35,7	36,0	96,8	241,7
2	64,9	24,5	22,5	93,4	203,0
3	54,9	18,3	28,9	100,0	226,3
4	60,1	34,8	30,0	94,3	231,9
5	69,7	34,8	29,4	100	237,3
6	60,0	31,6	31,5	90,9	220,3
7	56,3	28,2	34,9	97,4	232,3
Média	61,2	29,7	30,5	96,2	227,5
EPM	1,9	2,5	1,7	1,3	4,9

TABELA 7. Parâmetros eletrocardiográficos: intervalo PR (iPR), duração da onda P (dP), intervalo QRS (iQRS), intervalo QT (iQT) e intervalo QT corrigido (iQTc) após um mês do tratamento do grupo com insuficiência cardíaca (IC) tratado com células-tronco mesenquimais (MSC).

	iPR (ms)	dP (ms)	iQRS (ms)	iQT (ms)	iQTc (ms)
1	67,2	24,7	26,6	99,6	236,0
2	51,4	27,1	31,7	94,5	239,7
3	61,4	15,2	28,8	95,7	210,7
4	49,4	28,7	35,9	99,2	222,3
5	64,3	33,1	19,8	96,3	207,5
6	58,5	31,8	32,9	94,8	226,3
7	65,5	34,4	30,3	98,2	221
8	71,8	39,1	31	115,7	247,4
Média	61,2	29,3	29,6	99,3	226,4
EPM	2,7	2,6	1,7	2,5	4,9

TABELA 8. Intervalo RR do eletrocardiograma (ms), SDNN (desvio padrão de valores sucessivos do intervalo RR, em ms), RMSSD (raiz quadrada da média da soma dos quadrados das diferenças entre sucessivos valores de intervalo RR, em ms) da variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC).

	SHAM			IC + Salina			IC + MSC		
	iRR	SDNN	RMSSD	iRR	SDNN	RMSSD	iRR	SDNN	RMSSD
1	205	10,87	4,10	168	4,27	3,27	189	6,11	3,64
2	191	6,47	5,19	183	7,32	5,01	209	11,30	9,70
3	212	10,90	6,04	200	5,49	2,09	213	13,94	7,55
4	190	7,74	6,43	182	2,98	2,59	200	6,20	5,33
5	170	5,35	4,38	175	4,05	2,36	198	3,97	3,18
6	196	8,11	4,65	200	4,27	2,33	182	4,01	3,54
7	188	8,33	7,08	201	4,77	2,58	190	4,85	2,61
8	185	5,27	3,87	203	5,43	3,52	180	4,20	1,68
9	174	5,87	3,66	177	4,48	5,53			
10				180	5,67	4,77			
Média	190	7,65	5,04	187	4,87	3,40	195	6,82	4,65
EPM	4	0,72	0,41	4	0,37	0,40	4	1,33	0,96

TABELA 9. Potências das bandas de baixa (LF, 0,2 - 0,75 Hz) e alta frequência (HF, 0,75 – 3 Hz) em unidades absoluta (abs - ms^2) e normalizada (nu - %), e a razão LF/HF da variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência do intervalo RR do eletrocardiograma do grupo controle (SHAM).

	LF abs	HF abs	LF nu	LH/HF
1	1,96	3,52	32,59	0,63
2	0,88	5,79	11,49	0,13
3	3,80	7,55	31,43	0,52
4	1,35	8,70	14,04	0,17
5	0,70	4,72	13,00	0,16
6	1,35	6,94	16,45	0,29
7	2,51	13,26	17,44	0,25
8	0,60	3,84	11,52	0,15
9	1,58	4,46	17,48	0,28
Média	1,64	6,53	18,38	0,29
EPM	0,34	1,03	2,69	0,06

TABELA 10. Potências das bandas de baixa (LF, 0,2 - 0,75 Hz) e alta frequência (HF, 0,75 – 3 Hz) em unidades absoluta (abs - ms²) e normalizada (nu - %), e a razão LF/HF da variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência do intervalo RR do eletrocardiograma do grupo com insuficiência cardíaca (IC) tratado com salina.

	LF abs	HF abs	LF nu	LH/HF
1	0,45	3,00	14,00	0,17
2	0,90	6,28	12,78	0,17
3	0,39	0,79	26,58	0,41
4	0,13	1,24	10,03	0,12
5	0,29	1,24	16,99	0,23
6	0,30	1,27	17,58	0,26
7	0,21	1,16	14,45	0,18
8	0,66	2,49	18,61	0,25
9	0,32	1,16	19,91	0,32
10	0,48	4,14	10,87	0,13
Média	0,41	2,28	16,18	0,23
EPM	0,07	0,56	1,55	0,03

TABELA 11. Potências das bandas de baixa (LF, 0,2 - 0,75 Hz) e alta frequência (HF, 0,75 – 3 Hz) em unidades absoluta (abs - ms²) e normalizada (nu - %), e a razão LF/HF da variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência do intervalo RR do eletrocardiograma do grupo com insuficiência cardíaca (IC) tratado células-tronco mesenquimais (MSC).

	LF abs	HF abs	LF nu	LH/HF
1	0,87	2,88	21,38	0,35
2	1,62	8,38	18,03	0,26
3	4,86	10,07	32,00	0,58
4	1,10	4,31	19,06	0,27
5	0,34	2,81	12,40	0,15
6	0,49	3,36	22,04	0,31
Média	1,55	5,30	20,82	0,32
EPM	0,69	1,28	2,64	0,06

TABELA 12. Índice α da Análise depurada de tendências (DFA) e Entropia dos métodos não lineares da variabilidade da frequência cardíaca dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC).

	SHAM		IC + Salina		IC + MSC	
	α	Entropia	α	Entropia	α	Entropia
1	1,09	1,02	1,22	0,74	1,13	1,04
2	1,11	1,44	1,12	1,06	1,06	0,80
3	1,13	1,20	1,17	0,62	1,23	0,54
4	1,15	1,38	1,22	0,91	1,06	1,13
5	1,18	1,34	1,19	1,06	1,13	1,42
6	1,12	1,24	1,11	1,10	1,13	1,51
7	1,07	1,63	1,24	1,10		
8	1,11	1,35	1,17	1,05		
9	1,10	1,30	1,12	1,11		
10			1,23	1,09		
Média	1,12	1,32	1,18	0,98	1,12	1,08
EPM	0,01	0,06	0,02	0,05	0,03	0,15

TABELA 13. Pressão arterial média (PAM, em mmHg), média da pressão arterial sistólica (PAS, em mmHg), SDNN (desvio padrão de valores sucessivos do intervalo RR, em mmHg), e a potência da banda de baixa frequência (LF, 0,2 – 0,75 Hz) em unidade absoluta (abs - mmHg²) da PAS do grupo controle (SHAM).

	PAM	PAS	SDNN	LF (abs)
1	110	126,65	4,25	5,21
2	94	103,52	4,66	1,95
3	91	96,41	3,76	1,62
4	97	113,14	4,41	4,33
5	101	120,42	4,37	2,34
6	130	141,10	5,23	7,94
7	105	117,88	4,43	2,64
8	112	129,62	4,13	3,83
9	125	141,13	5,72	8,91
Média	107	121	4,55	4,31
EPM	4	5	0,20	0,87

TABELA 14. Pressão arterial média (PAM, em mmHg), média da pressão arterial sistólica (PAS, em mmHg), SDNN (desvio padrão de valores sucessivos do intervalo RR, em mmHg), e a potência da banda de baixa frequência (LF, 0,2 – 0,75 Hz) em unidade absoluta (abs - mmHg²) da PAS do grupo com insuficiência cardíaca (IC) tratado com salina.

	PAM	PAS	SDNN	LF (abs)
1	92	103,68	3,28	0,80
2	97	107,28	3,24	0,82
3	96	98,48	2,87	0,96
4	89	91,87	3,40	0,46
5	84	99,04	2,95	0,32
6	88	93,72	2,71	2,10
7	88	98,74	3,90	2,21
8	83	117,28	4,27	0,32
9	85	94,00	2,69	0,68
10	72	98,33	2,94	1,07
11	99	86,53	3,67	1,63
12	88	107,96	3,68	1,00
Média	88	100	3,30	1,03
EPM	2	2	0,14	0,18

TABELA 15. Pressão arterial média (PAM, em mmHg), média da pressão arterial sistólica (PAS, em mmHg), SDNN (desvio padrão de valores sucessivos do intervalo RR, em mmHg), e a potência da banda de baixa frequência (LF, 0,2 – 0,75 Hz) em unidade absoluta (abs - mmHg²) da PAS do grupo com insuficiência cardíaca (IC) tratado com células-tronco mesenquimais (MSC).

	PAM	PAS	SDNN	LF (abs)
1	91	102,80	2,85	0,68
2	95	101,93	4,29	2,61
3	100	110,64	3,64	2,43
4	96	106,42	4,25	1,17
5	100	109,13	3,11	1,77
6	85	98,76	2,70	0,82
7	91	109,02	3,88	1,67
8	91	93,53	3,58	1,08
Média	94	104	3,54	1,53
EPM	2	2	0,21	0,25

TABELA 16. Frequência cardíaca (bpm) dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC).

	SHAM	IC + Salina	IC + MSC
1	291	329	317
2	314	302	287
3	284	326	264
4	312	338	293
5	357	298	303
6	305	290	318
7	320	288	293
8	312	318	318
9	330	310	291
10	315	269	288
11	308	320	325
12	330	320	
13	330	356	
14	275		
Média	313	313	300
EPM	6	6	6

TABELA 17. Frequência intrínseca de marca-passo (bpm) dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC).

	SHAM	IC + Salina	IC + MSC
1	379	373	357
2	354	344	372
3	403	325	393
4	336	347	348
5	391	357	356
6	333	303	372
7	390	334	347
8	362	347	406
9	389	323	389
10	377	373	349
11	350	338	397
12	380	348	
13	328	354	
14	334		
Média	365	344	371
EPM	7	5	7

TABELA 18. Resposta taquicárdica (efeito vagal – bpm) à administração de metil-atropina dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC).

	SHAM	IC + Salina	IC + MSC
1	136	82	53
2	77	78	115
3	123	19	180
4	57	28	89
5	61	67	94
6	56	25	69
7	90	56	86
8	94	35	72
9	101	34	111
10	86	93	96
11	72	89	99
12	67	53	
13	51	36	
14	98		
Média	84	53	97
EPM	7	7	10

TABELA 19. Resposta bradicárdica (efeito simpático – bpm) à administração de propranolol dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC).

	SHAM	IC + Salina	IC + MSC
1	-4	-9	-3
2	-24	-23	-5
3	-1	-14	-8
4	-5	-6	-7
5	-4	-3	-17
6	-4	-4	-8
7	-8	-38	-34
8	-18	-19	-8
9		-3	
10		-28	
11		-12	
Média	-9	-14	-11
EPM	3	3	4

TABELA 20. Sensibilidade barorreflexa, resposta bradicárdica à administração de fenilefrina (bpm/mmHg), dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC).

	SHAM	IC + Salina	IC + MSC
1	1,51	1,19	2,08
2	1,46	1,04	1,97
3	2,32	1,18	1,78
4	2,37	0,79	1,14
5	1,37	1,33	
6		1,36	
7		-0,05	
Média	1,81	0,98	1,74
EPM	0,22	0,19	0,21

TABELA 21. Sensibilidade barorreflexa, resposta taquicárdica à administração de nitroprussiato de sódio (bpm/mmHg), dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC).

	SHAM	IC + Salina	IC + MSC
1	3,54	1,97	3,66
2	1,75	0,58	4,10
3	2,55	1,96	2,53
4	1,29	2,63	1,79
5	2,00	1,4	
6	2,81		
Média	2,32	1,71	3,02
EPM	0,33	0,34	0,53

TABELA 22. Extensão do infartado dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC).

	IC + Salina	IC + MSC
1	46	47
2	49	28
3	56	46
4	55	34
5	42	37
6	52	34
7	61	45
8	43	51
9	58	54
10	58	38
11	54	46
12	46	47
13	42	26
14	40	43
15	40	
16	58	
Média	50	41
EPM	2	2

TABELA 23. Quantidade relativa de colágeno (%) do miocárdio sobrevivente, na área da parede livre do ventrículo esquerdo, dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC).

	SHAM	IC + Salina	IC + MSC
1	5,19	21,74	10,44
2	10,27	12,68	10,41
3	11,51	12,71	14,63
4	13,29	15,5	9,53
5	10,13	16,50	9,54
6	9,97	10,37	10,8
7	12,57	14,45	12,15
8	9,32	10	
9	10,14	17,62	
Média	10,27	14,62	11,07
EPM	0,77	1,24	0,68

TABELA 24. Diâmetro dos cardiomiócitos no Septo (μm) dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC).

	SHAM	IC + Salina	IC + MSC
1	9,89	12,65	12,71
2	10,61	13,39	13,74
3	9,97	13,53	13,93
4	9,68	13,32	13,33
5	11,19	14,64	13,84
6	10,82	14,90	14,58
7	9,53	12,55	13,78
8		12,76	12,55
9		12,89	12,88
10		12,91	13,64
11		13,42	
Média	10,24	13,36	13,50
EPM	0,24	0,23	0,20

TABELA 25. Mínima espessura do ventrículo esquerdo na área de infarto (mm) dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC).

	SHAM	IC + Salina	IC + MSC
1	2,47	0,49	1,13
2	2,18	0,75	0,64
3	1,98	0,56	0,44
4	2,89	0,95	0,66
5	2,25	1,07	0,95
6	2,23	0,83	1,06
7	2,29	0,94	0,85
8	1,80	0,89	0,54
9	1,67	0,45	1,07
10	2,10	1,03	0,52
11	2,09	0,50	0,38
12	2,56	0,50	0,44
13	3,02	0,57	0,70
14	2,49	0,66	0,62
15		0,59	
Média	2,29	0,72	0,71
EPM	0,10	0,06	0,07

TABELA 26. Peso inicial (g) dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC).

	SHAM	IC + Salina	IC + MSC
1	285	321	266
2	289	227	262
3	278	270	298
4	232	260	345
5	346	293	319
6	357	318	298
7	292	268	296
8	310	274	312
9	257	292	
10	310	302	
11		272	
12		302	
Média	296	283	300
EPM	12	8	10

TABELA 27. Peso final (g) dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC).

	SHAM	IC + Salina	IC + MSC
1	580	518	458
2	523	504	493
3	435	446	437
4	344	474	505
5	457	469	422
6	420	466	395
7	468	545	458
8	495	412	444
9	412	495	
10	472	445	
11		430	
12		429	
Média	461	469	452
EPM	20	12	13

TABELA 28. Variação do peso inicial pelo peso final (g) dos grupos controle (SHAM) e com insuficiência cardíaca (IC), tratados com salina ou células-tronco mesenquimais (MSC).

	SHAM	IC + Salina	IC + MSC
1	295	197	192
2	234	277	231
3	157	176	139
4	112	214	160
5	111	176	103
6	63	148	97
7	176	277	162
8	185	138	132
9	155	203	
10	162	143	
11		158	
12		127	
Média	165	186	152
EPM	21	15	16

TABELA 29. Peso dos corações (mg), peso final (g) e o índice de peso cardíaco (mg/g) do grupo controle (SHAM).

	Peso cardíaco (mg)	Peso corporal (g)	Índice de peso cardíaco (mg/g)
1	1652	580	2,85
2	1620	523	3,10
3	1677	435	3,83
4	1326	344	3,83
5	1300	457	2,84
6	1330	420	3,17
7	1462	468	3,12
8	1658	495	3,33
9	1311	412	3,18
10	1567	472	3,30
Média	1496	461	3,25
EPM	50	20	0,11

TABELA 30. Peso dos corações (mg), peso final (g) e o índice de peso cardíaco (mg/g) do grupo com insuficiência cardíaca (IC) tratado com salina.

	Peso cardíaco (mg)	Peso corporal (g)	Índice de peso cardíaco (mg/g)
1	1902	518	3,67
2	3152	504	6,25
3	2080	377	5,52
4	1750	511	3,42
5	2110	428	4,93
6	2840	450	6,31
7	2220	446	4,98
8	2379	474	5,00
9	2085	469	4,42
10	1700	466	3,65
11	1978	545	3,61
12	1684	412	4,09
13	1618	495	3,25
14	1577	445	3,52
15	1198	430	2,76
16	2300	429	5,36
Média	2032	462	4,42
EPM	122	11	0,27

TABELA 31. Peso dos corações (mg), peso final (g) e o índice de peso cardíaco (mg/g) do grupo com insuficiência cardíaca (IC) tratado com células-tronco mesenquimais (MSC).

	Peso cardíaco (mg)	Peso corporal (g)	Índice de peso cardíaco (mg/g)
1	1750	455	3,85
2	2520	454	5,55
3	2520	458	5,50
4	1905	493	3,84
5	2700	437	6,18
6	1610	505	3,19
7	1686	422	3,97
8	1640	395	4,15
9	1618	458	3,51
10	1871	444	4,21
Média	1989	452	4,40
EPM	146	10	0,31

9. ARTIGO

Artigo Publicado na revista **Stem Cell and Development**.

Stem Cells Dev. 2015 Sep 15;24(18):2181-92. doi: 10.1089/scd.2014.0573. Epub 2015 Jun 24.

Mesenchymal Stem Cells Improve Heart Rate Variability And Baroreflex Sensitivity In Rats With Chronic Heart Failure.

Morais S del B¹, Silva LE¹, Lataro RM¹, Silva CA¹, Oliveira LF², Carvalho EE², Simões MV², da Silva Meirelles L³, Fazan R Jr¹, Salgado HC¹.

Author information

¹ Department of Physiology, Medical School of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo , Ribeirão Preto, Brazil .

² Department of Internal Medicine, Medical School of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo , Ribeirão Preto, Brazil .

³ Graduate Program in Cellular and Molecular Biology Applied to Health, Lutheran University of Brazil , Ribeirão Preto, Brazil .

Corresponding Author

Helio Cesar Salgado, M.D., Ph.D.
Department of Physiology,
Medical School of Ribeirao Preto/USP
Av. Bandeirantes, 3900
14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil.
Email: hcsalgado@fmrp.usp.br
Phone: +55 16 3602 3201
fax +55 16 3633-0017

Brief Running Title: MSC, myocardial infarction and autonomic function

This submitted material was presented in the following conferences:

11th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR), June 12-15, 2013, Boston Convention and Exhibition Center, Boston, Massachusetts, USA.

Experimental Biology (EB) 2014, April 26-30, San Diego Convention Center, San Diego, California, USA.

List of abbreviation:

AP - arterial pressure

CHF - chronic heart failure

DFA - detrended fluctuation analysis

ECG - electrocardiogram

FFT - fast Fourier transform

FITC - fluorescein isothiocyanate

HF – high frequency

HR - heart rate

HRV - heart rate variability

IBMX – isobutyl methylxantine

LF – low frequency

LVEF - left ventricular ejection fraction

MAP - mean arterial pressure

MI - myocardial infarction

MSC - mesenchymal stem cells

PE - phycoerythrin

RMSSD - square root of the mean of the sum of the squares of differences between adjacent NN intervals

RRi - RR interval

SAP - systolic arterial pressure

SDNN - standard deviation of the normal-to-normal RR interval

SPECT - single-photon emission computed tomography

VLF - very low frequency

Abstract

Heart failure induced by myocardial infarct (MI) attenuates the heart rate variability and baroreflex sensitivity, which are important risk factors for life threatening cardiovascular events. Therapies with mesenchymal stem cells (MSCs) have shown promising results after MI. However, the effects of MSCs on hemodynamic (heart rate and arterial pressure) variability and baroreflex sensitivity in chronic heart failure (CHF) following MI have not been evaluated thus far. Male Wistar rats received MSCs or saline solution intravenously one week after ligation of the left coronary artery. Control (non-infarcted) rats were also evaluated. MI size was assessed using single-photon emission computed tomography (SPECT). The left ventricular ejection fraction was evaluated using radionuclide ventriculography. Four weeks after MSC injection, the animals were anesthetized and instrumented for chronic ECG recording and catheters were implanted in the femoral artery to record arterial pressure. Arterial pressure and heart rate variabilities were determined in time and frequency domain (spectral analysis) while heart rate variability (HRV) was also examined using nonlinear methods: DFA (detrended fluctuation analysis) and sample entropy. The initial MI size was the same among all infarcted rats but was reduced by MSCs. CHF rats exhibited increased myocardial interstitial collagen and sample entropy combined with the attenuation of the following cardiocirculatory parameters: DFA indices, LVEF, baroreflex sensitivity and HRV. Nevertheless, MSCs hampered all these alterations, except the LVEF reduction. Therefore, four weeks after MSC therapy was applied to CHF rats, MI size and myocardial interstitial fibrosis decreased, while baroreflex sensitivity and heart rate variability improved.

KEYWORDS: Mesenchymal stem cells, chronic heart failure, baroreflex sensitivity, heart rate variability, myocardial infarction.

Introduction

Chronic heart failure (CHF) is characterized by ventricular dysfunction with decreased myocardial contractility and cardiac output, increased end-diastolic volume of the ventricles and reduced functional cardiac reserve¹. Thus, cardiocirculatory adjustments are required to maintain adequate tissue perfusion; one adjustment involves baroreflex function, which plays an important role in modulating heart rate (HR), cardiac output, myocardial contractility and regional distribution of blood flow².

However, patients with CHF induced by myocardial infarction (MI) have impaired baroreflex function^{3,4}. Moreover, one of the major changes that occurs beginning in the early stages of heart failure is an autonomic imbalance that is characterized by sympathetic hyperactivity and reduced vagal tone⁵⁻⁷. These outcomes emphasize the importance of the baroreflex control on cardiovascular autonomic modulation in CHF.

Adult mesenchymal stem cells (MSCs) are stem cells with high potential for therapeutic applications⁸. MSCs therapy is an ongoing approach to repair the heart in preclinical and clinical studies after cardiac events and has brought positive results^{8,9,10}. Despite the evidences that MSCs reduce left ventricular dilatation¹¹, increase vascular density^{12,13}, decrease the extent of the infarcted area^{9,11}, reduce the apoptosis and necrosis of cardiomyocytes^{11,14}, more consistent results from stem cell therapy in heart diseases may, indeed, be achieved through rigorous clinical trials, amount of cells providing maximal efficiency, optimal time frame for transplant, best procedures to manipulate the cells and via of administration^{8,9}.

Pak et al¹⁵ demonstrated an increased magnitude of cardiac nerve sprouting in both atria and ventricles and an increased magnitude of atrial sympathetic hyperinnervation two months after the transplantation of MSCs into swine post-MI. Another study showed that human MSC transplantation increased cardiac sympathetic innervation after transplanted in the canine heart¹⁶. Despite the benefits of MSC transplantation after MI, the evidence of increased sympathetic innervation indicates the need for more accurate studies, particularly those related to the sympathovagal balance in the heart. Accordingly, Wang et al¹⁷ have demonstrated that MSC transplantation promotes cardiac nerve sprouting and modifies the autonomic neural balance in diabetic rats.

Studies of cardiac autonomic modulation involving MSC transplantation in models of CHF are beneficial because several clinical studies are currently in progress. Nevertheless, no

study has evaluated the cardiac sympathovagal modulation, the heart rate variability (HRV) and baroreflex sensitivity in either patients or experimental models of CHF receiving MSCs.

Therefore, the aim of the present study was to evaluate the effect of MSCs on hemodynamic (heart rate and arterial pressure) variability and baroreflex sensitivity in conscious CHF rats following MI.

Materials and Methods

Experiments were performed on male Wistar rats (240-320 g); the animals were housed individually with free access to food and water and maintained on a 12:12 h light-dark cycle. Young male rats (150-200 g) were used as MSCs donors. The experimental procedures were conducted in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [Dept. of Health, Education and Welfare, Publication No. (NIH) 85-23, Revised 1985; Office of Science and Health Reports, DRR/NIH, Bethesda, MD]. The experimental protocols were approved by the Ethics Committee on Animal Research of the Medical School of Ribeirao Preto (Protocol # 034/2012).

Isolation and Characterization of Mesenchymal Stem Cells

Bone marrow was harvested from the femora, tibiae and humeri of donor rats. The cells were fractionated by centrifugation on a Ficoll-Paque gradient (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA). After centrifugation, mononuclear cells were collected and dispensed into culture-treated polystyrene flasks (Sarstedt Inc, Princeton, NJ, USA) at a density of 4×10^5 cells/cm² in complete medium [low-glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Life Technologies) and 50 IU/mL penicillin–streptomycin (Life Technologies)]. Primary cultures were placed in an incubator with a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C. Nonadherent cells were removed by changing the medium after 3 days of culture, and medium changes were performed twice a week. When the cultures attained 80-90% confluence, the cells were detached with 0.25% trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (trypsin-EDTA; Life Technologies) and seeded in new culture flasks in complete culture medium at a density of 8×10^3 cells/cm². After three passages, adherent cells were characterized as MSCs according to criteria established by the International Society for Cellular Therapy¹⁸, as follows.

Immunophenotyping - Third-passage MSCs were subjected to cell surface antigen phenotyping using flow cytometry. Cells were incubated with phycoerythrin (PE)- or fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated mouse anti-rat monoclonal antibodies (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) raised against the molecules CD11b (PE), CD31 (PE), CD44 (FITC), CD45 (PE), CD29 (FITC) and CD90 (FITC). Cells stained with PE- or FITC-conjugated mouse isotype-matched antibodies served as control. Fluorescence was read using a FACSCalibur 4C flow cytometer (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA). A total of 20,000 events, as defined by size (FSC) and granularity (SSC) parameters, were acquired per sample. Data analysis was performed using CellQuest software (BD).

Osteogenic differentiation – Third-passage MSCs were plated in six-well plates at a density of 3×10^3 cells per well. After three days, complete medium was replaced by osteogenic induction medium [complete medium augmented with 100 nM dexamethasone (Sigma), 50 μ M ascorbate-2-phosphate (Sigma) and 10 mM beta-glycerol phosphate (Sigma)]. The medium was changed every 3-4 days. After 20 days of culture in osteogenic medium, the cultures were fixed with 4% paraformaldehyde and stained with Alizarin Red S (Sigma) at a pH of 4.1 to reveal calcium-rich mineralized extracellular matrix. MSCs cultured in complete medium with no osteogenic supplements served as controls.

Adipogenic differentiation - MSCs at passage 3 were plated in six-well plates at 2×10^4 cells per well in complete culture medium. Three days after plating, the medium was replaced by adipogenic induction medium [complete medium augmented with 1 μ M dexamethasone (Sigma), 100 μ M indomethacin (Sigma), 0.5 mM IBMX (Sigma) and 10 μ g/mL insulin (Sigma)], which was changed every 3-4 days. Cells bearing cytoplasmic lipid droplets could be detected by observation under a phase contrast microscope after one week in culture. After three weeks under adipogenic conditions, the cultures were fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma), and lipid vacuoles were stained with Oil Red O (Sigma). Harris hematoxylin (Sigma) was used to stain the cell nuclei. MSCs cultured in complete medium with no adipogenic supplements served as controls.

Myocardial Infarction Model

CHF was induced by MI according to the technique described by Pfeffer et al¹⁹. Briefly, rats were anesthetized with ketamine (50 mg/kg of body weight (b.w.), i.p.; União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, SP, Brazil) and xylazine (10 mg/kg b.w., i.p.; União Química Farmacêutica Nacional S/A), endotracheally intubated and mechanically ventilated with room air. A left thoracotomy was performed, the pericardium was opened, and

the heart was exteriorized. The left anterior descending coronary artery was ligated between the pulmonary artery and the left atrium with polyester sutures (4-0; Ethicon, São José dos Campos, SP, Brazil). Control rats underwent a similar surgical procedure without coronary ligation. After the ligation, the animals were implanted with polyethylene catheters (PE-10/PE-50, Intramedic, BD) into the left jugular vein for the administration of MSCs and drugs. Next, the animals received 0.7 mL/kg b.w. of 2% lidocaine hydrochloride i.v. (Hipolabor Farmacêutica Ltda, Sabará, MG, Brazil) for its antiarrhythmic effects and the same dose of polyvalent antibiotic (Pentabiotic Veterinary) for small animals (Fort Dodge Animal Health, Campinas, SP, Brazil), i.m, to prevent post-surgical infections.

Intravenous Administration of MSCs

Seven days after the MI, 2×10^6 third-passage bone marrow MSCs were administered through the jugular vein in the CHF + MSC group, dissolved in 250 μ L of saline solution; the same volume of saline was administered to the CHF group. The control rats received 250 μ L of the saline solution alone, at the same time of the other groups, and represented the CONTROL group.

Myocardial Perfusion Scintigraphy with ^{99m}Tc -sestamibi - SPECT

Two to three days after MI, the extent of the infarcted area was determined using SPECT according to Oliveira et al²⁰. Briefly, under inhaled isoflurane (Isothane; Baxter Health Care Corporation, Guayama, Puerto Rico: 5% for induction and 1.5-2% for maintenance), the animals received a dose of ^{99m}Tc -sestamibi (555 MBq; Piro-Tec; IPEN, SP, Brazil; Cardiolite^R, Lantheus Medical Imaging, Massachusetts, USA) into the penile vein; after 90 min, the animals were placed in a motorized cylindrical apparatus coupled to a “pinhole” collimator adapted to a clinical gamma-camera (DST, SMV America, Twinsburg, Ohio, USA). Forty projections, whose image elapsed time was 30 s for each projection, equally spaced within 360°, were obtained. The projections were recorded in 128x128 matrix, providing a 3.4x3.4 mm pixel size. A 6.3x magnification factor was adopted for all experiments, with a corresponding voxel size of 0.54 mm. After acquisition, the images were exported in DICOM format and processed. The myocardial perfusion analysis was based on the construction of polar maps for quantitative evaluation of the areas of severe defects (scores below 50% of the maximum pixel value). Subsequently, the perfusion polar map of the left ventricle (LV) was divided into 16 segments (6 basal, 6 mid-ventricular and 4 apical).

Only infarcted hearts showing perfusion defects larger than 40% of the LV circumference were taken into account in the study.

Radionuclide Ventriculography

After 72 hours of SPECT and four weeks after MSC therapy, all animals were anesthetized with isoflurane for a radionuclide ventriculography analysis of the ventricular function using a gamma-camera designed for clinical use (DST, SMV America) equipped with a pinhole collimator with a 1.5 mm aperture. The animals received 75 mg of stannous agent (PIRO-TEC, IPEN) into the penile vein. After 15 min, they also received an injection of 555 MBq of technetium-99m pertechnetate (IPEN) into the same vein. Then, the animals were taken to the gamma-camera and placed in supine position below the detector, and four electrodes were implanted subcutaneously in the limbs for ECG monitoring. The images were acquired as a matrix (word mode) of 64x64 pixels and were synchronized with ECG with an acceptance window of 20% around the mean value of the QRS duration, with 32 frames per cardiac cycle, and 200 kilocounts per frame. The symmetric energy window was centered on the photopeak at 20% of the Tc energy peak of 140 KeV. Commercially available software (planar gated blood pool, SMV America) was used for image processing. Parametric images of phase and amplitude, detected semi-automatically, were taken from the LV border and a time versus activity curve was obtained. From the curve, the left ventricular ejection fraction (LVEF) was calculated expressed as a percentage (%), defined as the difference between the diastolic and end-systolic counts corrected for background radiation and then divided by the end-diastolic count.

ECG Recordings and Heart Rate Variability

Four weeks after MSC administration, the animals were anesthetized with isoflurane and subjected to a 12-lead ECG recording (CL-6 615422-1, Gould Instruments Systems, Valley View, OH, USA). The conventional bipolar limb leads (D1, D2, D3), the unipolar limb leads (aVR, aVL and aVF) and the unipolar precordial (chest) leads (V1, V2, V3, V4, V5 and V6) were recorded continuously with the ECG waves sampled at 2 kHz. While still under anesthesia, the rats were implanted with subcutaneous electrodes for chronic ECG recording. To determine the HRV, 48h after the electrodes implantation, conscious animals were connected to an ECG amplifier (Model 8811A, Bioelectric Amplifier, Hewlett Packard, Waltham, MA, USA) attached to an analog/digital interface (DI-220 Dataq Instruments,

Akron, OH, USA), and basal ECG was recorded for 2 hours from freely moving rats. Next day, and ECG was recorded for another 2 hours.

Arterial Pressure Recordings and Baroreflex Sensitivity

After the second day of ECG recording, rats were anesthetized with isoflurane and a polyethylene catheter (Intramedic, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) was implanted into the femoral artery for arterial pressure (AP) recording. After 24 hours, the arterial catheter was attached to a pressure transducer (Statham P23XL model, Grass, MA, USA) connected to an amplifier (CL-6 615422-1, Gould Instruments Systems Inc.), and the AP was recorded (1 kHz) using an IBM/PC equipped with an analog/digital interface (DI-220, Dataq Instruments). After recording the basal AP for 1h, phenylephrine (2 mg/kg, Sigma) and sodium nitroprusside (16 mg/kg, Sigma) were administered intravenously to measure the baroreflex sensitivity.

Cardiac Weight

After the hemodynamic recordings, the rats were killed using an overdose of anesthetic, and the still-beating hearts were rapidly removed, rinsed in 0.9% NaCl solution, weighed and kept overnight in formaldehyde (10%) for histological analysis.

Histological Analysis

The hearts were sectioned, and the middle-ventricular portions were embedded in paraffin and serially cut into 7 μ m thick sections. The sections were stained with hematoxylin and eosin or picosirius red. Hematoxylin and eosin staining was used for infarct size analysis. The infarct size was measured using the public-domain software ImageJ (developed by National Institutes of Health and available on the internet site). The infarct size was calculated by dividing the length of the infarcted area by the total circumference of the LV and was expressed as percentage. To estimate the volume fraction (%) of collagen in picosirius red-stained sections, the surviving LV was quantitatively examined using a medium-power light-microscopy field. For each heart, 15 fields/rat were randomly selected and analyzed using Leica Qwin software (Leica Imaging Systems Ltd., Cambridge, UK). The mean value was subsequently calculated.

ECG and arterial pressure data analysis

Segments of ECG recordings from animals anesthetized with isoflurane were processed using a specific computer program (LabChart 7 Pro, ADInstruments, Bella Vista, Australia) module for ECG analysis to measure the PRi, Pd, QRSi and QT length. QT segment were normalized by the RR interval (QTc, Bazett's formula: QT interval / $\sqrt{\text{RR}}$ interval). The basal ECG and AP recordings from conscious rats were also processed using LabChart. Series, beat to beat, of RR interval and mean and systolic AP values were generated. The bradycardia induced by increasing the AP with phenylephrine injection and the tachycardia induced by the decrease in AP produced by injection of sodium nitroprusside were used to calculate the index of cardiac baroreflex sensitivity, which was calculated as the ratio between the reflex change in HR and the change in AP ($\Delta\text{HR} / \Delta\text{MAP}$). The time- and frequency-domain analysis of RR and SAP variability was performed using custom software (CardioSeries v2.4, available on the internet). The overall RR variability was evaluated using the standard deviation of the normal-to-normal RR interval (SDNN), and the square root of the mean of the sum of the squares of differences between adjacent NN intervals (RMSSD) was calculated and taken as an index of cardiac parasympathetic modulation.

For power spectral analysis of the RR and SAP variability, the beat-by-beat series of RR and SAP values were converted to data points every 100 ms using cubic spline interpolation (10 Hz). Next, the interpolated series were divided into half-overlapping segments of 512 points. A Hanning window was used to attenuate the side effects, and the spectrum was calculated for all segments using a fast Fourier transform (FFT) algorithm for discrete time series. All segments were visually inspected, and segments with artifacts or nonstationary data were excluded from analysis. Finally, the spectra were integrated in low (LF: 0.2-0.75 Hz) and high-frequency (HF: 0.75-3.0 Hz) bands.

For classical nonlinear measures, the sample entropy²¹ and stochastically detrended fluctuation analysis (DFA)²² was applied. For the DFA, one scaling exponent α was calculated for all window sizes "n". For the sample entropy, the parameters were set to $m = 2$ and $r = 15\%$ of the standard deviation in the series. All indices for the time-domain and nonlinear methods were calculated using specific plugins for the customized computer software JBio²³.

Statistical Analysis

All data were expressed as the mean \pm SEM. Student's t test was used for comparisons between groups. For multiple comparisons, the data were analyzed using multivariate analysis

of variance using the GLM Procedure of SAS software (SAS Institute Inc., Cary, NC USA). The level of significance was $p < 0.05$.

Results

Characterization of MSCs

To characterize the MSCs according to International Society for Cellular Therapy¹⁸, the immunophenotyping, differentiation potential and morphology were analyzed as follows:

Immunophenotyping - Immunophenotypic characterization of MSCs by flow cytometry demonstrated the expression of the characteristic cell surface antigens of these cells, i.e., CD90 (96.07%), CD29 (95.89%) and CD44 (40.7%). A negligible number of cells in MSC culture expressed the pan-hematopoietic marker CD45 (1.86%), the macrophage marker CD11b (0%) or the endothelial cell marker CD31 (0.38%); these findings indicate that these cultures were free from significant contamination by hematopoietic or endothelial cells (Figure 1A).

Differentiation – In order to evaluate their differentiation potential, the MSCs were differentiated into osteoblasts and adipocytes, after cultivation in a differentiation inducing media. The differentiation into osteoblasts in vitro was confirmed by observation of calcium-rich extracellular matrix after Alizarin Red staining (Figure 1B). No calcified extracellular matrix was observed in osteogenic control cultures (Figure 1B). The in vitro differentiation of MSCs into adipocytes was confirmed by showing stained lipid-laden vacuoles in the cytoplasm of the MSCs with Oil Red-O (Figure 1C). Adipogenic control cultures did not develop lipid vacuoles (Figure 1C). Cultured MSCs demonstrated the ability to undergo osteogenic and adipogenic differentiation.

Morphology –MSCs displayed a homogeneous spindle-shaped morphology that was maintained during subsequent passages (Figure 1D). Collectively, the results suggest that the cells used in this study showed the characteristics determined for MSCs.

Extent of myocardial infarction as determined by SPECT and cardiac function

The SPECT was used to match the infarct size of CHF rats before the treatment with MSCs or saline. Both groups, i.e. CHF and CHF+MSC, displayed a similar extent of MI before receiving saline ($52 \pm 2.8\%$) or MSCs ($51 \pm 1.7\%$) (Figures 2A and 2B). Therefore, CHF and CHF+MSC rats exhibited, approximately, the same infarct size before treatment. The myocardial perfusion was preserved in CONTROL rats (Figures 2A and 2B).

Ventricular function was assessed by radionuclide ventriculography before and one month after the administration of MSCs or saline. A remarkable reduction in the LVEF, after MI, was observed in not treated group, i.e. CHF ($21\pm 2.4\%$), and treated with MSC, i.e. CHF + MSC ($19\pm 1.9\%$), compared with CONTROL ($48\pm 5\%$) (Figure 2C). One month after the treatment, the LVEF was still reduced in the CHF rats, i.e. CHF ($20\pm 3.5\%$) and CHF+MSC ($20\pm 2.3\%$) groups, compared with CONTROL group ($54\pm 2.5\%$) (Figure D). This finding suggests that MI reduced ejection fraction, which was not improved by the administration of MSCs.

Electrocardiographic recording

To assess the electrocardiographic consequences of the MI and the effect of MSCs, a 12-lead ECG was recorded, in anesthetized animals, five weeks after MI including the time frame established one month after administration of MSCs. The ECG parameters are shown in Table 1. A lengthening of the QRS interval was observed in CHF as compared with the CONTROL group; but not in the MSC-treated (CHF+MSC) group. The QT and QTc intervals from CHF rats not treated were also increased. Treatment with MSCs did not affect the QT intervals. All other ECG parameters were similar among groups (Table 1).

Heart rate variability

HRV allows evaluating the autonomic - sympathetic and parasympathetic - modulation of cardiac activity²⁴. Therefore, chronic ECG recording was performed five weeks after MI including a time frame established one month after administration of MSCs. The basal RR interval (RRi) did not differ among groups (Table 2). The analysis of HRV in the time domain showed a reduction in SDNN and RMSSD in the CHF group; however, this reduction was not observed in the group treated with MSCs, i.e. CHF + MSC group (Table 2). Frequency domain analysis of the HRV showed that the RRi spectra from CHF group presented a lower power for the LF and HF bands than those in CONTROL group; conversely, CHF+MSC exhibited an increase in the LF and HF band powers compared with those in the non-treated, CHF group (Table 2, Figure 3). The non-linear analysis (Table 2) revealed that DFA was increased in the CHF group, but not in the group treated with MSC. Similarly, sample entropy of RRi was reduced only in CHF but not in the CHF+MSC group. These data indicate that MSCs improved the HRV, which was deranged by the MI.

Arterial pressure variability

The assessment of arterial pressure variability also allowed quantifying the contribution of sympathetic and parasympathetic modulation of vasomotor activity²⁴. Basal levels of the mean (MAP) and systolic (SAP) arterial pressure five weeks after MI, including a time frame established one month after administration of MSCs, are shown in Table 3. These parameters were reduced in CHF rats, whether treated with MSCs or not, as compared with animals in the CONTROL group. Time domain analysis of the SAP variability revealed decreased SDNN in CHF rats, i.e. CHF treated or not, as compared with the CONTROL group. Finally, when the arterial pressure variability was analyzed in the frequency domain, the SAP spectra from CHF and CHF+MSC groups exhibited a lower power for the LF band when compared with the CONTROL group (Table 3). Therefore, these data indicate that MSCs did not improve the arterial pressure variability, which was disturbed by the MI, as observed in the CHF rats.

Baroreflex sensitivity

The arterial baroreflex plays an important role in cardiocirculatory control and is also impaired in CHF^{3,4}. The index of baroreflex sensitivity, a hallmark of baroreflex integrity, is defined as the ratio between the reflex changes in HR and MAP and is shown in Figure 4. Baroreflex sensitivity to bradycardia was reduced in the CHF group (0.98 ± 0.2 bpm/mmHg) as compared with the CONTROL group (1.80 ± 0.2 bpm/mmHg). The MSC-treated group (CHF+MSC) exhibited higher baroreflex sensitivity to bradycardia (1.74 ± 0.2 bpm/mmHg) as compared with the non-treated, CHF group (Figure 4A). Baroreflex sensitivity in response to tachycardia was higher in the CHF+MSC group (3 ± 0.5 bpm/mmHg) when compared with the non-treated CHF group (1.71 ± 0.3 bpm/mmHg), but no difference was observed between the CONTROL (2.32 ± 0.3 bpm/mmHg) and CHF rats, treated or not with MSCs (Figure 4B). Therefore, this finding indicates that the therapy with MSC prevented in CHF rats only the attenuation of baroreflex sensitivity to bradycardic responses.

Histological analysis and weight of the heart

The extent of fibrosis and weight of the heart were examined in order to assess the benefit of MSCs upon CHF.

Extent of Ischemic Area. One month after administration of MSCs, the infarct size of the MSC-treated group, i.e. CHF+MSC ($36 \pm 2\%$), was significantly smaller than that of the non-treated animals, i.e. the CHF group ($48 \pm 2\%$) (Figure 5A and 5B). Hence, the therapy with MSC reduced the infarct size.

Interstitial fibrosis. Left ventricular interstitial fibrosis was examined in a time frame established one month after administration of MSCs or saline. A larger accumulation of interstitial collagen (red color; Figure 5C and 5D) was observed in the surviving LV myocardium in the CHF group ($14.6\pm 1.5\%$) as compared with the CONTROL group ($10.3\pm 0.8\%$). This collagen accumulation after MI was reduced by MSCs treatment ($11\pm 0.7\%$) (Figure 5C and 5D).

Cardiac weight. CHF in rats also leads to cardiac hypertrophy¹⁹. Therefore, the heart weight was measured to evaluate the degree of cardiac hypertrophy indirectly¹⁹. The hearts of the CHF rats, MSC-treated (CHF + MSC group, 2.18 ± 0.14 mg) or not (CHF, 2.11 ± 0.11 mg), exhibited higher weights compared with the CONTROL group (1.58 ± 0.05 mg) (Figure 5E). Thus, these data indicate that the rats with CHF exhibited a heavier heart as compared to the CONTROL group. This finding suggests that despite the treatment with MSCs improved the histological data; MSCs had no effect on heart weight.

Discussion

This study is the first to evaluate the effect of MSC therapy on baroreflex sensitivity and HR and AP variability in CHF. The present study showed that after five weeks of MI and four weeks after treatment, the MSCs improved the HRV, as indicated by analyses in time- and frequency-domain (spectral analysis), as well as non-linear analysis (entropy and DFA). The baroreflex sensitivity, collagen density and extent of ischemic area were also improved by the treatment with MSCs. However, the MSCs showed no effect on the LVEF, MAP, AP variability and heart weight.

After MI the heart undergoes a process known as cardiac remodeling, which involves changes in the architecture of the ventricular chamber, such as the development of a collagen-based scar in the ischemic area and compensatory myocyte hypertrophy and interstitial fibrosis in the surviving myocardium combined with impairment in cardiac function^{25,26}. MSC therapy reduced the extent of the MI and collagen in the surviving LV. The beneficial effect of MSCs on these variables might be explained by the MSC secretion of bioactive molecules, such as growth factors, cytokines and chemokines that possess trophic (anti-apoptotic, supportive and angiogenic), immunomodulatory, anti-scarring and chemoattractant paracrine effects, which constitute their most significant biological role under physiopathological conditions²⁷. Therefore, MSCs helped to protect the myocardium from ischemic deterioration and improved the reparative process.

Cardiac hypertrophy was evaluated using an indirect method, i.e. measurement of the heart weight. The heart weight in CHF rats increased, but MSCs did not affect this outcome. Nevertheless, despite their effect on morphological structure of the heart, MSCs did not improve the cardiac function, which still remained depressed in CHF rats treated with MSCs; this finding is consistent with other studies²⁸⁻³⁰.

Morphological alteration could also be associated with changes in HR. Nevertheless, in the present study, HR was not different among groups, which is consistent with a previous report¹³. However, the HR changes in CHF are still debated, e.g. studies have shown increased^{31,32}, reduced³³ or unchanged^{34,35} HR in this pathological condition.

Consistent with previous reports^{19,35}, it was shown that the AP was reduced without a change in HR after MI in CHF rats. MSC therapy did not reverse the hypotension. Hypotension in MI could be related to lower cardiac output³⁶. The LVEF was reduced in CHF rats despite they received MSC treatment. Therefore, the observed hypotensive effect may be attributed to the decreased cardiac output presumably caused by the depressed cardiac function.

Baroreflex sensitivity is a marker of the integrity of short-term regulation of AP by the autonomic nervous system³⁷. In heart diseases, such as CHF, a disorder of baroreflex function has been consistently documented^{38,39}. The current study demonstrated a reduction in the reflex bradycardia in the CHF rats, while the reflex tachycardia was not altered. These findings are consistent with previous observations^{35,40}. Attenuation of baroreflex sensitivity can be an important factor in the prognosis of patients with heart failure⁴¹. MSCs increased the baroreflex sensitivity to bradycardia post-MI, showing a beneficial effect on the cardiovascular control of CHF rats.

HRV and AP variability are robust non-invasive tools for estimating the relative autonomic modulation of the cardiovascular system²⁴. Additionally, it has been well documented that HRV is attenuated in CHF, and this change is a reliable predictor of cardiac mortality for diseases such as MI or CHF⁴. The absolute values of the indices of HRV in time- (RMSSD and SDNN) and frequency-domain (spectral analysis) were reduced in CHF rats, indicating autonomic imbalance in these animals. MSC therapy improved the reduced autonomic control triggered by ischemic event. Although MSCs improved the HRV, the AP variability was reduced in CHF rats, regardless of MSC treatment.

HRV was also examined using nonlinear methods (DFA and sample entropy). Although the absolute values of the time- and frequency-domain measures of HRV describe the overall magnitude of the HR variance, DFA and entropy describe the nonlinear dynamics

of HR fluctuations⁴². Sample entropy measures the regularity (usually related to the complexity level) of RR interval time series⁴³, whereas DFA quantifies the fractal scaling properties of these time series over different time scales⁴⁴. Decreases in entropy values are often linked to a loss of cardiovascular complexity⁴⁵. The results show that sample entropy was reduced in CHF rats. Moreover, mean entropy tended to increase after MSC treatment. Otherwise, it has been widely reported that a reduction in short-term DFA index (α_1) is the most powerful predictor of mortality in patients with heart failure^{44,46,47}. Here, a single DFA index was extracted (α_1). In this case, although there is no distinction between short- and long-term fractal properties, the single index shows better correlation with the long-range properties. More details can be found elsewhere⁴⁸. Usually, healthy systems are characterized by a DFA index of approximately one. The results show that the DFA fractal index increases in CHF and recovers after MSC treatment, indicating that the fractal mechanisms involved in HRV are degraded by CHF and restored by MSC treatment.

HRV data, as well as the improvement in baroreflex sensitivity, are correlated with better cardiovascular autonomic control in the infarcted rats treated with MSCs; this finding suggests that the cells had a positive effect on the CHF rats and restored the autonomic control of HR.

Possible mechanisms for the beneficial effects of MSCs in CHF after ischemic event include the following: 1) the MSCs differentiate into functional cardiomyocytes^{49,50}; 2) decrease the healing area^{50,51} and increase the density of healing^{49,51}; 3) increase angiogenesis and neovascularization⁵⁰. These mechanisms may result from the secretion of soluble factors that act in a paracrine manner¹⁴ and have pro-angiogenic, anti-apoptotic, anti-fibrotic and immunoregulatory effects²⁷. It is possible that MSCs can facilitate neural development through this pathway by inducing extracellular matrix remodeling¹⁵. However, it has been hypothesized that MSCs differentiate into nerve cells^{52,53}. Nevertheless, the mechanisms underlying the beneficial effects of MSCs are not completely understood. In addition, several important questions regarding the delivery method and route, the amount of injected cells and the timing for stem cell transplantation are among the factors that may limit cell-based therapies in the treatment of ischemic heart disease^{9,10,54}. These issues, undoubtedly, requires further studies in order to optimize the cell therapy approaches, and represent a focus of future research in this field^{9,10,54}.

In summary, MSC therapy is an important approach for maintaining normal physiological mechanisms during the development of CHF. After five weeks of MI and four weeks after MSC transplantation, MSCs improved the baroreflex sensitivity, autonomic

modulation, DFA, extent of MI and collagen density in the heart, demonstrating the beneficial effects of MSC therapy on heart failure.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Dr. Dimas Covas Tadeu and Ms. Patricia Vianna Bonini Palma, who are from the Regional Blood Center of Ribeirao Preto, for allowing us to use their flow cytometer. We also thank the following people from the Medical School of Ribeirao Preto (USP): Mr. Rubens Melo, Dr. Marcos A. Rossi (in memories) and Dr. Cibele Prado for histological support and Dr. Guillermo Andrey Ariza Traslaviña for assistance with the statistical analysis.

FUNDING

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Núcleo de Insuficiência Cardíaca da Universidade de São Paulo (NIC-USP).

DISCLOSURES

No competing financial interests exist.

REFERENCES

1. Felder RB, Francis J, Weiss RM, Zhang Z, Wei S, Johnson AK. (2001). Neurohumoral regulation in ischemia-induced heart failure. Role of the forebrain. *Ann N Y Acad Sci* 940:444-53.
2. Krieger EM, Salgado HC, Michelini LC. (1982). Resetting of baroreceptors. *Int Rev Physiol* 26: 119-146.
3. Dibona GF, Sawin LL. (1994). Reflex regulation of renal nerve activity in cardiac failure. *Am J Physiol* 266:R27-39.
4. La Rovere MT, Bigger JT Jr, Marcus FI, Mortara A, Schwartz PJ. (1998). Baroreflex sensitivity and heart rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial

- infarction. ATRAMI (Autonomic Tone and Reflexes After Myocardial Infarction) Investigators. *Lancet* 351:478-84.
5. Porter TR, Eckberg DL, Fritsch JM, Rea RF, Beightol LA, Schmedtje JF, Mohanty PK. (1990). Autonomic pathophysiology in heart failure patients: sympathetic-cholinergic interrelations. *J Clin Invest* 85:1362-1371.
 6. Mark AL. (1995). Sympathetic dysregulation in heart failure: mechanisms and therapy. *Clin Cardiol* 18: I3-I8.
 7. Olshansky B, Sabbah HN, Hauptman PJ, Colucci WS. (2008). Parasympathetic nervous system and heart failure: pathophysiology and potential implications for therapy. *Circulation* 118:863-871.
 8. da Silva Meirelles L, Nardi NB. (2009). Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Front Biosci* 14:4281-98.
 9. Mazhari R, Hare JM. (2012). Translational findings from cardiovascular stem cell research. *Trends Cardiovasc Med* 22:1-6.
 10. Madonna R, Ferdinandy P, De Caterina R, Willerson JT, Marian AJ. (2014). Recent developments in cardiovascular stem cells. *Circ Res.* 115:e71-e78.
 11. Berry MF, Engler AJ, Woo YJ, Pirolli TJ, Bish LT, Jayasankar V, Morine KJ, Gardner TJ, Discher DE, Sweeney HL. (2006). Mesenchymal Stem cell injection after myocardial infarction improves myocardial compliance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290:H2196-H2203.
 12. Davani S, Marandin A, Mersin N, Royer B, Kantelip B, Hervé P, Etievent JP, Kantelip JP. (2003). Mesenchymal progenitor cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a rat cellular cardiomyoplasty model. *Circulation* 108:II253-8.
 13. Nagaya N, Kangawa K, Itoh T, Iwase T, Murakami S, Miyahara Y, Fujii T, Uematsu M, Ohgushi H, Yamagishi M, Tokudome T, Mori H, Miyatake K, Kitamura S. (2005). Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation* 112:1128–1135.
 14. Gneocchi M, He H, Liang OD, Melo LG, Morello F, Mu H, Noiseux N, Zhang L, Pratt RE, Ingwall JS, Dzau VJ. (2005). Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med* 11:367–368.
 15. Pak HN, Qayyum M, Kim Dt, Hamabe A, Miyauchi Y, Lill MC, Frantzen M, Takizawa K, Chen LS, Fishbein MC, Sharifi BG, Chen PS, Makkar R. (2003). Mesenchymal stem cell injection induces cardiac nerve sprouting and increased tenascin expression in a Swine model

- of myocardial infarction. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 14:841-8.
16. Kim SK, Pak HN, Park JH, Fang YF, Kim GI, Park YD, Hwang C, Kim YH, Kim BS. (2010). Cardiac cell therapy with mesenchymal stem cell induces cardiac nerve sprouting, angiogenesis, and reduced connexin43-positive gap junctions, but concomitant electrical pacing increases connexin43-positive gap junctions in canine heart. *Cardiol Young* 20:308-17.
 17. Wang Y, Xue M, Xuan Y-L, Hu H-S, Cheng W-J, Suo F, Li X-R, Yan S-H, Wang L-X. (2013). Mesenchymal stem cell therapy improves diabetic cardiac autonomic neuropathy and decreases the inducibility of ventricular arrhythmias. *Heart, Lung and Circulation* 22:1018-1025.
 18. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop DJ, Horwitz E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8: 315-7.
 19. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, Braunwald E. (1979). Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Cir Res* 44:503-512.
 20. Oliveira LF, Mejia J, Carvalho EE, Lataro RM, Frassetto SN, Fazan R Jr, Salgado HC, Galvis-Alonso OY, Simoes MV. (2013). Myocardial infarction area quantification using high-resolution SPECT images in rats. *Arq Bras Cardiol.* 101:59-67.
 21. Richman JS, Moorman JR. (2000). Physiological time-series analysis using approximate entropy and sample entropy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278:H2039-49.
 22. Peng CK; Havlin S, Stanley HE, Goldberger AL. (1995). Quantification of scaling exponents and crossover phenomena in nonstationary heartbeat time-series. *Chaos* 5:82-87.
 23. Duque JJ, Silva LEV, Murta LO. (2013). Open architecture software platform for biomedical signal analysis. In: 2013 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), Osaka 2084-2087.
 24. Task Force Of The European Society Of Cardiology. (1996). The North American Society Of Pacing Eletrophysiology: Heart Rate Variability: Standards of Measurement, Physiological Interpretation and Clinical Use. *Circulation* 93:1043-1065.
 25. Jugdutt BI. (2003). Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix: when is enough? *Circulation* 108:1395-403.
 26. Murdoch CE, Zhang M, Cave AC, Shah AM. (2006). NADPH oxidase-dependent redox signaling in cardiac hypertrophy, remodeling and failure. *Cardiovasc Res* 71:208-215.
 27. Meirelles L da S, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. (2009). Mechanisms involved in the

- therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev* 20:419-27.
28. Guarita-Souza LC, Carvalho KA, Simeone BR, Francisco JC, Miyague N, Olandoski M. (2006). Functional outcome of bone marrow stem cells: mononuclear versus mesenchymal stem cell safer cellular therapy in myocardial scar in Wistar rats. *Transplant Proc* 38:1953-4.
 29. Amado LC, Schuleri KH, Saliaris AP, Boyle AJ, Helm R, Oskouei B, Centola M, Eneboe V, Young R, Lima JA, Lardo AC, Heldman AW, Hare JM. (2006). Multimodality noninvasive imaging demonstrates in vivo cardiac regeneration after mesenchymal stem cell therapy. *J Am Coll Cardiol* 48:2116-24.
 30. Cheng Z, Liu X, Ou L, Zhou X, Liu Y, Jia X, Zhang J, Li Y, Kong D. (2008). Mobilization of mesenchymal stem cells by granulocyte colony-stimulating factor in rats with acute myocardial infarction. *Cardiovasc Drugs Ther* 22:363-71.
 31. Osterziel KJ, Hänlein D, Willenbrock R, Eichhorn C, Luft F, Dietz R. (1995). Baroreflex sensitivity and cardiovascular mortality in patients with mild to moderate heart failure. *Br Heart J* 73:517-22.
 32. Li M, Zheng C, Sato T, Kawada T, Sugimachi M, Sunagawa K. (2004). Vagal nerve stimulation markedly improves long-term survival after chronic heart failure in rats. *Circulation* 109:120-124.
 33. Du XJ, Cox HS, Dart AM, Esler MD. (1998). Depression of efferent parasympathetic control of heart rate in rats with myocardial infarction: effect of losartan. *J Cardiovasc Pharmacol* 31:937-44.
 34. Gao L, Schultz HD, Patel KP, Zucker IH, Wang W. (2005). Augmented input from cardiac sympathetic afferents inhibits baroreflex in rats with heart failure. *Hypertension* 45:1173-81.
 35. Sabino JP, da Silva CA, Giusti H, Glass ML, Salgado Hc, Fazan R JR. (2013). Parasympathetic activation by pyridostigmine on chemoreflex sensitivity in heart-failure rats. *Auton Neurosci* 179:43-8.
 36. Gheorghiade M, Vaduganathan M, Ambrosy A, Böhm M, Campia U, Cleland JG, Fedele F, Fonarow GC, Maggioni AP, Mebazaa A, Mehra M, Metra M, Nodari S, Pang PS, Ponikowski P, Sabbah HN, Komajda M, Butler J. (2013). Current management and future directions for the treatment of patients hospitalized for heart failure with low blood pressure. *Heart Fail Rev* 18:107-22.
 37. Sapoznikov D, Backenroth R, Rubinger D. (2010). Baroreflex sensitivity and sympatho-vagal balance during intradialytic hypotensive episodes. *J Hypertens* 28:314-24.
 38. Kar S, Gao L, Belatti DA, Curry PI, Zucker IH. (2011). Central angiotensin (1-7) enhances baroreflex gain in conscious rabbits with heart failure. *Hypertension* 58:627-634.

39. Flora JS. (2009). Sympathetic nervous system activation in human heart failure: clinical implications of an updated model. *J Am Coll Cardiol* 54:375-385.
40. Eckberg DL, Drabinsky M, Braunwald E. (1971). Defective cardiac parasympathetic control in patients with heart disease. *N Engl J Med* 285:877-83.
41. Nolan J, Batin PD, Andrews R, Lindsay SJ, Brooksby P, Mullen M, Baig W, Flapan AD, Cowley A, Prescott RJ, Neilson JM, Fox KA. (1998). Prospective study of heart rate variability and mortality in chronic heart failure: results of the United Kingdom Heart Failure and Assessment of Risk Trial. *Circulation* 98:1510-1516.
42. Voss A, Schulz S, Schroeder R, Baumert M, Caminal P (2009). Methods derived from nonlinear dynamics for analyzing heart rate variability. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci* 367:277-296.
43. Pincus SM, Goldberger AL. (1994). Physiological time-series analysis: what does regularity quantify? *Am J Physiol* 266:H1643-56.
44. Makikallio TH, Huikuri HV, Hintze U, Videbaek J, Mitrani RD, Castellanos A, Myerburg RJ, Moller M. (2001). DIAMOND Study Group (Danish Investigations of Arrhythmia and Mortality ON Dofetilide). Fractal analysis and time- and frequency-domain measures of heart rate variability as predictors of mortality in patients with heart failure. *Am J Cardiol* 87:178-82.
45. Porta A, Gneccchi-Ruscione T, Tobaldini E, Guzzetti S, Furlan R, Montano N. (2007). Progressive decrease of heart period variability entropy-based complexity during graded head-up tilt. *J Appl Physiol* 103:1143-1149.
46. Huikuri HV, Makikallio TH, Peng CK, Goldberger AL, Hintze U, Moller M. (2000). Fractal correlation properties of R-R interval dynamics and mortality in patients with depressed left ventricular function after an acute myocardial infarction. *Circulation* 101:47-53.
47. Tapanainen JM, Thomsen PE, Kober L, Torp-Pedersen C, Makikallio TH, Still AM, Lindgren KS, Huikuri HV. (2002). Fractal analysis of heart rate variability and mortality after an acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 90:347-52.
48. Peng CK, Havlin S, Stanley HE, Goldberger AL. (1995). Quantification of scaling exponents and crossover phenomena in nonstationary heart beat time series. *Chaos* 5:82-7.
49. Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, Senechal G, Meyers J, Redmond JM, Pittenger MF, Martin BJ. (2002). Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: Engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg* 73:1919-1925.
50. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S. (2001). Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-

marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 7:430-436.

51. Tomita S, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Kim EJ, Sakai T, Jia ZQ. (1999). Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* 100:II247-56.
52. Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, Gaupp D, Baddoo M, Kaminski N, Phinney DG. (2003). Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100: 8407-11.
53. Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, Digirolamo C, Prockop DJ. (1998). Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats--similarities to astrocyte grafts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95: 3908-13.
54. Vrtovec B, Poglajen G, Haddad F. (2013). Stem cell therapy in patients with heart failure. *Methodist Debaquey Cardiovasc J* 9:6-10.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. Immunophenotypic profile and differentiation potential of the MSCs. **Panel A:** Flow cytometric analysis of MSCs showed that these cells were positive for the cell surface markers CD29, CD44 and CD90, which are typically expressed in mesenchymal stem cells. **Panel B:** Photomicrographs of the in vitro differentiation into osteoblasts of MSCs cultured in osteogenic inducing media (Osteogenic), and undifferentiated MSCs cultured in complete media, without osteogenic inductors (Osteogenic Control). Alizarin Red staining showed the presence of calcium deposits (red regions), indicating osteoblast differentiation. **Panel C:** Photomicrographs of the in vitro differentiation into adipocytes of MSCs cultured in adipogenic inducing media (Adipogenic), and undifferentiated MSCs cultured in complete media, without adipogenic inductors (Adipogenic Control). Oil Red-O staining showed the presence of prominent lipid deposits in the cytoplasm of cells (orange regions), indicating the differentiation of MSCs into adipocytes. **Panel D:** MSCs cultured in complete medium showed a homogeneous spindle-shaped population during subsequent passages. Representative photomicrograph of MSCs at passage 5 is shown. Magnifications of 100x (PANELS B and D; Bar = 200µm) and 400x (PANEL C; Bar = 50µm).

FIGURE 2. Quantification of myocardial infarcted area and measure of left ventricular function in chronic heart failure (CHF) rats. **Panel A:** Illustration of myocardial perfusion SPECT tomographic slices. The Polar Map represents the heart as a whole in the left column. Targeted cuts from base to apex of the heart are represented in the contiguous columns. The dark area enclosed in the silver circle denotes cardiac injury. **Panel B:** Quantitative data from SPECT showing similar extent of MI (% of Perfusion Defect), before treatment, in CHF (N=15) and CHF+MSC (N=9), and preserved myocardial perfusion in CONTROL (N=9). **Panel C and D:** Bar graphs showing LVEF (%), assessed by radionuclide ventriculography, before (Panel C) and after one month of (Panel D) treatment in CHF (N=9), CHF+MSC (N=7) and CONTROL (N=9). SPECT, single photon emission computed tomography; CONTROL, fictitious ligation of the left coronary artery; LVEF, left ventricular ejection fraction. The asterisk indicates a statistically significant difference between CHF and CONTROL, * $p < 0.05$. Data are expressed as mean \pm standard error of mean (SEM).

FIGURE 3. Representative spectra of heart rate variability, in the frequency domain, from control (CONTROL) and chronic heart failure (CHF) rats treated or not with mesenchymal stem cells (MSC). The individual spectra show the LF and HF bands of CONTROL, CHF and CHF+MSC groups. CONTROL, fictitious ligation of the left coronary artery; LF, low frequency; HF, high frequency.

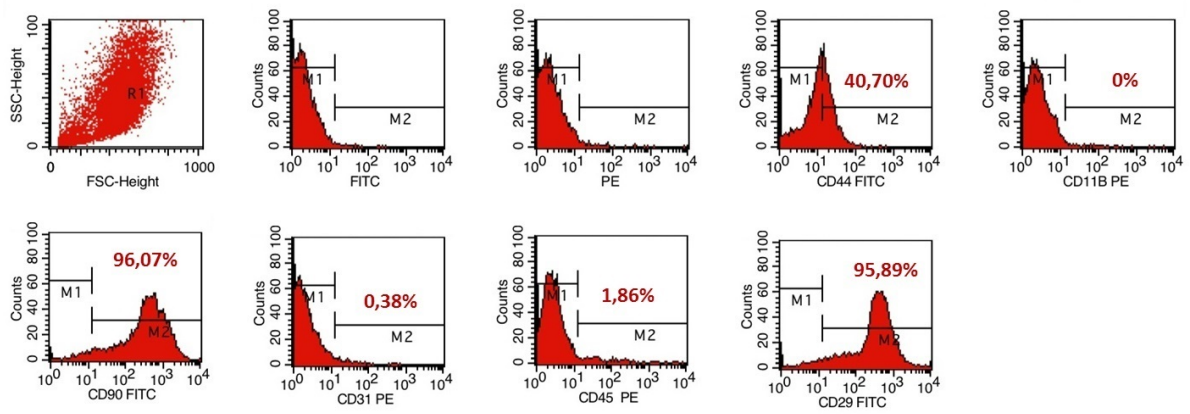
FIGURE 4. Baroreflex sensitivity from control (CONTROL) and chronic heart failure (CHF) rats treated or not with mesenchymal stem cells (MSC) after one month of the treatment. **Panel A:** Bar graphs showing baroreflex sensitivity to bradycardia evoked by phenylephrine injection from CONTROL (N=5), CHF (N=7) and CHF+MSC (N=4); **Panel B:** Bar graphs showing baroreflex sensitivity to tachycardia evoked by sodium nitroprusside injection of CONTROL (N=6), CHF (N=5) and CHF+MSC (N=4). CONTROL, fictitious ligation of the left coronary artery. The asterisk indicates a statistically significant difference between CHF and CONTROL, * $p < 0.05$; the dagger indicates a statistically significant difference between CHF+MSC and CHF, † $p < 0.05$. Data are expressed as mean \pm standard error of mean (SEM).

FIGURE 5. Histopathological analysis and heart weight from control (CONTROL) and chronic heart failure (CHF) rats treated or not with mesenchymal stem cells (MSC). Histological assessment and heart weight measure was performed in a time frame established one month after the treatment with MSCs. **Panel A:** Bar graphs showing the infarct size (% of

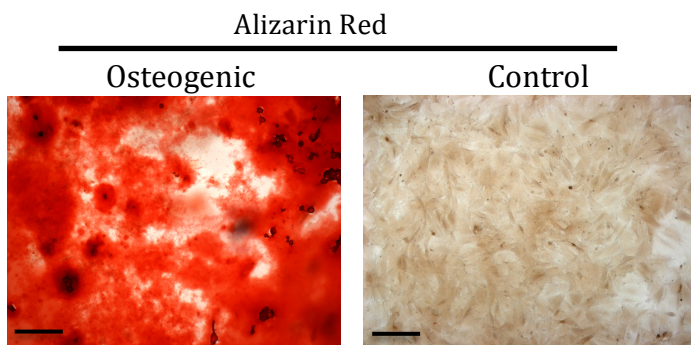
LV Endocardial Circumference) in CHF (N= 11) and CHF+MSC (N=7). **Panel B:** Photographs of heart sections stained with hematoxylin and eosin in CHF and CHF+MSC group. **Panel C:** Bar graphs showing the percentage of interstitial collagen in surviving LV myocardium in CONTROL (N=9), CHF (N=9) and CHF+MSC (N=7). **Panel D:** Photomicrograph of hearts sections stained with Picrosirius Red in CONTROL, CHF and CHF+MSC (Magnifications of 400x, Bar = 30 μ m). **Panel E:** Bar graphs showing the heart weight of the CONTROL (N=8), CHF (N=8) and CHF+MSC (N=6) group. CONTROL, fictitious ligation of the left coronary artery. The asterisk indicates a statistically significant difference between CHF and CONTROL, * $p < 0.05$; the dagger indicates a statistically significant difference between CHF+MSC and CHF, † $p < 0.05$. Data are expressed as mean \pm standard error of mean (SEM).

Figure 1

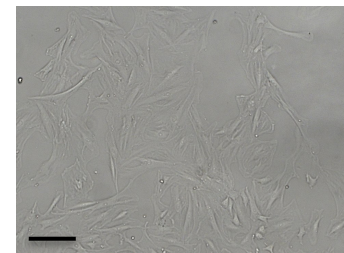
A



B



D



C

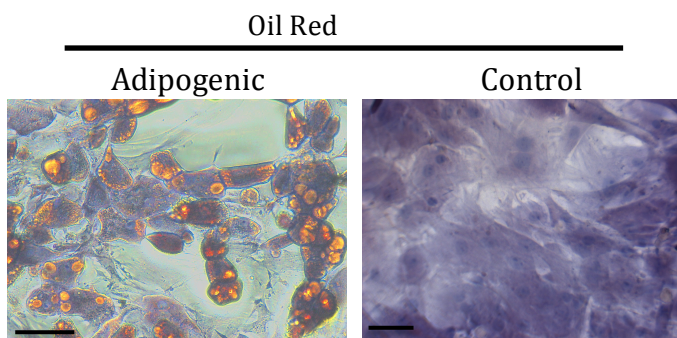


Figure 2

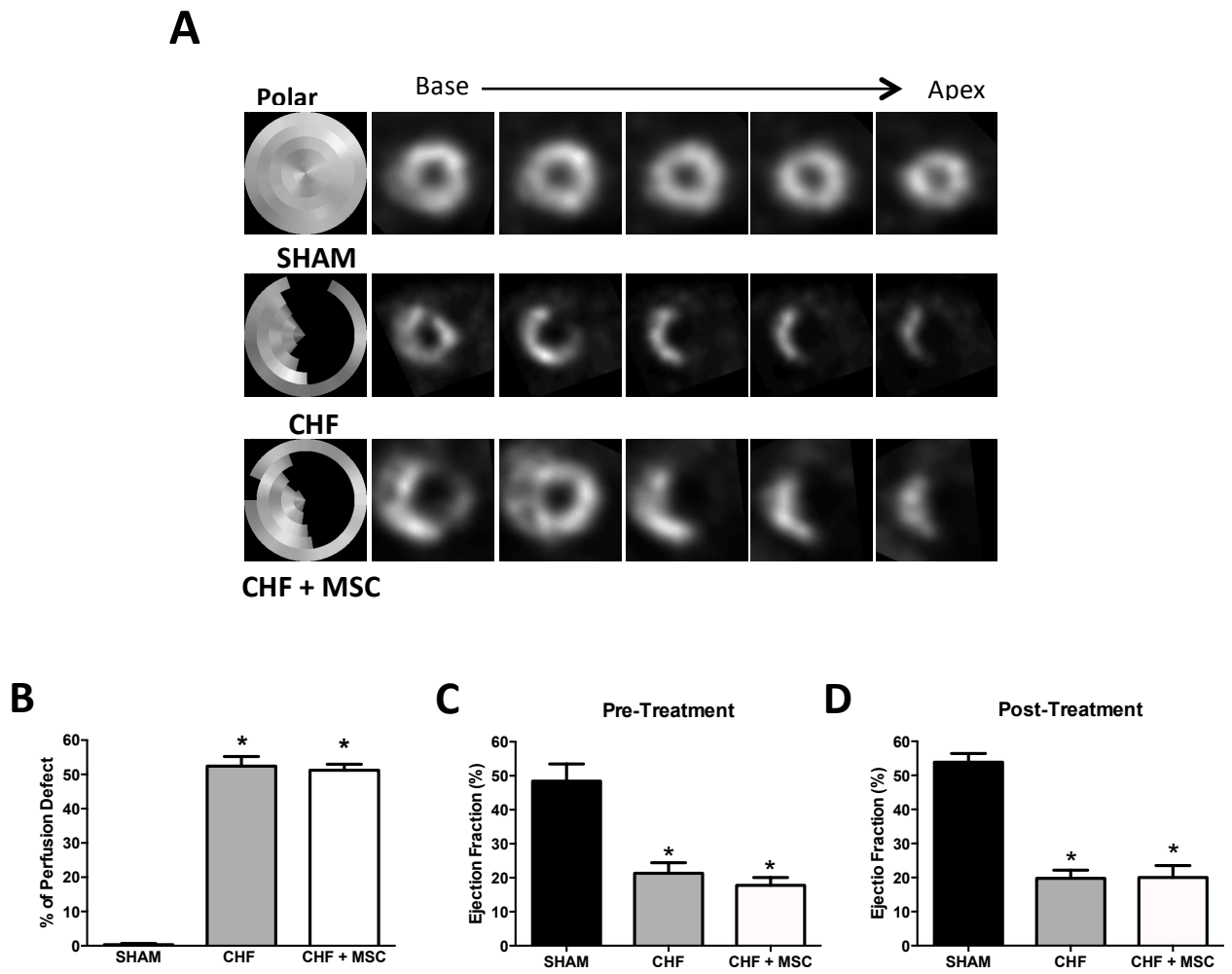


Figure 3

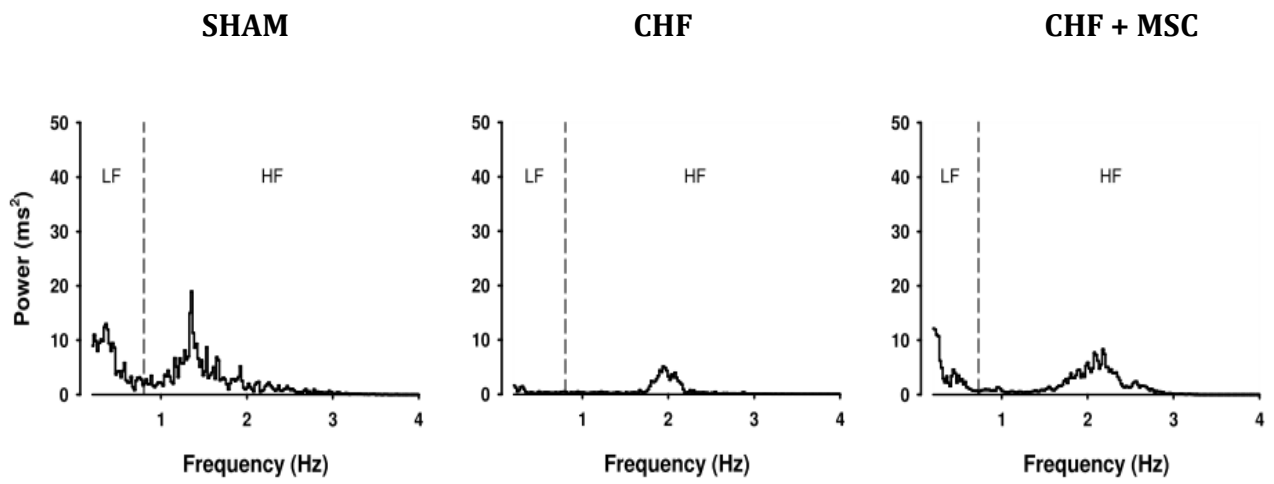
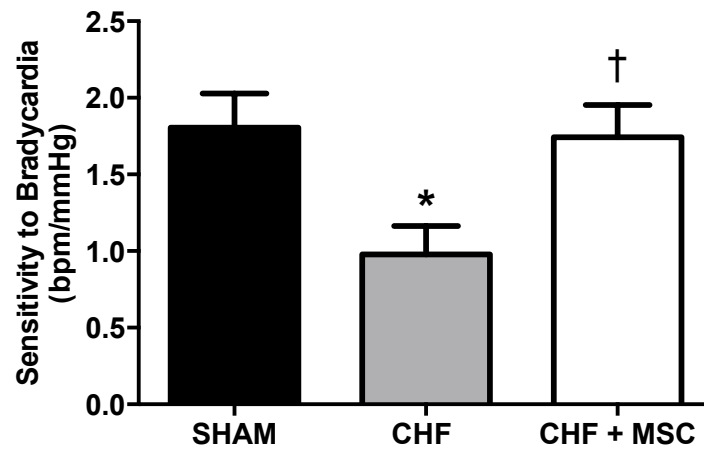


Figure 4

A



B

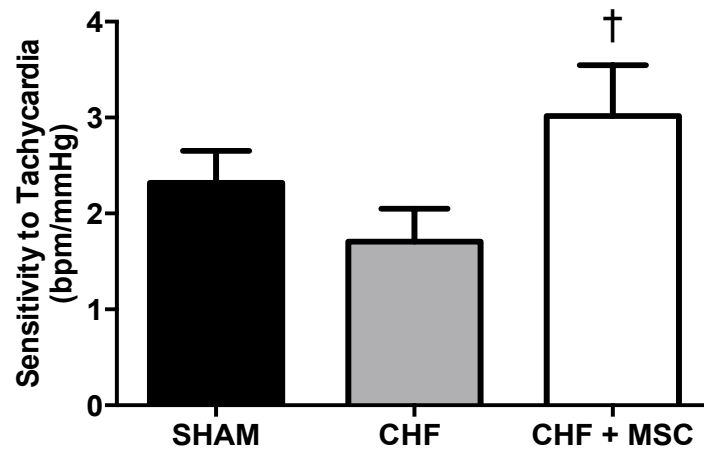


Figure 5

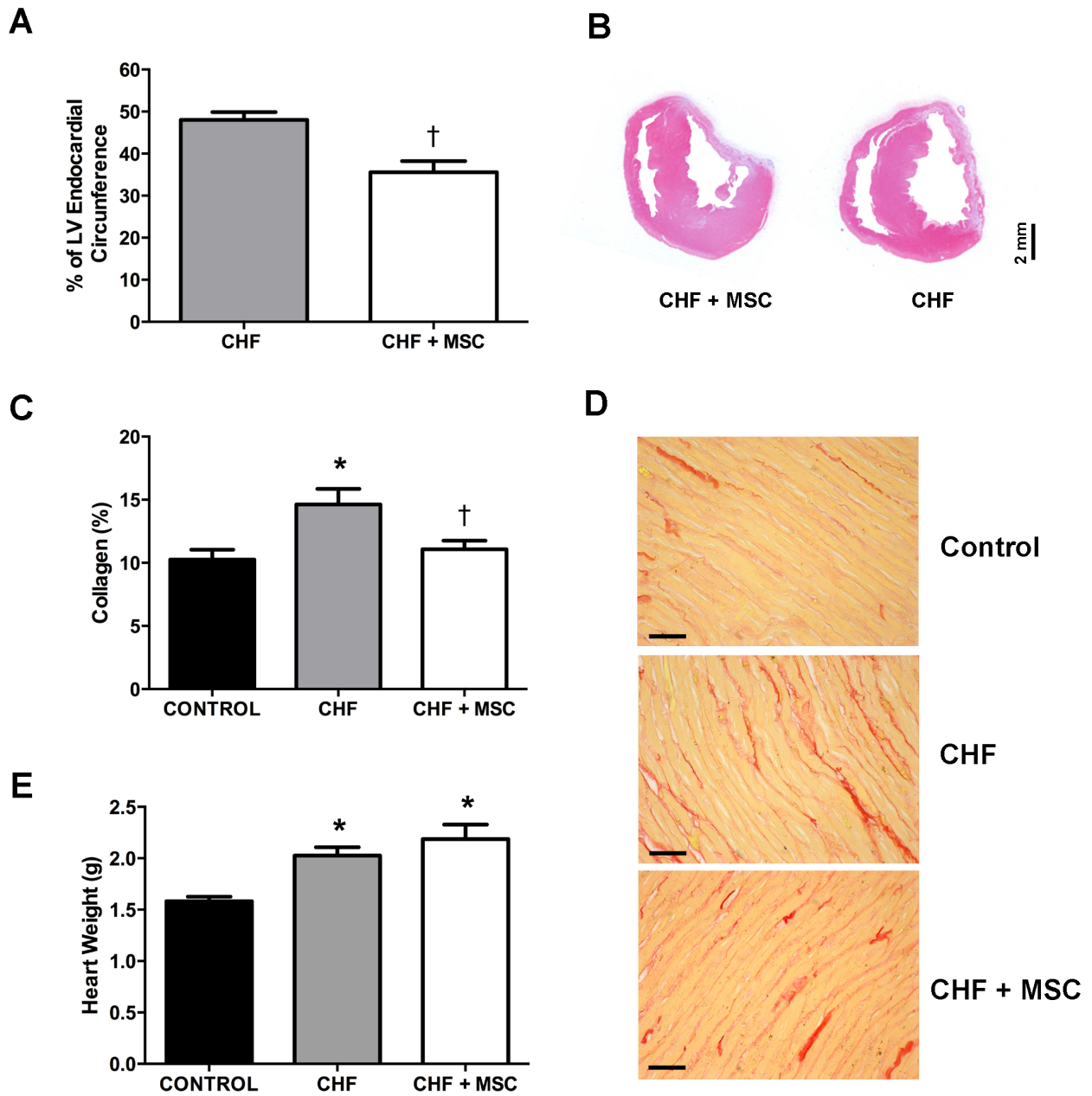


TABLE 1: Electrocardiographic parameters from control (CONTROL) and chronic heart failure (CHF) rats treated or not with mesenchymal stem cells (MSC).

	CONTROL (n = 7)	CHF (n = 7)	CHF + MSC (n = 8)
PRi (ms)	58 ± 1.4	61 ± 1.9	63 ± 2.5
Pd (ms)	30 ± 1.2	29 ± 2.5	29 ± 3
QRS (ms)	25 ± 1	30 ± 1.7 *	29 ± 1.7
QTi (ms)	85 ± 2.4	96 ± 1.3 *	99 ± 2.8 *
QTc (ms)	197 ± 3.2	228 ± 4.9 *	227 ± 5.6 *

The ECG parameters, from 12-lead ECG recording in anesthetized animals are the following: PRi = PR interval, Pd = duration of P wave, QRS = duration of QRS complex, QTi = QT interval, QTc = QT interval corrected by heart rate (Bazzet's formula). CONTROL = fictitious ligation of the left coronary artery. The asterisk indicates a statistically significant difference between CHF and CONTROL, *p<0.05. Data are expressed as mean ± standard error of mean (SEM).

TABLE 2: Heart rate variability from control (CONTROL) and chronic heart failure (CHF) rats treated or not with mesenchymal stem cells (MSC).

	CONTROL (n = 9)	CHF (n = 10)	CHF + MSC (n = 6)
<i>Time domain</i>			
RR (ms)	190 ± 4.4	187 ± 4	195 ± 4.3
SDNN (ms)	7.7 ± 0.7	4.9 ± 0.4 *	6.8 ± 1.3
RMSSD (ms)	5 ± 0.4	3.4 ± 0.4 *	4.7 ± 1
<i>Frequency domain</i>			
LF abs (ms²)	1.6 ± 0.3	0.4 ± 0.1 *	1.6 ± 0.7 †
HF abs (ms²)	6.5 ± 1	2.3 ± 0.6 *	5.3 ± 1.3 †
LF/HF	0.29 ± 0.06	0.23 ± 0.03	0.32 ± 0.06
<i>Non-linear Methods</i>			
DFA	1.12 ± 0.01	1.18 ± 0.01 *	1.12 ± 0.03 †
Entropy	1.32 ± 0.06	0.98 ± 0.08 *	1.08 ± 0.15

Heart rate variability was examined using linear (time and frequency domain) and non-linear (DFA and Entropy) methods. ECG recording during 4 hours (2 hours each day), in conscious animals, provided the data for the analysis of heart rate variability using customized computer software, CardioSeries for linear methods and JBio for non-linear methods. RR = RR interval, SDNN = standard deviation of normal-to-normal RR intervals, RMSSD, square root of the mean of the squares of differences between adjacent RR intervals; LF and HF = power of the RR spectra in low- and high-frequency bands, DFA = stochastically detrended fluctuation analysis. CONTROL= fictitious ligation of the left coronary artery. The asterisk indicates a statistically significant difference between CHF and CONTROL, *p<0.05; the dagger indicates a statistically significant difference between CHF+MSC and CHF, †p<0.05. Data are expressed as mean ± standard error of mean (SEM).

TABLE 3: Arterial pressure variability from control (CONTROL) and chronic heart failure (CHF) rats treated or not with mesenchymal stem cells (MSC).

	CONTROL (n = 9)	CHF (n = 12)	CHF + MSC (n = 8)
MAP (mmHg)	107 ± 4.5	88 ± 2.8*	94 ± 2*
SAP (mmHg)	121 ± 5.1	100 ± 2.4*	104 ± 2.1*
SDNN (mmHg)	4.6 ± 0.2	3.3 ± 0.1*	3.5 ± 0.2*
LF (mmHg²)	4.3 ± 0.9	1.0 ± 0.2*	1.5 ± 0.3*

Arterial pressure variability was examined in time (SDNN) and frequency (LF) domain. The AP recording of 1 hour, in conscious animals, was used for AP variability analysis, using a customized computer software CardioSeries. MAP and SAP = mean and systolic arterial pressure, respectively, SDNN = standard deviation of normal-to-normal intervals between successive SAP, LF = power of the SAP spectra in low-frequency band. CONTROL = fictitious ligation of the left coronary artery. The asterisk indicates a statistically significant difference between CHF and CONTROL, *p<0.05. Data are expressed as mean ± standard error of mean (SEM)