



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

**ESCOLA DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**EFEITOS DO TRANSPLANTE AUTÓLOGO COMBINADO DE CÉLULAS
TRONCO MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA E MIOBLASTOS
ESQUÉTICOS NA MIOCARDIOPATIA INDUZIDA PELA DOXORRUBICINA**

Cristiane Dias

CURITIBA

2015

Cristiane Dias

**EFEITOS DO TRANSPLANTE AUTÓLOGO COMBINADO DE CÉLULAS
TRONCO MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA E MIOBLASTOS
ESQUÉTICOS NA MIOCARDIOPATIA INDUZIDA PELA DOXORRUBICINA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde, da Pontifícia Universidade
Católica do Paraná, como requisito para obtenção do
título de Mestre.

Orientador: Dr. Luiz Cesar Guarita Souza

**Curitiba
2015**

Agradecimentos

À Deus, que se mostrou criador, que foi criativo. Seu fôlego de vida em mim me foi sustento e me deu coragem para questionar realidades e propor sempre um novo mundo de possibilidades.

Ao meu orientador, Dr Luiz Cesar Guarita Souza, pela sua disponibilidade e pelo acompanhamento exercido durante a execução deste trabalho.

À minha família, por sua capacidade de acreditar e investir em mim.

Ao meu chefe, Dr José Carlos Moura Jorge que me incentivou à fazer este mestrado.

Ao Dr Júlio Francisco por ter me ajudado neste trabalho.

	Pag.
LISTA DE ABREVIATURAS.....	
LISTA DE TABELAS.....	
LISTA DE FIGURAS.....	
LISTAS DE GRÁFICOS.....	
RESUMO.....	
ABSTRACT.....	
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 JUSTIFICATIVA.....	4
3 OBJETIVOS.....	6
3.1 Objetivo geral.....	7
3.2 Objetivos específicos.....	7
4. REVISÃO DA LITERATURA.....	9
4.1 Doxorubicina.....	11
4.1.1 Principais características.....	11
4.1.2 Aplicações clínicas.....	13
4.1.3 Mecanismo de Ação.....	13
4.1.4 Morfologia cardíaca e alterações funcionais.....	14
4.1.5 Alterações histopatológicas.....	14
4.1.6 Mecanismos celulares da cardiotoxicidade crônica.....	15
4.1.7 Cardiotoxicidade: Incidência.....	17
4.1.8 Contra-indicações em humanos.....	19
4.1.9 Interações com outras terapias.....	19
4.2 Insuficiência cardíaca.....	20
4.2.1 Definição.....	20
4.2.2 Epidemiologia.....	20
4.2.3 Confirmando a presença e a etiologia estabelecida da insuficiência cardíaca descompensada aguda.....	21

4.2.4	Tratamento da insuficiência cardíaca.....	22
4.2.4.1	Tratamento Farmacológico.....	22
4.2.4.2	Tratamento Cirúrgico.....	27
4.3	Terapia Celular na Cardiologia.....	29
4.3.1	Células-Tronco Mononucleares.....	31
4.3.2	Células-Tronco da Medula Óssea.....	33
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	40
5.1	Amostra.....	41
5.2	Cuidados Gerais para os Animais.....	41
5.2.1	Condições do Biotério.....	41
5.2.2	Anestesia.....	42
5.2.3	Indução da cardiomiopatia – aplicação da doxorrubicina.....	42
5.2.4	Obtenção e Isolamento das células tronco e mioblasto esquético.....	43
5.2.5	Co-cultura.....	43
5.2.6	Sistema de Ventilação Mecânica.....	44
5.2.7	O transplante de Células co-cultivadas.....	45
5.2.8	Analgesia pós – operatória.....	46
5.2.9	Exames Ecocardiográficos.....	46
5.2.10	Eutanásia.....	47
5.2.11	Avaliação Histopatológica Pós-Transplante.....	48
6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
7	RESULTADOS.....	55
8	DISCUSSÃO.....	69
9	CONCLUSÕES.....	77
10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	79

AGL -	thiolase 3-acetil-coenzima A de cadeia longa
BB –	betabloqueadores
BNP -	peptídeo natriurético tipo B
BRA -	bloqueadores dos receptores da angiotensina II
CDI –	cardioversor desfibrilador implantável
CFU-F -	unidade formadora de colônia-fibroblasto
CTMs -	células-tronco mesenquimais
DHA –	ácido docosaexaenoico
DL50 -	dose letal mediana
DNA –	ácido desoxirribonucleico
DPOC –	doença pulmonar obstrutiva crônica
DVP -	doença vascular periférica
EPA -	ácido eicosapentaenoico
FEVE –	Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo
G-CSF -	fator de estimulação de colônia de granulócitos
GM-CSF -	fator de estimulação macrófago-granulócito
GMPc –	monofosfato cíclico de guanosina
IAM –	infarto agudo do miocárdio
IC –	insuficiência cardíaca
IECA -	Inibidores da enzima conversora da angiotensina
IR -	insuficiência renal
NADH-D –	nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase
Complexo QRS –	corresponde à despolarização ventricular

RNA –	ácido ribonucleico
RVP -	resistência vascular pulmonar
SCF -	fator de célula tronco
TCP -	teste cardiopulmonar
VDFVE -	volume diastólico final do ventrículo esquerdo
VSFVE -	volume sistólico final do ventrículo esquerdo

	Pag.
Tabela 1. Recomendações para IECA e BRA na Insuficiência Cardíaca Crônica Sistólica Incluindo Etiologia Chagásica.....	23
Tabela 2. Parâmetro do VD, análise intergrupo e intragrupo.....	57
Tabela 3. Parâmetro do VS, análise intergrupo e intragrupo.....	58
Tabela 4. Parâmetro do FE, análise intergrupo e intragrupo.....	60
Tabela 5. Parâmetro do VD, análise intergrupos.....	61
Tabela 6. Parâmetro do VS, análise intergrupos.....	62
Tabela 7. Parâmetro do FE, análise intergrupos.....	62

	Pag.
Figura 1. Estrutura química do Cloridrato de Doxorrubicina.....	11
Figura 2. Intubação orotraqueal.....	45
Figura 3. Microscópio óptico Olympus® RX 50	52

	Pag.
Gráfico 1. Parâmetro do VD, análise intragrupo.....	57
Gráfico 2. Parâmetro do VS, análise intragrupo.....	59
Gráfico 3 Parâmetro do FE, análise intragrupo.....	60

Resumo

A terapia celular vem sendo investigada como uma possível opção terapêutica em pacientes com doenças cardiovasculares. A doxorrubicina é um dos agentes antineoplásicos mais utilizados no tratamento de neoplasias, entretanto pode induzir uma cardiomiopatia irreversível.

Objetivo: Avaliar o efeito funcional e anátomo-patológico do transplante combinado de células tronco mesenquimais e mioblastos esqueléticos na miocardiopatia induzida pela doxorrubicina. **Métodos:** Ratos Wistar machos foram submetidos à injeção intraperitoneal de doxorrubicina na dose total de 2mg/Kg/peso. Após duas semanas, os animais foram randomizados e distribuídos em dois grupos: co cultivo (n=10) que recebeu células-tronco mesenquimais e mioblastos esqueléticos co-cultivadas e o grupo controle (n=10). Os animais foram avaliados por ecocardiografia no período pré e 30 dias após o transplante, analisando-se os parâmetros de fração de ejeção (FE %), volumes diastólico e sistólico finais do ventrículo esquerdo (VD,VS/ml). As análises histológicas foram realizadas com colorações de HE, Sirius red e imunohistoquímica Myo D1 e fator VIII. **Resultados:** Na análise intragrupo, no período entre o pré transplante e 30 dias após, no parâmetro do volume diastólico foi identificado um aumento do seus valores no grupo controle ($p<0.001$) e uma diminuição no grupo tratado, entretanto sem significância estatística ($p=0.232$). No parâmetro volume sistólico foi identificado um acréscimo dos valores tanto no grupo controle como no grupo co cultivo ($p<0.001$ e $p=0.002$, respectivamente). Com relação à fração de ejeção foi visualizado uma diminuição dos valores em ambos os grupos, controle e co cultivo ($p=0.007$ e $p=0.002$ respectivamente). Na análise intergrupos, no período pré transplante houve diferença significativa entre os dois grupos quanto à fração de ejeção, volume diastólico e volume sistólico nos valores ecocardiográficos, desta forma foi usada análise estatística com covariância (Ancova). Após 30 dias não houve diferença entre os grupos nos três parâmetros analisados. À análise histopatológica foram identificadas áreas de fibroses intersticiais, núcleos picnóticos e vacuolização no grupo controle. No grupo estudo foram identificadas, à

imunohistoquímica, presença de células miooblásticas e neoangiogênese no local do transplante. **Conclusão:** Não foi visualizado melhora funcional após o transplante combinado de células tronco mesenquimais a mioblastos esqueléticos nos animais com cardiomiopatia induzida pela doxorrubicina, entretanto foram identificados neoformação angiomuscular no grupo transplantado.

Palavras-chave: Doxorrubicina. Miocardiopatia. Regeneração cardíaca.

Abstract

Cell therapy has been investigated as a possible therapeutic option in patients with cardiovascular diseases . Doxorubicin is one of the most widely used antineoplastic agents in the treatment of neoplasia, but can induce an irreversible cardiomyopathy. **Objective:** To evaluate the functional and pathological effect of combined transplantation of mesenchymal stem cells and skeletal myoblasts in doxorubicin-induced cardiomyopathy. **Methods:** Male Wistar rats underwent intraperitoneal injection of doxorubicin at a total dose of 2mg/Kg/weight. After two weeks, the animals were randomly distributed into two groups: treated (n = 10) that received cells co - cultured mesenchymal stem cells and skeletal myoblasts and the control group (n = 10). The animals were assessed by echocardiography in the pre period prescribed and 30 days after transplantation by analyzing the parameters of ejection fraction, end diastolic and systolic volumes of the left ventricle (ml). Histological analyzes were performed with HE staining, Sirius red and immunohistochemistry Myan D1 and factor VIII. **Results:** In the intragroup analysis, the period between the pre and 30 days after transplantation , the diastolic volume parameter was identified an increase in their values in the control group ($p < 0.001$) and a decrease of the same in the treated group, although without significance statistics ($p = 0.232$). Systolic volume an increase in parameter values was identified in both the control group and the treated ($p < 0.001$ and $p = 0.002$, respectively). Regarding the ejection fraction was visualized decreased values in both group , control and treated ($p = 0.007$ and $p = 0.002$ respectively). In the intergroup analysis, in the pre transplant there was no significant difference between the two groups regarding ejection fraction, diastolic volume and systolic volume on echocardiographic values in this way was used in statistical analysis covariance (ANCOVA). After 30 days there was no difference between groups in the three parameters. The histologic analysis of interstitial fibrosis areas, pyknotic nucleus and vacuolization in the control group were identified. In the study group were identified at immunohistochemistry presence of myoblasts and neoangiogenesis on the site of transplantation.

Conclusion: There was not visualized functional improvement after combined transplantation of mesenchymal stem cells to skeletal myoblasts in animals with doxorubicin-induced cardiomyopathy, however angiomuscular neoformation were identified in the transplanted group.

Keywords: Doxorubicin. Cardiomyopathy. Cardiac regeneration.

1 Introdução

As doenças cardiovasculares, constituem-se nas principais causas de morbi-mortalidade no mundo. A insuficiência cardíaca (IC) é uma das principais patologias envolvendo as doenças cardiovasculares no mundo atual. Dados do Ministério da Saúde indicam que anualmente casos de IC têm aumentado significativamente, causando um grande impacto sócio-econômico no país.^{1,2}

As terapêuticas disponíveis para o tratamento da insuficiência cardíaca ainda são paliativas e limitadas, evidenciando a necessidade de desenvolvimento de novas modalidades. Apesar de alguns autores sugerirem que haja divisão mitótica do coração, a grande maioria dos cardiomiócitos não tem a capacidade de regeneração após o infarto do miocárdio e quando isto ocorre existe uma deterioração da atividade contrátil, e sendo a área do infarto extensa pode ocorrer o remodelamento ventricular.³

Resultados promissores de estudos experimentais recentes indicaram a possibilidade de regeneração miocárdica por meio de transplante de células como alternativa para o tratamento desta enfermidade.⁴

A Engenharia de Tecidos apresenta potencial de uma nova terapia na área médica, possibilitando um avanço nos próximos anos, oferecendo esperanças aos pacientes através da medicina regenerativa. As opções terapêuticas atuais propostas, tanto clínicas como cirúrgicas, têm como principal objetivo tratar apenas as conseqüências do infarto do miocárdio e

não as causas básicas da doença, que é a perda da célula contrátil, os cardiomiócitos.⁵

O implante de células para o tratamento de doenças cardiovasculares encontra-se sob investigação em vários centros no mundo. Várias linhagens celulares têm sido investigadas em modelos experimentais⁶ e as primeiras séries de casos em humanos já foram descritas.^{7,8}

Dois tipos de células têm sido utilizadas, tanto experimentalmente como em ensaios clínicos: a musculatura esquelética (mioblastos) que origina células com origem contrátil e a medula óssea (células-tronco adultas) que originam novos vasos sanguíneos em modelos de isquemia e infarto do miocárdio.⁸

A associação dos dois tipos celulares, o co-cultivo de mioblastos esqueléticos e células tronco mesenquimais da medula óssea já foi realizada em um modelo de infarto do miocárdio com resultados favoráveis, propiciando uma regeneração angiomuscular.⁹

Esta mesma associação foi realizada em um modelo de cardiomiopatia chagásica, com resultados favoráveis e melhora da fração de ejeção do ventrículo esquerdo sugerindo efeito anti-remodelamento ventricular, demonstrado através da anatomia patológica a identificação da regeneração angiomuscular.⁵

Entretanto, existem outros tipos de cardiomiopatias como a dilatada e a induzida por drogas, como por exemplo pela doxorubicina, que não apresentam tratamentos efetivos, pois desenvolvem uma cardiomiopatia com predominância de fibrose miocárdica.⁵

2 Justificativa

Baseado no fato de que o co-cultivo de células tronco mesenquimais da medula óssea e mioblastos esqueléticos apresentaram resultados favoráveis em modelos de IAM e miocardiopatia chagásica, este mesmo tratamento na cardiomiopatia crônica induzida pela doxorrubicina pode apresentar os mesmos resultados ?

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

- Avaliar o efeito funcional e anátomo-patológico do transplante combinado de mioblastos esqueléticos e células-tronco mesenquimais co-cultivadas na miocardiopatia dilatada induzida pela doxorrubicina.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar a presença de células musculares esqueléticas e novos vasos sanguíneos em animais submetidos ao co-cultivo.
- Comparar os volumes diastólico e sistólico finais e fração de ejeção do ventrículo esquerdo nos animais que receberam as células do co-cultivo com o seu grupo controle, entre o período pré e 30 dias após o transplante.

4 Revisão da Literatura

A cardiomiopatia pode ser induzida através do efeito tóxico de certas drogas que interferem na organização celular do músculo cardíaco. Muitas destas drogas são utilizadas como terapêutica para doenças diversas, como: furazolidina, etanol, antraciclinas (daunorubicina e doxorubicina), entre outras.¹⁰

A doxorubicina (pertencente ao grupo das antraciclínicas) é conhecida comercialmente como Adriblastina®RD. É um antibiótico antitumoral antracíclico isolado de cultura de *Streptomyces peucetius* var. *caesius*, utilizado com êxito para produzir regressão de várias neoplasias tais como carcinoma da mama, pulmão, bexiga, tireóide e carcinoma ovariano; sarcomas ósseos e dos tecidos moles; linfomas e certas leucemias. Possui propriedades citotóxicas sobre células malignas por causar danos na síntese de DNA e na sua atividade sobre a membrana lipídica celular. Deve-se dedicar especial atenção à toxicidade cardíaca desta droga. Esta toxicidade miocárdica é irreversível, e manifesta-se como insuficiência cardíaca. Estima-se que a probabilidade de prejuízo da função miocárdica varie de 1 a 20%, dependendo da dose acumulativa total de doxorubicina. Entretanto, outros autores elevam estes valores de 1 a 30% da cardiotoxicidade.^{10,11}

Estudos realizados com 120 pacientes portadores de câncer, tratados com antraciclina, relataram que com apenas três meses de tratamento ocorreu uma progressiva deteriorização da função cardíaca, continuando esta disfunção anos após o término do tratamento. Estimou-se

que de 59% dos pacientes expostos ao tratamento, em 25% observou-se redução na fração de ejeção do ventrículo esquerdo 3 anos após o tratamento com uma dose acumulativa de 850 – 1.000mg/m² e 20% dos pacientes apresentaram insuficiência cardíaca congestiva. Também provou-se que estes pacientes não recuperam espontaneamente estes danos, tendo que continuar uma terapia paralela.¹²

Pesquisadores têm procurado modelos animais que apresentam síndromes cardiotóxicas similares as dos seres humanos. O coelho e o macaco são os que têm apresentado melhor similaridade.^{13,14,11} Análises histológicas experimentais em coelhos indicam que dosagens maiores que 100mg/m² causam cardiomiopatia e manifestam toxicidade pela degeneração miofibrilar, necrose e fibrose miocárdica.^{10,15} Comparando drogas neoplásicas comprova-se que a toxicidade crônica da doxorrubicina causa além de cardiotoxicidade, perda de peso e nefropatia mais acentuada que em outras drogas.¹⁶

É neste contexto que várias terapias estão sendo estudadas na tentativa de recuperação do tecido cardíaco. Uma das perspectivas é o transplante de células tronco, devido à esta técnica reparar o tecido, implantando células pluripotentes, as quais têm potencial de mutiplicação e diferenciação em células contráteis e células endoteliais na cicatriz do infarto, sugerindo uma angiogênese e uma capacidade de regeneração tecidual.⁽¹⁷⁻²⁰⁾

4.1 Doxorubicina

4.1.1 Principais características

Doxorrubicina é um antibiótico do grupo da antraciclina (figura 1) que foi primeiramente isolado em 1969 por fermentação anaeróbia da bactéria *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. Agora também pode ser sintetizada quimicamente de outra antraciclina, a daunorubicina²¹

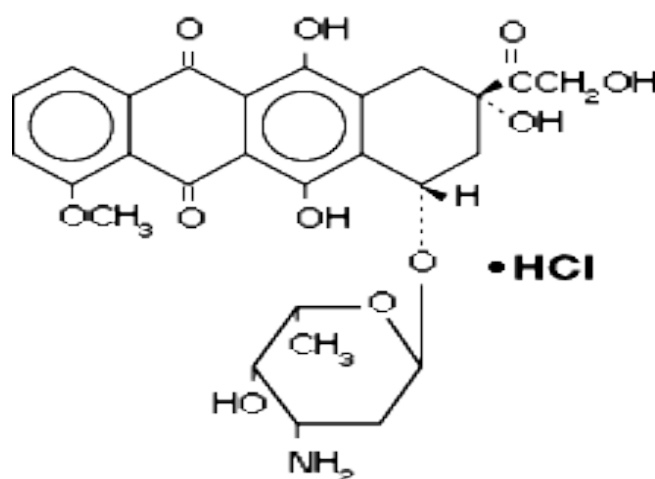


Figura 1. Estrutura química do Cloridrato de Doxorubicina.

O anel da antraciclina é lipolítico, mas a extremidade saturada do sistema de anéis contém grande quantidade de grupos hidroxila, juntamente com aminoaçúcares, formando um centro hidrofílico. Devido a esta propriedade, a molécula é anfotérica, apresentando características ácidas no

grupo fenólico do anel e características básicas no grupo dos aminoácidos. Com isto sua passagem na membrana plasmática é facilitada e sua permanência no corpo é relativamente longa.²² Além disso, apresenta um anel de quinona e de hidroquinona em anéis adjacentes, que lhes permite funcionar como aceptor e doador de elétrons. A importância principal é dada ao anel de quinona, porque é um potente gerador de radicais livres. A redução por um elétron deste anel leva a formação de radicais relativamente estáveis, chamados radicais livres de semiquinonas, ativados pela enzima mitocondrial, NADH desidrogenase.²³ As reações intramoleculares de transferências de elétrons intermediários das semiquinonas resultam na produção de outros radicais e, por conseguinte, de compostos alquilantes potentes. O fator proposto, responsável por esta toxicidade inclui O^{2-} , H_2O_2 , ferro, OH e cálcio.²⁴

A produção de radicais livres altamente reativos e tóxicos é significativamente estimulada pela interação da doxorubicina com o ferro.²⁵

Estes radicais de quinona e semiquinonas são relativamente estáveis em condições anaeróbicas, mas sobre condições aeróbicas há desemparelhamento de elétrons, doando oxigênio, havendo a formação de radicais superóxidos e radicais hidroxilas.^{26,27,28,29} A redução de oxigênio para formação de superóxido é uma reação regenerativa, juntamente com a molécula de doxorubicina. Isto gera uma sequência de reações, formando um ciclo redox, que causa muitos danos às células expostas.²²

4.1.2 Aplicações clínicas

A doxorubicina é um dos mais potentes agentes anticâncer; pode ser prescrita isolada ou em associação com outras drogas. É usada em vários tipos de cancer, incluindo ginecológico (mama, endométrio, ovário), urogenital (bexiga, testículo), endócrino (tireóide, pâncreas), gastrointestinal (estômago), e pulmão. É também efetivo em sarcomas (neuroblastoma, sarcoma de Ewing, osteosarcoma, rabdomiosarcoma), linfocítico agudo e leucemia mielóide, linfoma Hodgkin's e não-Hodgkin's, e tumor Wilms.²¹

Além disto, a aplicação clínica da doxorubicina também é limitada pela resistência de certas células cancerosas a esta droga. Em anos recentes, esforços consideráveis têm sido feitos para aumentar a especificidade destes agentes antineoplásicos através da liberação no alvo. Vários grupos têm investigado o potencial de Tf como um transportador para a doxorubicina por conjugação das duas moléculas através da formação de uma base de Schiff, e uma diferença significativa entre a eficácia da doxorubicina livre e a conjugado de Tf-doxorubicina.³⁰

4.1.3 Mecanismo de Ação

A doxorubicina atua por inserção das moléculas entre bases de DNA e ligação com as cadeias de açúcar-fosfato, assim bloqueando a síntese de DNA e RNA. A inserção da doxorubicina no DNA interfere com a ação da

topoisomerase II, causando quebras irreparáveis na dupla hélice. A doxorrubicina também se liga às membranas celulares, o que interfere com os mecanismos de transporte de ligação do fosfatidilinositol.²¹

4.1.4 Morfologia cardíaca e alterações funcionais

A morfologia cardíaca e desarranjos funcionais da cardiomiopatia induzida pela doxorrubicina são similares àsquelas da cardiomiopatia dilatada. Todas as quatro câmaras cardíacas podem ser dilatadas, embora dilatações severas dos ventrículos e átrios sejam menos comuns que em cardiomiopatias dilatadas isquêmicas e não isquêmicas. A fração de ejeção ventricular e a função de contratilidade é reduzida. Há uma disfunção diastólica concomitante. Por causa da mudança insignificante na espessura da parede, o estresse da parede é maior. Trombos murais também são detectados em alguns pacientes.³¹

4.1.5 Alterações histopatológicas

Na cardiomiopatia induzida pela doxorrubicina, há áreas de fibrose desiguais do interstício do miocárdio e cardiomiócitos vacuolados espalhados (células Adria). Células Adria são vistas nas áreas de adjacência da fibrose. As áreas de fibrose são geralmente muito difundidas e áreas de

danos agudos nos miócitos não são frequentes. Há proliferação de fibroblastos e infiltração de histiócitos nas áreas de miocardite curadas.³¹

A perda parcial ou total de miofibrilas e degeneração vacuolar dos miócitos são características essenciais da cardiotoxicidade da doxorrubicina. Com perda de miofilamentos, os restos de discos Z são vistos. Há distensão do retículo sarcoplasmático e dos túbulos T. Os vacúolos dos miócitos coalescem e formar grandes espaços ligadas à membrana. A desorganização nuclear da cromatina e substituição de cromatina por filamentos claros também são características de cardiomiopatia induzida pela doxorrubicina.³¹

4.1.6 Mecanismos celulares da cardiotoxicidade crônica

A cardiomiopatia induzida pela doxorrubicina é uma doença letal. Quando a insuficiência cardíaca congestiva se desenvolve, a mortalidade é de aproximadamente 50%. Extensa pesquisa tem sido feita para entender o mecanismo e fisiopatologia da cardiomiopatia induzida pela doxorrubicina e considerável conhecimento e experiência tem sido adquirida e também para descobrir tratamentos preventivos. Infelizmente, não há tratamento eficaz para a cardiomiopatia induzida pela doxorrubicina.³¹

Quatro possíveis mecanismos foram apresentados para a cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina: a) estresse oxidativo decorrente do ciclo de oxidação da droga; b) deterioração mitocondrial, e

conseqüente aumento de oferta de energia ao miocárdio, c) interrupção da homeostase mitocondrial de Ca^{2+} e Ca^{2+} fluxos no retículo sarcoplasmático e d) o distúrbio da expressão do gene mitocondrial. Os efeitos colaterais da doxorrubicina são cumulativos (por meio de sua interação com a cardiolipina na membrana interna mitocondrial), dose-dependente e irreversível. Eles incluem cardiomiopatia e insuficiência cardíaca subsequente (HF). O risco de cardiotoxicidade é maior nos indivíduos com história de cardiomiopatia, irradiação mediastinal ou doença cardíaca.³¹

A toxicidade da doxorrubicina tem sido demonstrada pela ruptura dos miócitos, por lesão dos microtúbulos, vacuolização, ruptura do sarcômero, dilatação do retículo sarcoplasmático, perda de microfibrilas e destruição das mitocôndrias. O último é particularmente importante, dado ao grande número de mitocôndrias no tecido cardíaco. Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a cardiotoxicidade de doxorrubicina, mas o mecanismo exato e os seus efeitos sobre o metabolismo permaneceu desconhecido durante muitos anos. As alterações bioquímicas e fisiológicas favorecem a idéia de que a doxorrubicina promove a formação de espécies reativas de oxigênio, o que leva à oxidação de proteínas e ácidos nucleicos e da peroxidação lipídica, alterando assim a integridade da membrana celular. As mitocôndrias são os principais alvos da cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina. Espécies reativas de oxigênio são formadas pela associação de desidrogenase de dinucleótido de nicotinamida-adenina exógena (NADH-D) com o complexo I da cadeia de transporte de elétrons

mitocondrial. NADH-D transfere elétrons livres à doxorubicina, os quais são de semiquinonas auto oxidativos para produzir espécies reativas de oxigênio. O tecido cardíaco tem níveis mais baixos de enzimas antioxidantes do que outros tecidos e é, por conseguinte, particularmente susceptível à espécies reativas de oxigênio. O estresse oxidativo pode resultar na transição de permeabilidade mitocondrial, que tem sido implicado na disfunção mitocondrial e celular induzida pela doxorubicina. Pensa-se que a cardiotoxicidade de doxorubicina específica é devida ao fato de NADH-D ser encontrada apenas em mitocôndrias cardíacas.²¹

4.1.7 Cardiotoxicidade: Incidência

A cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina pode ser aguda, que ocorre dentro de 2-3 dias de sua administração. A incidência de cardiotoxicidade aguda é de cerca de 11%. As manifestações geralmente são, dor no peito, devido a miopericardite e / ou palpitações devido à taquicardia sinusal, taquicardia supraventricular paroxística não sustentada e extra-sístoles atriais e ventriculares. O eletrocardiograma pode revelar alterações ST-T inespecíficos e diminuição da amplitude dos complexos QRS. Os mecanismos destas alterações agudas não são claros, mas pode ser devido ao edema induzido pela doxorubicina no miocárdio, o qual é reversível. A falência ventricular esquerda aguda é uma manifestação rara

de cardiotoxicidade aguda, mas também é reversível com tratamentos adequados.³¹

A incidência da cardiotoxicidade crônica induzida pela doxorubicina é muito mais baixa, com uma incidência estimada de cerca de 1,7%. Em geral, é evidente nos 30 dias da administração da última dose, mas pode ocorrer após 6 - 10 anos após a sua administração. A incidência de cardiomiopatia induzida pela doxorubicina está essencialmente relacionada com a sua dose. É de cerca de 4% quando a dose de doxorubicina é 500-550 mg/m², de 18% quando a dose é de 551-600 mg/m² e 36%, quando a dose superior a 600 mg/m². Os outros fatores de risco são a terapia de combinação com outras drogas anti-tumorais cardiotóxicas e radioterapia mediastinal. Indivíduos muito jovens e muito velhos são mais propensos a desenvolver esta complicação.³¹

Histórico de doença cardiovascular, como hipertensão e fração de ejeção reduzida antes da terapia também são fatores de risco para desenvolver esta complicação. O prognóstico dos pacientes que desenvolvem insuficiência cardíaca congestiva é baixo (50% de mortalidade em 1 ano).³¹

4.1.8 Contra-indicações em humanos

A doxorubicina é frequentemente contra-indicada em casos de hipersensibilidade à droga, gravidez, lactação, radioterapia, insuficiência cardíaca e mielossupressão.²¹

4.1.9 Interações com outras terapias

Administrando a doxorubicina, juntamente com outras substâncias conhecidamente cardiotóxicas ou com atividade cardíaca, tal como bloqueadores de canais de cálcio, pode aumentar o risco de cardiotoxicidade. Também pode reforçar a toxicidade de outros antineoplásicos e da radioterapia.

Os níveis plasmáticos de doxorubicina podem aumentar quando utilizado com ciclosporina A (o que também aumenta o risco de neurotoxicidade), verapamil, paclitaxel e outros inibidores da glicoproteína-P. Interações com estreptozocina, fenobarbital, fenitoína e varfarina.^{31,21}

4.2. Insuficiência cardíaca

4.2.1 Definição

A insuficiência cardíaca é frequentemente a consequência da perda de miócitos cardíacos após dano, como o infarto do miocárdio. Pacientes hospitalizados com um episódio índice de insuficiência cardíaca têm um prognóstico tão baixo como pacientes com neoplasias comuns (Stewart et al, 2001). Com a exceção do transplante cardíaco e implante de dispositivos de assistência ventricular mecânica, as terapias atuais não resolvem o problema central de diminuição do bombeamento devido ao decréscimo dos miócitos cardíacos. Assim, há um interesse enorme na regeneração cardíaca.³²

4.2.2 Epidemiologia

A prevalência de insuficiência cardíaca está aumentando em todo o mundo. Há uma variedade de razões para isso, incluindo o envelhecimento da população, aumento da sobrevivência em pacientes após infarto do miocárdio e com outras doenças cardiovasculares e falta de tratamento adequado dos fatores de risco, como hipertensão e diabetes. Nos países em desenvolvimento, a expectativa de vida mais longa combinada com um grande aumento nos fatores de risco cardiovasculares ajudaram a conduzir a

pandemia da insuficiência cardíaca. Paradoxalmente, o aumento da sobrevida dos pacientes com insuficiência cardíaca crônica também contribui para o aumento da prevalência da doença. Como consequência do crescimento mundial considerável da população com insuficiência cardíaca, as hospitalizações por insuficiência cardíaca descompensada aguda têm aumentado, durante muitos anos.³³

4.2.3 Confirmando a presença e a etiologia estabelecida da insuficiência cardíaca descompensada aguda

Embora o diagnóstico da insuficiência cardíaca descompensada aguda, seja baseado predominantemente na história e exame (complementado por testes de laboratório padrão, radiografia de tórax e eletrocardiograma), o diagnóstico não é sempre aparente. Biomarcadores são extremamente úteis para decidir se pacientes dispnéicos estão sofrendo de insuficiência cardíaca ou alguma outra condição.³³

O nível do peptídeo natriurético tipo B (BNP) no sangue dos pacientes auxilia a determinar se a insuficiência cardíaca está presente. Nos pacientes com BNP <100 pg/ml a insuficiência cardíaca não está presente, enquanto que a insuficiência cardíaca é provável naqueles com níveis > 500 pg/ml.³³

4.2.4 Tratamento da insuficiência cardíaca

4.2.4.1 Tratamento Farmacológico

- Betabloqueadores (BB)

Os BB associados à IECA ou BRA determinam benefícios clínicos na mortalidade global, na morte por IC e na morte súbita, além de melhora dos sintomas e redução de reinternação por IC.³⁴

Embora o benefício dos BB em pacientes assintomáticos na redução da mortalidade global e cardiovascular esteja comprovado somente nos pacientes com disfunção ventricular pós-infarto do miocárdio, estes têm sido utilizados nos pacientes com cardiomiopatia dilatada, isquêmica e miocardite, com objetivo de redução da progressão da disfunção ventricular, efeito de remodelagem reversa e redução de morte súbita, e, nos pacientes com fibrilação atrial crônica, para o controle da resposta ventricular.³⁴

- Inibidores da Enzima Conversora da Angiotensina e Bloqueadores dos Receptores da Angiotensina II

As indicações de IECA e BRA estão especificadas na Tabela 1.³⁴

Tabela 1. Recomendações para IECA e BRA na Insuficiência Cardíaca Crônica Sistólica Incluindo Etiologia Chagásica

Classe de Recomendação	Indicação	Nível de Evidência
I	IECA para disfunção assintomática e sintomática de VE BRA na disfunção sistólica em pacientes intolerantes a IECA exceto por insuficiência renal	A
Ila	Adicionar BRA em pacientes que persistam sintomáticos a despeito do uso da terapia otimizada (IECA, BB)	B
III	Adicionar BRA de forma rotineira em pacientes em uso da terapia otimizada	A

IECA significa inibidor de enzima de conversão; BB, betabloqueador; BRA, bloqueador do receptor da angiotensina

- Antagonistas da Aldosterona

Entre os bloqueadores de aldosterona, espironolactona e eplerenone, somente a espironolactona está disponível no Brasil. Em modelos experimentais, podem ter diferentes efeitos na mediação de redução de apoptose de miócito por hormônio, questionando possível efeito da classe. Em virtude dos efeitos mais seletivos, o eplerenone determina menor incidência de ginecomastia.³⁴

- Diuréticos

Na III Diretriz de IC crônica, havia sugestão de que doses elevadas de diuréticos aumentariam a mortalidade. Embora planejado para IC descompensada, o estudo demonstrou que altas doses de diuréticos foram

associadas à tendência de maior redução de sintoma sem diferença na função renal. Entretanto, maior perda de peso de líquidos e melhora da falta de ar foram balanceadas por maior proporção de pacientes com piora de função renal (23% no grupo dose alta *versus* 14% no grupo dose baixa), o que não afetou a mortalidade. Um número menor de pacientes no grupo dose alta sofreu eventos adversos sérios.³⁴

- Hidralazina, Nitrato e Digital

Além da indicação para pacientes com piora da função renal, para aqueles que não estão evoluindo bem na vigência do tratamento medicamentoso otimizado ou que, em avaliação, documente-se que persistem com sinais de resistência periférica elevada, a hidralazina e o nitrato devem ser considerados como uma opção terapêutica para ser empregada em associação ao tratamento usual.³⁴

- Anticoagulantes e Antiagregantes plaquetários

Para indicação de medicações que tenham como objetivo diminuir a incidência de fenômenos tromboembólicos na insuficiência cardíaca.³⁴

- Antiarrítmicos

Os BB são os fármacos de maior impacto na redução da morte súbita arritmica em pacientes com IC, quer seja terapêutica combinada com IECA/BRA ou como monoterapia. Também têm indicação na terapia adjuvante ao cardiodesfibrilador implantável, aumentando a sua eficácia na

redução da morte súbita. A amiodarona não apresenta benefício na prevenção primária quando comparada ao placebo, independente da etiologia da IC, apresentando aumento da mortalidade no subgrupo isquêmico. A amiodarona, quando associada aos BB, aumenta a eficácia do CDI por reduzir eventos de taquicardia ventricular e choques inapropriados.³⁴

- Bloqueadores de cálcio

Os bloqueadores de cálcio têm uso restrito na IC.³⁴

- Ivabradina

A ivabradina inaugura uma nova classe terapêutica, pois é um inibidor específico e seletivo da corrente “If” do nódulo sinoatrial, modulando o influxo das correntes iônicas e determinando como consequência uma redução da frequência cardíaca, no repouso e no esforço.

As evidências recomendam associação da ivabradina à terapêutica-padrão, incluindo BB, com o objetivo de melhorar a função ventricular e reduzir o risco cardiovascular através da redução da combinação de morte cardiovascular e hospitalização por IC, redução do risco de IAM fatal e não fatal e da redução da mortalidade por IC.³⁴

- Ômega 3

Diversos estudos epidemiológicos têm sugerido que o consumo de doses elevadas de ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 (Ômega 3)

encontrados no óleo de peixe, rico em ácido eicosapentaenóico (EPA) e docosaexaenóico (DHA), pode reduzir a incidência e a mortalidade por IC.³⁴

- Uso de Inibidores da Fosfodiesterase 5

Os inibidores da fosfodiesterase 5 atuam reduzindo a degradação do GMPc, preservando o óxido nítrico na circulação, com isto levando à vasodilatação, o que pode ser benéfico no contexto da hipertensão pulmonar secundária à IC crônica. O sildenafil pode reduzir a hipertensão pulmonar em pacientes em avaliação para transplante cardíaco e também pode reduzir a pressão arterial após o transplante cardíaco.³⁴

- Moduladores do Metabolismo Enérgico Miocárdico

Dentre os agentes moduladores do metabolismo energético do miocárdio, a trimetazidina tem sido a mais estudada. A trimetazidina é um derivado da piperazina, usada como agente antianginoso, que promove a inibição seletiva de enzima envolvida na betaoxidação de AGL (thiolase 3-acetil-coenzima A de cadeia longa). A trimetazidina pode afetar o uso de substrato energético miocárdico ao inibir a fosforilação oxidativa, mudando assim a produção de energia de AGL para a oxidação da glicose.³⁴

4.2.4.2 Tratamento Cirúrgico

- Cirurgia da Valva Mitral

A cirurgia da válvula mitral (troca valvar ou plastia) em pacientes com disfunção ventricular esquerda e grave insuficiência valvar mitral pode aliviar os sintomas de IC em pacientes selecionados. O emprego da técnica percutânea para a inserção endovascular do “Mitral Clip” ainda é considerado experimental, sem qualquer evidência de impacto clínico significativo.³⁴

- Revascularização Miocárdica com Disfunção Isquêmica de Ventrículo Esquerdo e Remodelamento Cirúrgico do Ventrículo Esquerdo

Estudo de série de casos demonstrou que a cirurgia de revascularização miocárdica pode ser realizada com mortalidade de 3,7% em pacientes com IC isquêmica, Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo (FEVE) de 29% e músculo viável para melhora da FEVE. A cirurgia de revascularização miocárdica sem remodelamento cirúrgico em pacientes com IC e disfunção ventricular com músculo supostamente viável tem sido indicada na prática médica baseando-se principalmente nos resultados do atemporal *Coronary Artery Surgery Study* (CASS) com o objetivo de recuperar o músculo atordado ou hibernado. Vários métodos podem ser utilizados para avaliar o músculo viável.³⁴

- Transplante Cardíaco

Quando a IC chega à refratariedade terapêutica, o transplante cardíaco permanece sendo reconhecido como tratamento padrão. A sobrevida, no entanto, ainda é influenciada em curto prazo pela rejeição e infecção, e, a longo prazo, pela neoplasia e doença vascular do enxerto.³⁴

Alguns critérios de indicações e contraindicações têm sido modificados nos últimos anos, principalmente com relação à idade, consumo de oxigênio no teste cardiopulmonar (TCP), resistência vascular pulmonar (RVP), obesidade, câncer, diabetes mellitus, insuficiência renal (IR), pacientes sensibilizados, doença vascular periférica (DVP) e dependência de drogas.³⁴

- Dispositivo de Assistência Circulatória Mecânica

Também em nosso meio, o uso de dispositivos de assistência circulatória mecânica tem sido empregado no tratamento do choque cardiogênico e na manutenção da condição circulatória em pacientes com IC refratária ao tratamento medicamentoso.³⁴

As principais causas de inelegibilidade para transplante cardíaco nos estudos foram idade avançada, câncer, DPOC, recusa, hipertensão pulmonar, insuficiência renal, diabetes insulino dependente, obesidade, hepatite, painel elevado, doença vascular periférica e múltiplas comorbidades.³⁴

4.3 Terapia Celular na Cardiologia

A medicina vem sofrendo modificações nos últimos anos, devido à pesquisas promissoras que identificam linhagens celulares com potencialidade de diferenciação em diversos tipos celulares.⁶⁴

A principal proposta desta linha de pesquisa na cardiologia foi abordar a causa principal da disfunção, a perda de cardiomiócitos. Esta terapia está sendo empregada principalmente em casos de cardiomiopatias isquêmicas aguda e crônica, mas outras diferentes etiologias também foram estudadas como a cardiomiopatia dilatada decorrente da doença de Chagas.⁶⁴

A proposta foi utilizar diferentes células para reconstruir o tecido cardíaco e encontrar a que melhor se adapte a estas novas funções, tanto a de contração como a de desenvolver novos vasos para melhorar a perfusão sanguínea na área lesada.⁶⁴

As pesquisas com células foram inicialmente investigadas utilizando cardiomiócitos fetais para reparo da área infartada em modelo experimental.³⁵ Em seguida, outras pesquisas experimentais avaliaram os efeitos do transplante de cardiomiócitos fetais *versus* mioblastos esqueléticos (células satélites) bem como células-tronco com potencial cardiomiogênico.^{36,37,38,18,39,40,41,42,43} Há também estudos associando dois tipos celulares em co-cultivo de mioblastos esqueléticos e células-tronco mesenquimais para a regeneração angio-muscular.⁴⁴

Buscou-se então o conceito da célula ideal para transplante, tendo que apresentar a capacidade de diferenciar-se em músculo cardíaco ou/e em vasos sanguíneos; e adequando-se ao tipo celular proposto e a etiopatogenia da miocardiopatia.⁴⁵

As promissoras pesquisas com células-tronco mononucleares da medula óssea apontaram a possibilidade de promover a angiogênese em torno da cicatriz do infarto à fim de limitar o crescimento da área isquêmica. Os resultados demonstraram a indução de angiogênese, prevenindo o remodelamento e a falência cardíaca.⁶⁴

O tratamento com células-tronco mesenquimais *versus* mioblastos em cardiomiopatia isquêmica crônica em ratos, demonstrou miogênese e aumento da função ventricular em contraste com as células-tronco mesenquimais que demonstraram angiogênese e ausência de efeitos funcionais.⁴⁶

Pesquisas em cardiomiopatia não isquêmica foram realizadas através de indução por drogas, como o antineoplásico, cloridrato de doxorubicina em coelhos. Os pesquisadores obtiveram resultados satisfatórios no transplante de células-tronco mesenquimais, onde foi observado uma melhora funcional.⁴⁷

Na busca de aperfeiçoar tipos celulares para terapia, pesquisas correlacionando variadas funções de diversos tipos celulares, e até a utilização de dois tipos diferentes celulares em co-cultivo foram transplantadas: mioblastos esqueléticos e células-tronco mesenquimais.¹⁰ Os resultados com este modelo demonstram ser superiores funcionalmente

quando comparados com os mesmos tipos celulares transplantados isoladamente, superando as expectativas do ponto de vista histológico: regeneração angio-muscular. Este modelo foi estudado nas cardiomiopatias crônicas: isquêmica^{48,45} e dilatada chagásica.⁴⁷ Tais células são de fácil obtenção, autólogas e facilmente expandidas “*in vitro*”.¹⁰

4.3.1 Células-Tronco Mononucleares

- Origem

Durante o desenvolvimento embrionário, os diferentes tipos de células são determinados, dando origem a um organismo multicelular complexo. No período após o crescimento, as células podem limitar a sua capacidade proliferativa com certas restrições moduladas e sua característica específica permanece possivelmente fixada na expressão gênica. A proliferação celular ocorre, mas não mais com a eficiência e rapidez de um organismo embrionário ou fetal.⁶⁴

A maioria das células-tronco adultas mantém a mesma taxa de proliferação e caráter especializado, mesmo transferindo-a em um novo ambiente. Porém, as células especializadas podem retomar um potencial proliferativo, mas de forma limitada. Em um tecido adulto, surgem freqüentemente células diferenciadas devido a continua renovação celular, originárias de duas fontes: formar-se pela simples duplicação de células diferenciadas, que se dividem para dar outras células filhas do mesmo tipo;

ou elas podem ser geradas a partir de células-tronco relativamente indiferenciadas por um processo que envolve situações pouco conhecidas apresentando um direcionamento do seu fenótipo celular para um fenótipo semelhante ao tecido que sofreu injúria.⁶⁴

Estas células-tronco são encontradas na maioria dos órgãos, mas o local mais freqüente é o sangue da medula óssea, e dentre este a medula óssea da crista ilíaca é a região preferencial de coleta, devido ao volume maior de sangue e fácil acesso.⁶⁴

- Classificação

As células-tronco apresentam notada capacidade de originar tecidos a partir de sua forma indiferenciada. Estas células em seus sítios passam do estado quiescente, diferenciando-se em tipos celulares diversos quando necessário.⁶⁴

Existem dois tipos de células-tronco: as células-tronco embrionárias e as células-tronco adultas.

As células-tronco embrionárias originam da massa celular interior do blastocisto (do 4º ao 5º dia) nos estágios iniciais de desenvolvimento e apresentam capacidade de compor todos os tecidos, incluindo as células germinativas e tecido placentário, possuindo um grande potencial de transformação, consideradas totipotentes.⁶⁴

As células-tronco adultas são pluripotentes e surgem na fase tardia da embriogênese e do desenvolvimento fetal. Podem fornecer cópias idênticas delas mesmas por longo período de tempo ou podem também dar

origem a vários tipos celulares maduros que possuam características especializadas. Sua função é manter o estado de homeostase do organismo e dos tecidos, preservando as suas funções, através da reposição de células destruídas por lesões ou doenças.⁶⁴

As células-tronco oriundas do cordão umbilical são também consideradas adultas, pois são retiradas do recém nascido à termo; no entanto com o diferencial de uma capacidade proliferativa maior do que as células-tronco adultas de um indivíduo adulto, porém podem apresentar potencial de teratogenicidade.⁴⁹

4.3.2 Células-tronco da Medula Óssea

As células mononucleares da medula óssea apresentam linhagens celulares distintas tendo funções específicas: as células-tronco hematopoiéticas, células progenitoras endoteliais e células-tronco não hematopoiéticas.⁵⁰

As células-tronco hematopoiéticas de (1-2%) apresentam a função de dar origem a componentes do sangue. Já as células progenitoras endoteliais apresentam função de secretar diversos fatores de crescimento endotelial, promovendo angiogênese nos tecidos patológicos. As células-tronco não hematopoiéticas demonstram grande plasticidade e aderência nos frascos de cultivo e foram primeiramente descritas como células estromais, mas muito recentemente elas têm sido designadas como células-

tronco mesenquimais (<0,05%), porque é delas a capacidade para diferenciação para linhagens mesodermas: miogênicas, osteogênicas, condrogênicas e adipogênicas.⁵¹ Além disto, as células-tronco mesenquimais são capazes de diferenciar em células não mesenquimais incluindo células do fígado e células da glia. Muito recentemente, foram observadas células-tronco de medula óssea se diferenciando em células neuronais “*in vitro*”.^{52,53,54}

Diferenças importantes ocorrem entre as células-tronco mesenquimais e as hematopoiéticas. Embora estes dois tipos celulares são de fácil obtenção *in vitro* e seus isolamentos são realizados por gradiente de concentração, as células-tronco mesenquimais apresentam alta capacidade de aderência em superfícies plastificadas, o que ajuda na distinção destas células.⁵⁵

Uma das considerações que deve ser feita também é a propriedade que as células-tronco mesenquimais apresentam de se diferenciarem de meio para meio. Ela deve se diferenciar em fibroblasto se implantarmos em regiões fibróticas. Assim, revela-se a importância da implantação no microambiente. A aparente transdiferenciação das células-tronco deve ter dois caminhos: a célula funde com células do parênquima, ou então as células-tronco apresentam específica função de diferenciação.⁵⁶

As extensas pesquisas referentes às células-tronco oriundas da medula óssea projetam seus benefícios na regeneração tecidual, bem como na formação de novos vasos sanguíneos, o que motiva pesquisadores a

realizar exaustivas pesquisas experimentais e clínicas na tentativa de efetivar seu uso nas terapias de diversas doenças.⁵⁷

- Uso Terapêutico: Reparo do Miocárdio

Grande parte das pesquisas básicas e descobertas sobre células-tronco foram realizadas em modelos animais, principalmente em camundongos. Em 1867, o patologista Cohnhein sugeriu pela primeira vez a existência de células não hematopoiéticas na medula óssea. Em 1970, Friedenstein e colaboradores consolidaram a hipótese, demonstrando a capacidade de aderência das células estromais da medula óssea, cultivadas em frascos de plásticos, e que estas células aderentes possuíam pluripotencialidade e rápida diferenciação em tecidos mesenquimais.⁵⁴

Estudos *“in vitro”*, demonstram que células-tronco da medula óssea diferenciam-se em cardiomiócitos, quando extraídas de ratos e colocadas em cultivo. Sob cultura observou-se formação de miotubos e contração espontânea, após adição de 5-azactidina.⁵⁸

Embora controverso, estudos realizados utilizando células da medula óssea demonstraram a ocorrência de diferenciação cardiomiogênica das células-tronco da medula óssea quando transplantadas bem como sua sobrevivência e efeitos funcionais do tecido miocárdio após infarto.⁵⁹

O transplante de células cultivadas ou não em tecidos cardíacos lesados tem sido proposto como uma alternativa para tratamento de insuficiência cardíaca, principalmente pós-infarto, limitando a extensão do tecido cicatricial.⁶⁰

Uma das possibilidades sugeridas é que o transplante de células-tronco pluripotentes, as quais têm potencial de mutiplicação e diferenciação em células contráteis e células endoteliais na cicatriz do infarto, promovam uma angiogênese e uma capacidade de regeneração tecidual.⁶¹

Os resultados levaram a crer que, na medula óssea, tanto precursores hematopoiéticas quanto os mesenquimais são capazes de promover regeneração cardíaca. Podem ser obtidas por punção medular ou isoladas do sangue periférico. Diferentes modos têm sido propostos e utilizados para promover a chegada de células-tronco no miocárdio, tais como: injeção intravenosa periférica, injeção intracoronária e injeção intramiocárdica; além da mobilização de angioblastos autólogos da medula óssea por citoquinas e diversos fatores de crescimento (fator de estimulação macrófago-granulócito-GM-CSF, fator de célula tronco-SCF, fator de estimulação de colônia de granulócitos-G-CSF, unidade formadora de colônia-fibroblasto-CFU-F) para auxiliar na revascularização do miocárdio. A terapia celular em conjunto com terapias tradicionais, oferece potencial de melhora aos pacientes.^{62,63}

Como toda nova terapia, muitas perguntas estão sendo feitas e ainda poucas respostas estão sendo obtidas. Questiona-se muito o tipo de célula que melhor se adaptaria em transplante celular no coração, qual a melhor via de administração destas células, qual a linhagem mais eficiente na área lesada, quais as células precursoras que estariam envolvidas na possível melhora da função cardíaca, quais doenças cardíacas poderiam ser beneficiadas com esta terapia.⁵

Embora alguns autores tenham mostrado que os cardiomiócitos sejam potencialmente capazes de sofrer divisão mitótica, formação de cicatrizes após infarto do miocárdio leva à remodelação e perda permanente da capacidade contrátil ventricular. Surgiu recentemente, a restauração da contração ventricular na cardiomiopatia isquêmica por transplante de células como uma nova opção terapêutica e viável, mas os efeitos benéficos desta estratégia em toda a gama de cardiomiopatias continua a ser investigado. A célula mais apropriada para esta terapia ainda é um assunto de discussão; mioblastos esqueléticos e células da medula óssea têm sido amplamente utilizados com essa finalidade. Transplante de mioblastos esquelético tem se mostrado eficaz em estudos experimentais e clínicos. Os mioblastos diferenciar-se em fibras musculares viáveis no tecido cicatricial mas falta a diferenciação morfológica em cardiomiócitos. No entanto, as células-tronco adultas são pluripotentes e têm a capacidade de se diferenciar em células específicas, dependendo dos fatores e tecido circundante. Estudos de transplante de células-tronco sugeriram uma melhora da função cardíaca e uma diferenciação em cardiomiócitos, mas outros apenas sugerem um potencial angiogênico.⁵

Em um modelo de cardiomiopatia chagásica, quando ambas as células foram transplantadas em conjunto, após a co-cultura, eles foram capazes de fornecer novas células contráteis e vasos. Por causa da fisiopatologia da doença de Chagas lembrar as descobertas na cardiomiopatia isquêmica crônica, com fibrose e isquemia, a hipótese de que

o transplante simultâneo de co-cultura de células-tronco mesenquimais e mioblastos esqueléticos pode ser uma abordagem eficaz na doença.⁹

Em outro estudo, apesar da evidência de divisão mitótica no coração após infarto do miocárdio, na maioria das vezes, os cardiomiócitos não se regeneram e a insuficiência cardíaca pode ser uma das complicações.⁹

O transplante de mioblastos esqueléticos provou ser eficaz no miocárdio infartado, porque estas células podem se diferenciar em músculo viável no meio da fibrose miocárdica. No entanto, os seguintes fatos pode conduzir as questões: mioblastos esqueléticos não se diferenciam morfológicamente em cardiomiócitos, a ausência de discos intercalares entre as células transplantadas e os cardiomiócitos adultos nativos impede a ligação entre eles, e a presença no pós-transplante de arritmia ventricular (provavelmente de origem isquêmica) em alguns pacientes.⁹

Por outro lado, a característica que as células da medula óssea se diferenciam de acordo com o meio em que estão em contato, abre uma nova perspectiva para a regeneração do músculo infartado. As células da medula óssea podem ser sujeitas a dois processos de diferenciação: a linha de células hematopoiéticas, que gera células sanguíneas (linfócitos, eosinófilos, basófilos, neutrófilos, glóbulos vermelhos e plaquetas) e da linhagem mesenquimal, que podem gerar células musculares, hepatócitos, osteócitos e condrócitos. Em relação ao infarto agudo do miocárdio, alguns estudos sugerem a ocorrência de melhora funcional após o transplante de células de medula óssea, outros sugeriram a ocorrência de diferenciação em

cardiomiócitos, e, ainda, outros sugeriram apenas a existência de um potencial angiogênico.⁹

5 Material e Métodos

Esse estudo caracteriza-se metodologicamente como experimental sendo que os experimentos foram realizados seguindo as normas e princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

5.1 Amostra

Foram utilizados ratos Wistar, pesando em média 300 gramas (entre 280 e 324gr) em número de 60 exemplares, sob aprovação no Comitê de Ética no Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (CEUA PUCPR) - número 427, no dia 20/03/2009.

A escolha do modelo foi baseada no cuidado com os sujeitos de pesquisa, no tamanho e na quantidade que possibilitam a experimentação, maximizando a quantidade de animais com insuficiência cardíaca e minimizando o número de animais utilizados.

5.2 Cuidados Gerais para os Animais

5.2.1 Condições do Biotério

Os animais experimentais foram acomodados no Biotério da Pontifícia Universidade Católica do Paraná. No biotério foi fornecida água *ad libitum*, rações (Nuvilab CR-1®, Nuvital, Colombo – PR, Brasil) foram

alojados em caixas com grade, com no máximo cinco animais em cada caixa. Esta foi mantida uma jornada de 12 horas com luz e 12 horas no escuro, sob sala submetida a aquecimento.

5.2.2 Anestesia

A indução anestésica foi realizada com uma solução de 0,3 ml de quetamina (50mg/ml) com 0,1 ml de xilazina (10mg/kg), administrada por via intramuscular⁶⁵.

5.2.3 Indução da cardiomiopatia – aplicação da doxorrubicina

60 ratos foram inoculados com doxorrubicina com dosagem de 2mg/Kg/peso, equivalente a 50mg/m², uma vez por dia, em dias alternados durante 12 dias (Long *et al*, 1984), via intraperitoneal.

De um total de 60 animais no início do estudo, foi possível avaliar 10 animais em cada grupo, isto ocorreu em consequência da alta taxa de mortalidade após administração da doxorrubicina.

5.2.4 Obtenção e Isolamento das células-tronco e mioblasto esquelético

A medula óssea foi aspirada através de múltiplas punções de ambas as cristas ilíacas posteriores com seringas heparinizadas de 5ml. O material foi encaminhado para o Laboratório Experimental de Cultivo Celular para o isolamento das células mononucleares. As células mononucleares da medula óssea foram isoladas de acordo com o método descrito por Boyum (1968) modificado.

Para obtenção das células mioblásticas foi realizada a biópsia do músculo tibial posterior que foram isoladas as células segundo Delaporte⁶⁶ (Boyum A, 1968, Delaporte *et.al*, 1984).

5.2.5 Co-cultura

Após o isolamento das células satélites e mononucleares, estas foram inicialmente distribuídas em placas de 25 cm² na seguinte proporção: células satélites / células mononucleares: 2/1 (cerca de 0,5 x 10⁵ cel/ml) e observadas diariamente em microscópio de inversão quanto à sobrevivência das células, adesão e confluência ao substrato. As células foram distribuídas e cultivadas por 14 dias. A partir da primeira troca de meio de cultura, que ocorreu em 48 horas de cultivo, as células-tronco de linhagem hematopoética e as demais células não aderentes foram eliminadas e

permaneceram em cultivo: mioblastos esqueléticos, fibroblastos e células-tronco mesenquimais, ou seja, células que aderem ao substrato. O meio de cultivo utilizado foi o Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 15% de Soro Bovino Fetal, 1% de Antibiótico e 10ng/ml de IGF-I (fator de crescimento de insulina) e 10^{-7} M de dexametasona. As culturas foram mantidas em estufa de CO² a 37° C. O meio foi trocado 2-3 vezes por semana durante 14 dias.

5.2.6 Sistema de Ventilação Mecânica

Após anestesia, a via aérea definitiva foi obtida através da intubação orotraqueal (figura 2) com cateter venoso periférico número 14. O cateter foi conectado ao sistema de ventilação mecânica com volume de 2,5mL com frequência de 50 ciclos por minuto observando-se a expansão dos pulmões. Esta técnica foi utilizada para o transplante de células-tronco mononucleares da medula óssea.



Figura 2. Intubação orotraqueal

5.2.7 O transplante combinado de células co-cultivadas

Após a indução da cardiomiopatia, os animais foram randomizados e submetidos à ecocardiografia.

Os animais foram submetidos à toracotomia lateral esquerda, pelo qual foi realizada a exposição do coração para o transplante das células. O material foi injetado na parede anterior do ventrículo esquerdo, utilizando, no entanto, Seringas de Hamilton de 5 µl a 500µL com agulha knurled hub (KH). Foram realizados exatamente os mesmos procedimentos nos animais que receberam apenas solução salina isotônica, injetando-se a quantidade idêntica ao do volume celular, obedecendo às mesmas condições citadas e nos animais que receberam as células.

De um total de 60 animais no início do estudo, foi possível avaliar 10 animais em cada grupo, isto ocorreu em consequência da alta taxa de mortalidade após administração da doxorubicina.

Desta forma os animais foram divididos em dois grupos

Grupo Controle (n=10) – recebeu solução salina na parede anterior do ventrículo esquerdo.

Grupo Co Cultivo (n=10) – recebeu transplante combinado de células tronco mesenquimais e mioblastos esqueléticos na parede anterior do ventrículo esquerdo.

Os procedimentos foram realizados no Laboratório de Técnica Operatória da Puc-PR.

5.2.8 Analgesia pós - operatória

Para analgesia foi utilizado anti-inflamatório não esteroide, (carprofen) Sterile Injectable Solution 2-5 mg/mL Pfizer Animal Health, (Food and Drug Administration Center for Veterinary Medicine – (FDA CVM, 2009)

5.2.9 Exames Ecocardiográficos

A avaliação ecocardiográfica transtorácica bidimensional [Hewlett Packard modelo Sonos 5500, com transdutores setorial S12 (5-12 mHz) e

limiar 15L6 (7-15mHz)], foi realizada em dois períodos, 15 dias após a administração final da doxorrubicina e trinta dias após o transplante, permitindo uma análise de até 160Hz e especificamente produzida para estudo ultra-sônico em pequenos animais. O transdutor foi posicionado na porção ântero-lateral esquerda do tórax e os corações foram visualizados pelo modo bidimensional com visão axial do ventrículo esquerdo, incluindo a valva mitral, aórtica e o ápice na mesma imagem. A conversão digital da imagem foi obtida pela delimitação do septo interventricular e da parede posterior do ventrículo esquerdo. A seguir, realizaram-se as seguintes medidas: superfície sistólica e diastólica finais, comprimento sistólico e diastólico finais do ventrículo esquerdo e frequência cardíaca para cálculos dos volumes sistólicos (VSFVE, ml) e diastólicos (VDFVE, ml) finais e da fração de ejeção (FEVE%) do ventrículo esquerdo. Todas as medidas foram realizadas de forma cega, pelo mesmo ecocardiografista (método de Simpson).

5.2.10 Eutanásia

Todos os animais que foram submetidos a eutanásia receberam a dose letal de 148 mg/kg do anestésico ketamina⁶⁷.

5.2.11 Avaliação Histopatológica Pós-Transplante

Os corações foram preservados em frascos contendo formol 10% durante 24 horas. Após este período os corações foram clivados em quatro partes iguais transversais no micrótomo (Leica modelo RM2145) com espessura de 5 μ m.

Realizado a desidratação dos cortes, sendo estes submetidos a banhos sucessivos em álcool 70%, 80%, 90%, 3 banhos em álcool 100% (Leica modelo TP1020), durante 1 hora. Logo após, impregnada parafina líquida nos cortes através de 3 banhos a 65°C no mesmo aparelho. Então os cortes histológicos foram montados em lâminas e corados. De cada fragmento foram feitas duas lâminas com os quatro cortes.

Os cortes obtidos foram avaliados por sua morfologia, realizando comparações entre cortes do grupo estudo e controle.

Foram realizados cortes para procedimentos padrões e imunohistoquímicos.

Os cortes histológicos foram montados em lâminas e corados com solução de HE, Fator VIII, Sirius red e Myo D1. De cada fragmento foi feito lâminas com os quatro cortes e com as colorações citadas. Outras lâminas foram utilizadas para análise imunohistoquímica.

Para avaliar possíveis alterações miocárdicas patológicas macroscópicas, após a eutanásia e coleta do material para preparo histológico, foram analisados e avaliados, itens nos corações como: aspecto geral, bem como suas delimitações; espessura, e presença de células-tronco

e mioblastos esqueléticos na região. Esses dados foram obtidos após observação direta e em cortes transversais, registrando os achados por meio de fotos digitalizadas.

Neste trabalho foram utilizadas as seguintes colorações:

- Hematoxilina-eosina
- Sirius red

Método de Fixação e Coloração:

1. Fixação preferencial em Bouin ou Formol Tamponado (Paraformaldeído a 4% em Tampão Cacodilato de Sódio a 0,1M, pH 7,2 -&,4) ou em ALFAC (Etanol, Formol e Ácido Acético). Tempo de Fixação: de 6 a 24 horas em TA.

Em Bouin:

- Fixar por 12 horas
- Lavar em água corrente (overnight)
- Desidratar em escala de etanóis

Em ALFAC:

- Seguir rotina para ALFAC

2. Inclusão de rotina em Parafina ou Paraplast:

- Xilol I e II= rotina
- Parafina Líquida= rotina
- Emblocagem= rotina

3. Microtomia: Cortar em 5 μ m
4. Coloração: Desparafinizar e reidratar pela rotina. Se o fixador for o Bouin, não esquecer de lavar os cortes em águas saturadas com Carbonato de Lítio para retirar o excesso de ácido pícrico, e depois lavar bem em água destilada.
5. Corar pela solução de Picrosirius (5 minutos para rotina, 60 minutos para fibras reticulares, cartilagem e membrana basal). Maior tempo de coloração equivale a mais intensidade de vermelho.
6. Lavar em água destilada rapidamente (30 segundos)
7. Corar com hematoxilina de Harris usando o dobro do tempo de rotina, pois o ácido pícrico da solução-corante retira parte da hematoxilina do corte.
8. Lavar em água destilada (3 x 5 minutos)
9. Desidratar, diafanizar e montar em Entellan.

Resultados:

- Conjuntivo rico em colágeno cora-se em vermelho (Sirius Red)
- Células mucosas em vermelho (Sirius Red)
- Estruturas basófilas (Núcleo, Nucléolo, REG, etc) em azul (Hematoxilina de Harris)
- Músculo e epitélio em rosa ou amarelado (ácido pícrico)

- Myo D1: É um marcador sensível da diferenciação miogênica. O anticorpo rotula fortemente os núcleos de mioblastos em desenvolvimento do tecido do músculo esquelético, enquanto que a maioria do músculo esquelético adulto é negativo.

- Fator VIII: Descrição técnica - Método de detecção EnVision FLEX/HPR (Dako - Code K8000). Realizado em plataforma de automação imunohistoquímica - Dako Autostainer Link 48, com cortes parafinados de 3 - 4 micras em lâminas silanizadas. Recuperação antigênica em tanques PT Link a 97°C com soluções EnVision FLEX Target Retrieval Solution pH 6.0/pH 9.0 por 20 minutos. Método de incubação do anticorpo primário em temperatura ambiente por 20-30 minutos de acordo com protocolo específico. Sistema de revelação EnVision FLEX DAB + cromógeno. FATOR VIII (Polyclonal RBT DAKO - Code IS527): @@

As análises foram avaliadas em microscópio óptico (Olympus®RX50) (figura 3) que estava acoplado a uma câmera de vídeo, que captura a imagem digital a um computador, que possui um programa de análise de imagens digitais Image Pro-plus (Média Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA). Para análise destas lâminas foram observadas nos aumentos de 20x, 40x, 100x.



Figura 3. Microscópio óptico Olympus® RX 50

6 *Análise Estatística*

Para a comparação dos grupos em relação às variáveis avaliadas no pré transplante foi considerado o teste t de Student para amostras independentes. Nas comparações dos grupos em relação às variáveis avaliadas após 30 dias do transplante, foi considerado o modelo de análise de covariância (ANCOVA) incluindo-se a avaliação pré transplante como co-variável. Para a comparação dos momentos de avaliação (pré e após 30 dias) dentro de cada grupo, foi usado o teste t de Student para amostras pareadas. A condição de normalidade das variáveis foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilks. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Os dados foram analisados com o programa computacional Statistica v.8.0.

7 Resultados

De um total de 60 animais no início do estudo, foi possível avaliar 10 animais em cada grupo, isto ocorreu em consequência da alta taxa de mortalidade após administração da doxorubicina.

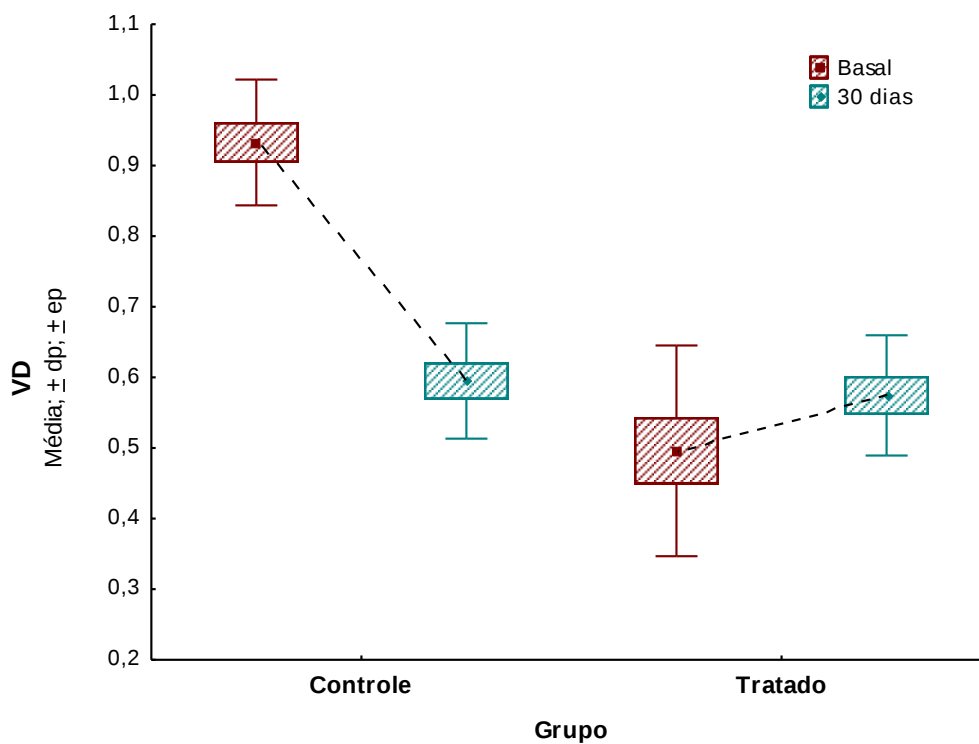
- Análise ecocardiográfica

- Análise ecocardiográfica intragrupo

Com relação ao Volume Diastólico Final do Ventrículo Esquerdo (VD), analisando-se o período basal e trinta dias após o transplante, identificou-se uma diminuição deste parâmetro no grupo controle ($0,93 \pm 0,09\text{ml}$ vs $0,59 \pm 0,08\text{ml}$ $p < 0.001$). Com relação ao grupo co-cultivo foi identificado um acréscimo deste parâmetro ($0,50 \pm 0,15\text{ml}$ vs $0,57 \pm 0,09\text{ml}$ $p = 0.232$), como pode ser identificado abaixo (Tabela 2 e Gráfico 1).

Tabela 2. Parâmetro do volume diastólico, análise intergrupo e intragrupo.

<i>Avaliação</i>	<i>Grupo</i>	<i>N</i>	<i>Média</i>	<i>Valor de p (controle x co-cultivo)</i>	<i>Valor de p (controle – co-cultivo x co-cultivo)</i>
VDFVE Pré	Controle	10	0,93 ml		<0,001
	Co-cultivo	10	0,50 ml	<0,001*	0,232
VDFVE Pós	Controle	10	0,59 ml		
	Co-cultivo	10	0,57 ml	0,526**	

*Teste t de Student para amostras independentes, $p < 0,05$ **ANCOVA ajustado para VD pré, $p < 0,05$ **Gráfico 1.** Parâmetro do volume diastólico, análise intragrupo

Com relação ao Volume Sistólico Final do Ventrículo Esquerdo (VS) analisando-se o período basal e trinta dias após o transplante, identificou-se um acréscimo deste parâmetro tanto no grupo controle como no grupo co-cultura ($0,25 \pm 0,05\text{ml}$ vs $0,33 \pm 0,05\text{ml}$ $p<0,001$ e $0,18 \pm 0,04\text{ml}$ vs $0,33 \pm 0,12\text{ml}$ $p=0,002$, respectivamente), como pode ser identificado abaixo (Tabela 3 e Gráfico 2).

Tabela 3:. Parâmetro do volume sistólico, análise intergrupo e intragrupo

<i>Avaliação</i>	<i>Grupo</i>	<i>N</i>	<i>Média</i>	<i>Valor de p</i> <i>(controle x co-</i> <i>cultivo)</i>	<i>Valor de p (controle</i> <i>x controle – co-</i> <i>cultivo x co-cultivo)</i>
VSFVE Pré	Controle	10	0,25 ml		<0,001
	Co-cultivo	10	0,18 ml	0,002*	0,002
VSFVE Pós	Controle	10	0,33 ml		
	Co-cultivo	10	0,33 ml	0,355**	

*Teste t de Student para amostras independentes, $p<0,05$

**ANCOVA ajustado para VD pré, $p<0,05$

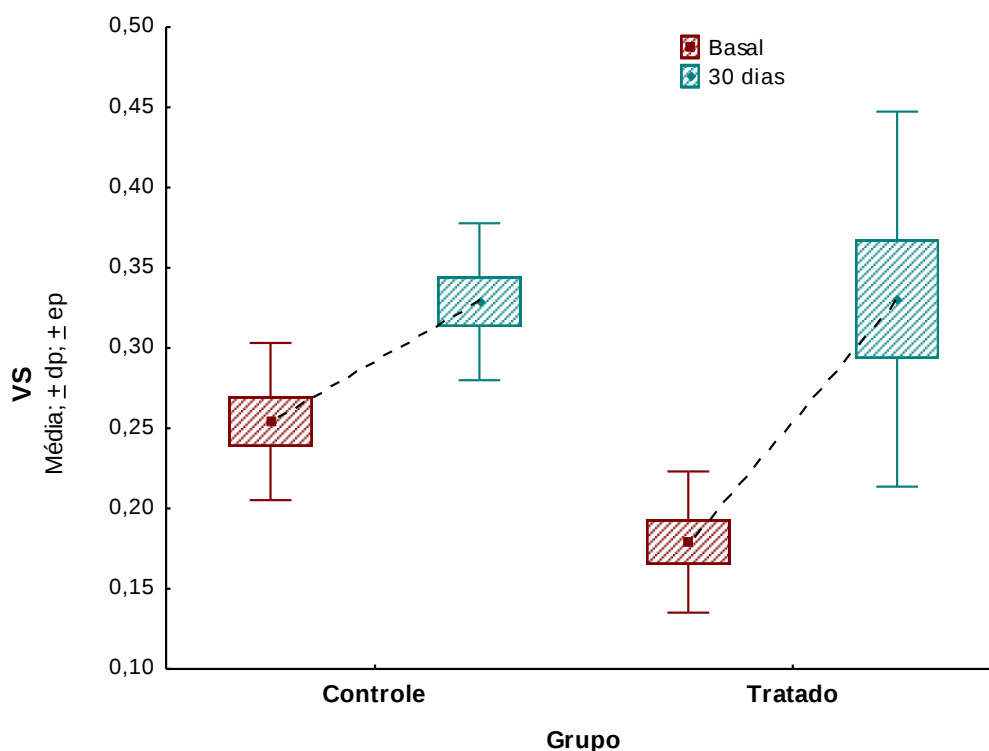
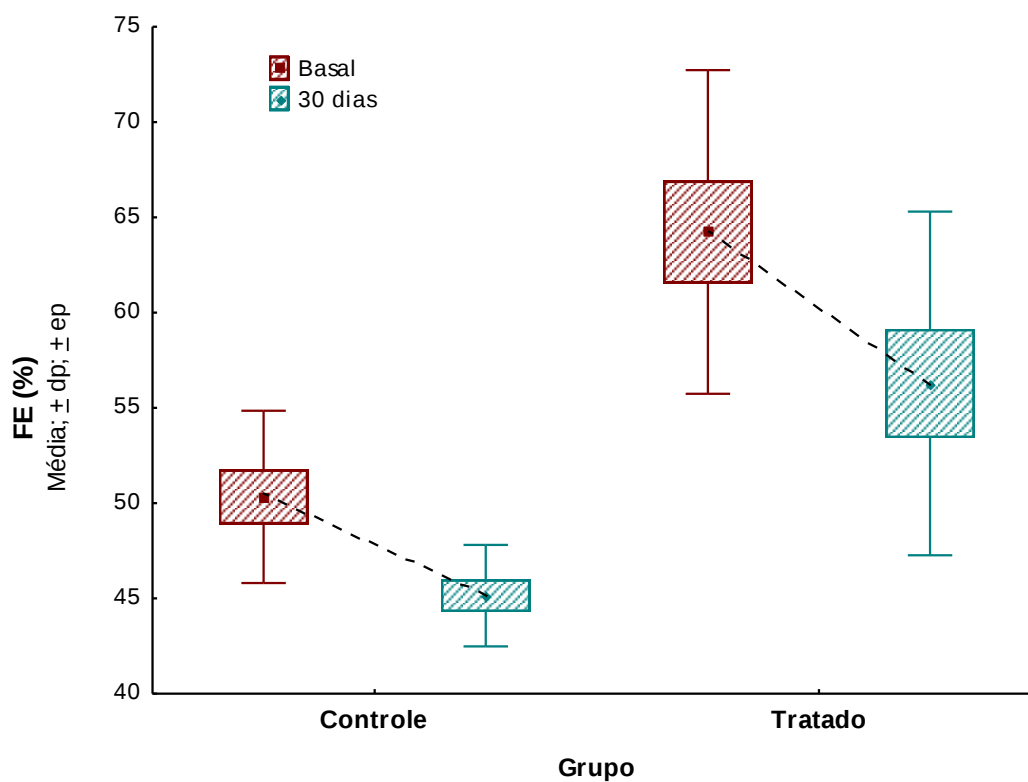


Gráfico 2. Parâmetro do volume sistólico, análise intragrupo

Com relação à Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo (FEVE) analisando-se o período basal e trinta dias após o transplante, identificou-se uma diminuição deste parâmetro nos dois grupos estudados, controle e co-cultivo ($50,33 \pm 4,52\%$ vs $45,15 \pm 2,6\%$ $p=0,007$ e $64,23 \pm 8,49\%$ vs $56,28 \pm 9,02\%$ $p=0,002$, respectivamente), como observa-se abaixo (Tabela 4 e Gráfico 3).

Tabela 4. Parâmetro do fração de ejeção, análise intergrupo e intragrupo

<i>Avaliação</i>	<i>Grupo</i>	<i>N</i>	<i>Média</i>	<i>Valor de p</i> <i>(controle x co-</i> <i>cultivo)</i>	<i>Valor de p (controle</i> <i>x controle – co-</i> <i>cultivo x co-cultivo)</i>
FE% Pré	Controle	10	50,33%		0,007
	Co-cultivo	10	64,23%	<0,001*	0,002
FE%	Controle	10	45,15%		
	Co-cultivo	10	56,28%	0,634**	

*Teste t de Student para amostras independentes, $p < 0,05$ **ANCOVA ajustado para VD pré, $p < 0,05$ **Gráfico 3:** Parâmetro do fração de ejeção, análise intragrupo

- *Análise ecocardiográfica intergrupos.*

Comparando-se os dois grupos entre si, foi identificada diferença estatisticamente significativa dos valores ecocardiográficos de base nos três parâmetros analisados, assim os grupos não foram considerados homogêneos. Desta forma foi usada análise de co variância para ajustar os dados. Após trinta dias não foi identificada diferença entre os grupos nos três parâmetros analisados.

Com relação ao parâmetro do VD no período pré transplante identificou-se que os grupos não eram homogêneos ($p < 0.001$). Quando analisados os resultados em 30 dias não foi observado diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p = 0.526$), como pode ser identificado na Tabela 5.

Tabela 5. Parâmetro do VD, análise intergrupos

<i>Avaliação</i>	<i>Grupo</i>	<i>N</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio padrão</i>	<i>Valor de p (controle x co cultivo)</i>
VD Pré	Controle	10	0,93	0,09	<0,001*
	Co cultivo	10	0,50	0,15	
VD Pós	Controle	10	0,59	0,08	0,526**
	Co cultivo	10	0,57	0,09	

*Teste t de Student para amostras independentes, $p < 0,05$

**ANCOVA ajustado para VD pré, $p < 0,05$

Com relação ao parâmetro do VS no período pré transplante identificou-se uma diferença estatística entre os grupos com $p = 0.002$. Após

trinta dias do transplante não foi observado diferença entre os animais de ambos os grupos, com $p=0.355$ (Tabela 6).

Tabela 6. Parâmetro do VS, análise intergrupos

Avaliação	Grupo	n	Média	Desvio padrão	Valor de p (controle x co cultivo)
VS Pré	Controle	10	0,25	0,05	0,002*
	Co cultivo	10	0,18	0,04	
VS Pós	Controle	10	0,33	0,05	0,355**
	Co cultivo	10	0,33	0,12	

*Teste t de Student para amostras independentes, $p<0,05$

**ANCOVA ajustado para VS pré, $p<0,05$

Com relação ao parâmetro da FE nos dados de base identificou-se que os grupos não eram homogêneos ($p<0.001$). Quando analisados os resultados em 30 dias após o transplante, não se identificou uma diferença estatisticamente significativa com $p=0.634$. (Tabela 7)

Tabela 7.

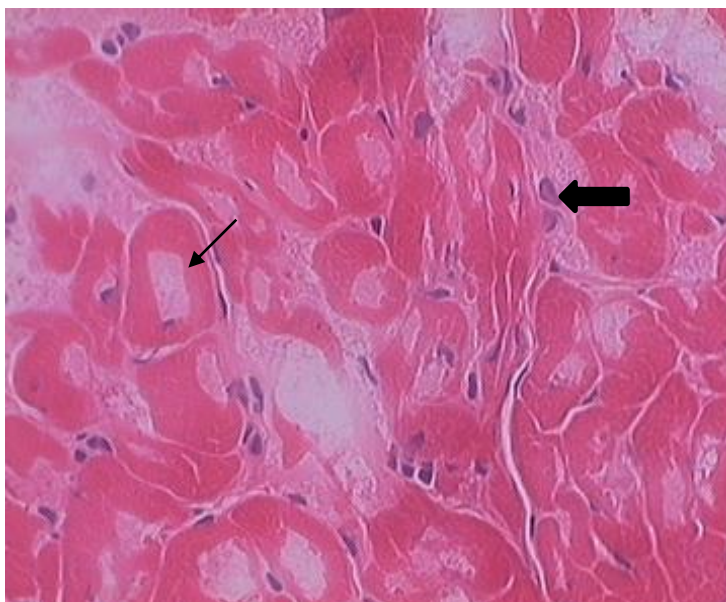
Avaliação	Grupo	n	Média	Desvio padrão	Valor de p (controle x co cultivo)
FE% Pré	Controle	10	50,33	4,52	<0,001*
	Co cultivo	10	64,23	8,49	
FE% Pós	Controle	10	45,15	2,66	0,634**
	Co cultivo	10	56,28	9,02	

*Teste t de Student para amostras independentes, $p<0,05$

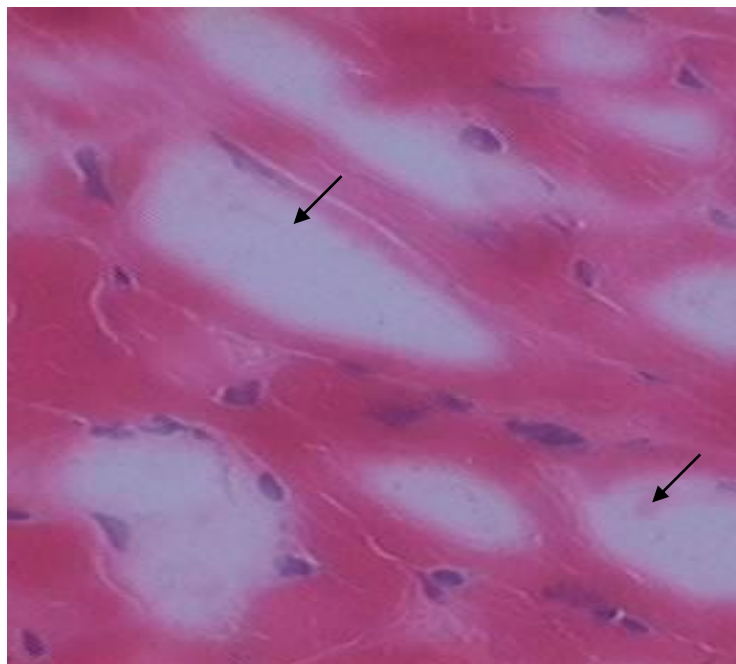
**ANCOVA ajustado para FE pré, $p<0,05$

- Análise histológica

Com relação à coloração por Hematoxilina-Eosina, no grupo controle, foi identificado áreas de hipertrofia da fibra muscular cardíaca e também presença de vacuolização intracitoplasmática, caracterizando o desenvolvimento da cardiomiopatia induzida pela doxorrubicina. (Fotomicrografias 1 e 2)

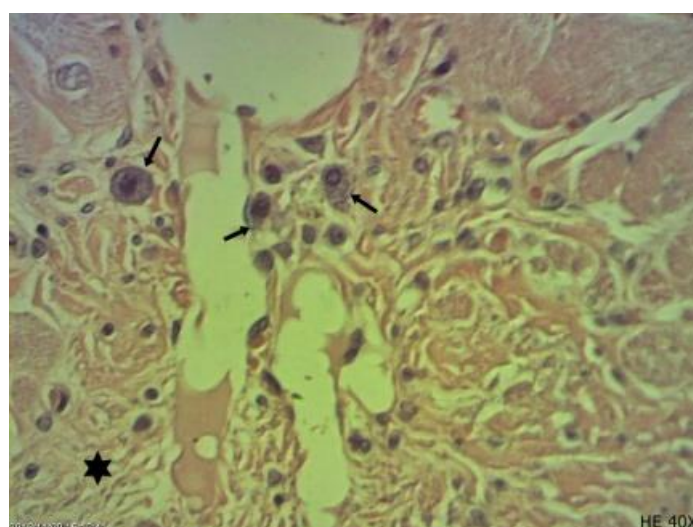


Área de Hipertrofia da fibra muscular cardíaca (←);
núcleo hipertrófico (←) (coloração: HE – 40x), grupo
controle. Fotomicrografia 1

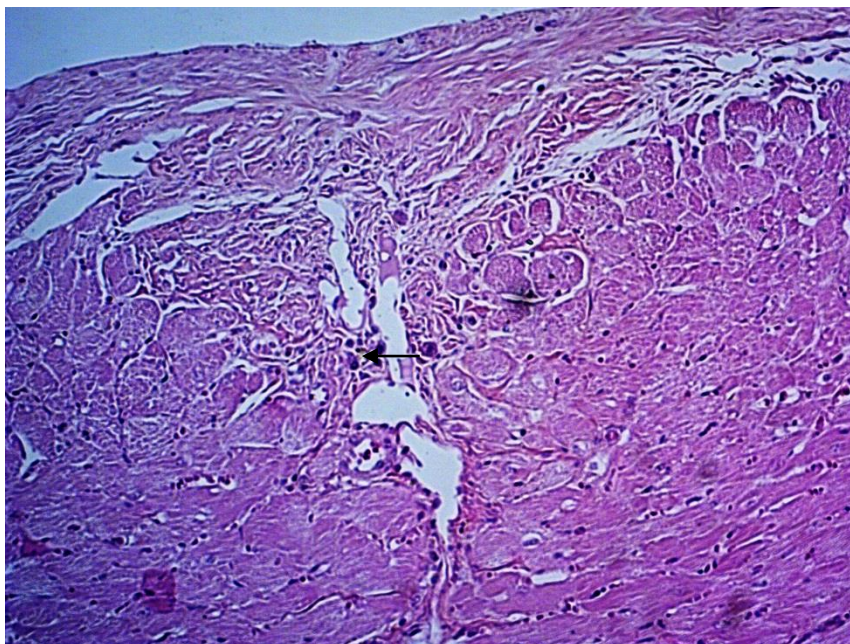


Área de vacuolização intracitoplasmática (←→)
(coloração: HE – 40x), grupo controle. Fotomicrografia 2

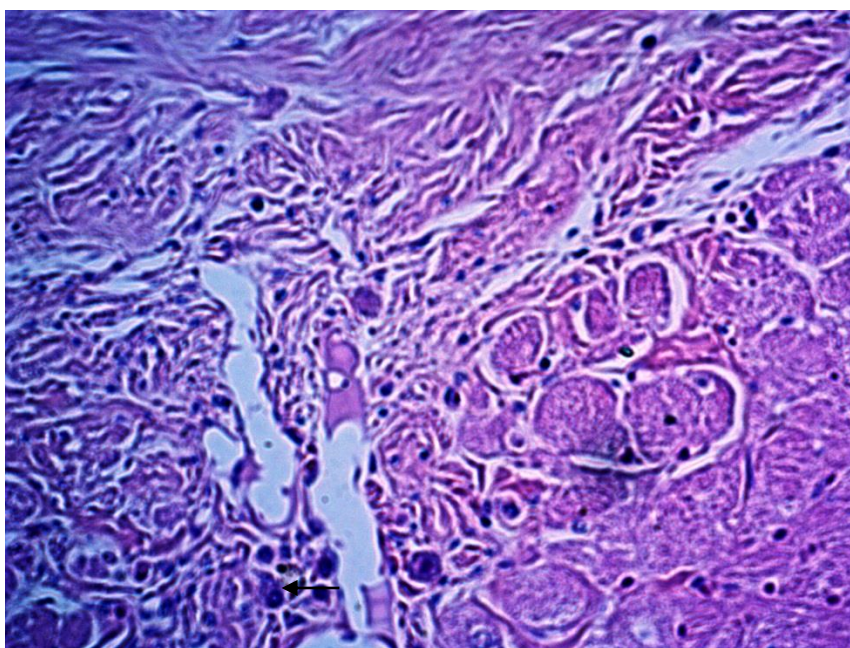
Ainda analisando à coloração por Hematoxilina-Eosina, no grupo co-cultivo, identifica-se a presença de células com características morfológicas de mioblastos esqueléticos na área de fibrose miocárdica.



Células com características morfológicas de mioblasto esquelético
(←→), área de fibrose miocárdica (*), HE 40x.
grupo co-cultivo. Fotomicrografia 3.

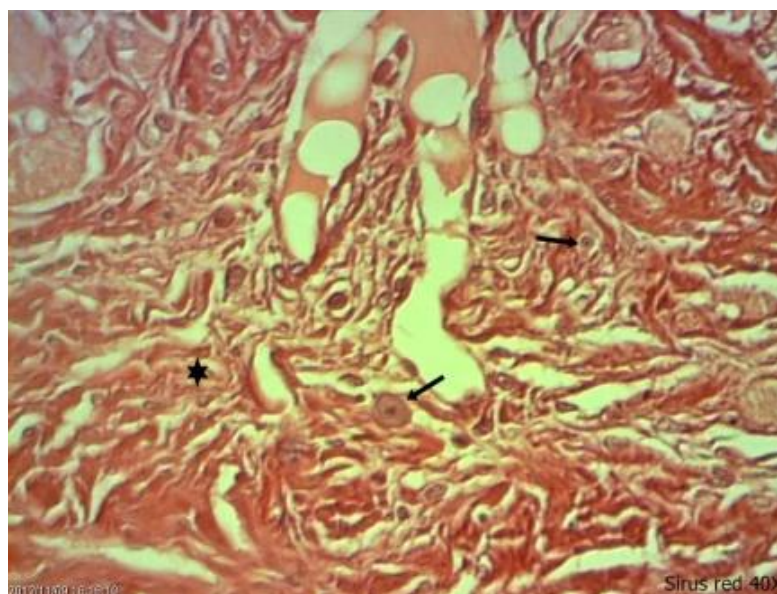


Células com características morfológicas de mioblasto esquelético (←), HE 4x. Grupo co-cultivo. Fotomicrografia 4.

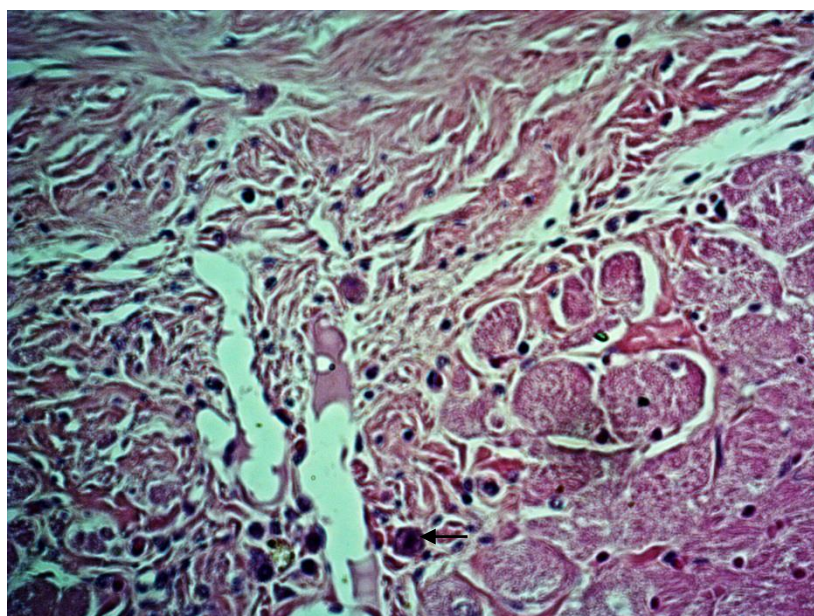


Células com características morfológicas de mioblasto esquelético (←), HE 4x. Grupo co-cultivo. Fotomicrografia 5.

Com relação à coloração por Sirius Red no grupo co-cultivo identificou-se células com características morfológicas de mioblastos esqueléticos, na área de fibrose miocárdica.

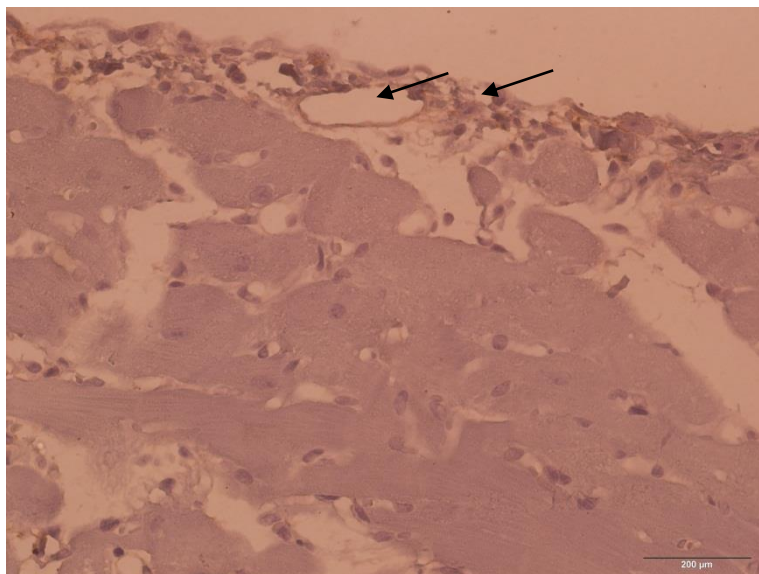


Células com características morfológicas de mioblasto esquelético (←), área de fibrose miocárdica (★), Sirius Red 40 X, grupo co-cultivo. Fotomicrografia 6.



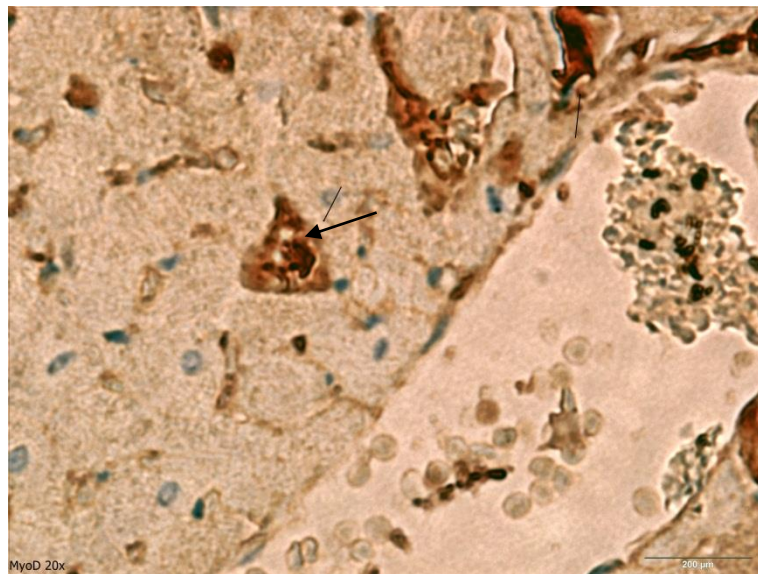
Células com características morfológicas de mioblasto esquelético (←), Sirius Red 10 X, grupo co-cultivo. Fotomicrografia 7.

Na análise por imunohistoquímica pelo Fator VIII no grupo co-cultivo identificou-se células endoteliais, característica de células com diferenciação vascular.

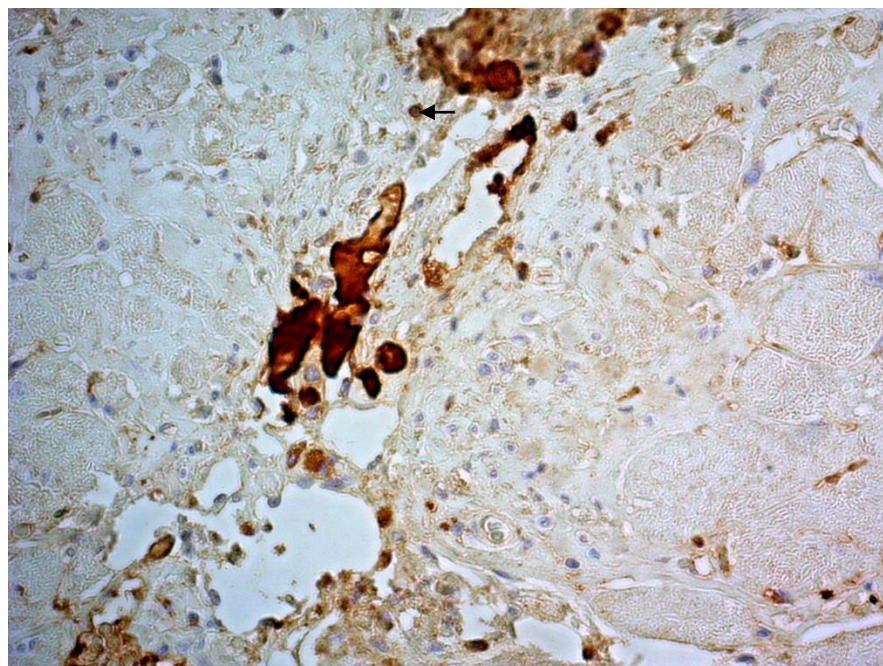


Células com características de diferenciação vascular (←) Fator VIII 40 X, grupo co-cultivo. Fotomicrografia 8.

Com relação à imunohistoquímica pelo fator Myo D no grupo co-cultivo foi identificada a presença de mioblastos esqueléticos.



Mioblasto esquelético (←) Myo D 100 X, grupo co-cultivo.
Fotomicrografía 9.



Mioblasto esquelético (←) Myo D 20 X, grupo co-cultivo.
Fotomicrografía 10.

8 *Discussão*

Ao longo da década passada, houve crescente evidência experimental de que os transplantes de células poderia ser uma abordagem nova e eficiente para a recuperação do miocárdio lesado.

O transplante isolado de células-tronco mononucleares da medula óssea na cardiomiopatia isquêmica vem sendo realizado com resultados que sugerem uma melhora funcional do miocárdio, principalmente pelo seu mecanismo de angiogênese no local do transplante⁴⁶.

He A. et al., também demonstraram que as células-tronco mesenquimais reduzem o processo de apoptose em cardiomiócitos após infarte do miocárdio⁶⁹.

Nagaya et al., demonstraram que a injeção intravenosa de células-tronco mesenquimais (CTMs) reduziu a zona de fibrose em modelo animal de infarto do miocárdio agudo⁷⁰. Além disso, Ohnishi et al. demonstraram que a injeção (CTMs) atenua a disfunção miocárdica e fibrose em modelo de miocardite aguda em ratos⁷¹.

O transplante isolado de mioblastos esqueléticos no miocárdio infartado em pacientes adultos realiza uma colonização da região infartada com novas células musculares de origem esquelética na região fibrosada, entretanto a arritmia ventricular foi uma das complicações identificadas neste protocolo⁴².

Koh et al., em 1995 relataram as primeiras experiências com transplante celular em modelo da cardiomiopatia não-isquêmica em cães, onde foram transplantados cardiomiócitos obtidos de fetos caninos e

injetados no miocárdio de animais singênicos com distrofia muscular, demonstrado que a terapia celular pode aumentar do número de cardiomiócitos⁷².

Outros grupos, transplantaram mioblastos esqueléticos e demonstraram que a infusão intracoronária pode, com sucesso, disseminar mioblastos esqueléticos primários em modelo cardiomiopatia dilatada em ratos, e que essas células se diferenciaram em miotubos multinucleados alinhados com o eixo da fibra cardíaca, e que esse procedimento está associado a melhora significativa da função cardíaca. Os mecanismos propostos incluíam propriedades dos miotubos enxertados, liberação de fatores parácrinos, melhor angiogênese e melhor capacidade contrátil dos cardiomiócitos^{68,73,74}.

Um trabalho realizado por Scorsin et al., realizou o transplante de cardiomiócitos fetais em um modelo de cardiomiopatia induzida pela doxorubicina. Os autores identificaram uma melhora funcional em duas semanas e um mês após o transplante, entretanto não foram identificadas as células transplantadas, marcadas previamente com betagalactosidase⁶⁸.

A associação de ambos os tipos celulares foi proposta e realizada nos modelos de cardiomiopatia isquêmica e na doença de Chagas com disfunção ventricular e proporcionou uma regeneração angiomuscular no miocárdio acometido pela patologia de base, na região submetida ao transplante, associada à uma melhora funcional^{5,9}.

O coração é muito vulnerável à ação dos radicais livres produzidos pela quimioterapia. O comprometimento da função cardíaca global ocorre

com uso de doxorubicina, no entanto, os ratos são mais sensíveis à doxorubicina do que humanos⁷⁵.

Habitualmente a mortalidade em estudos experimentais com o uso desta antraciclina é alta⁷⁶. Desta forma, a elaboração do nosso protocolo ficou bastante prejudicada, pois muitos animais foram a óbito com o uso de doses habituais da literatura.

Dentre os vários modelos experimentais para desenvolvimento de miocardiopatia dilatada, temos a doença de Chagas, a inoculação de veneno de cobra, a estimulação com marca passo em alta frequência cardíaca e administração de altas doses de adrenalina nos animais, entretanto cada um com uma particularidade específica, mas que também apresentam altas taxas de mortalidade^{5,68}.

A vantagem da utilização deste modelo é em função de ser um método eficiente no desenvolvimento da toxicidade cardíaca e que fisiologicamente lesa o tecido miocárdico de uma forma irreversível com predomínio de fibrose difusa por todo o coração, e não segmentar como nos casos de infarto do miocárdio.

A análise morfológica por microscópica óptica neste trabalho registrou a presença de vacuolização citoplasmática nos corações estudados, tanto no grupo controle como no grupo co cultura. Houve variação no tamanho do núcleo e áreas de fibrose intersticial com presença de células polimorfonucleares. Um trabalho publicado por Simeoni et al, onde foi realizado o transplante de células mononucleares da medula óssea em um modelo de cardiomiopatia induzida pela doxorubicina, demonstrou

padrões histológicas que corroboram com nossos achados, característicos da ação da droga através da produção de radicais livres e uma diminuição da atividade das enzimas antioxidantes⁶⁴.

Sabe-se que a incidência relatada da disfunção cardíaca induzida pela doxorrubicina varia de 4 a 36% em pacientes que receberam 600mg/m² ou mais, elevando o risco de cardiotoxicidade⁷⁷. Sisson et al. (1999) descreveram em cães com cardiomiopatia dilatada resultados semelhantes, com disfunção sistólica e diastólica⁷⁸.

Em nosso estudo, a avaliação funcional ficou bastante prejudicada em consequência da alta taxa de mortalidade observada após a administração da doxorrubicina, fato este que dificultou a inclusão dos animais no estudo. Desta forma, os animais que sobreviveram à indução da cardiomiopatia não apresentavam disfunção ventricular severa, a qual era o objetivo inicial do estudo, pois queríamos testar o efeito terapêutico do transplante combinado de células neste modelo de cardiomiopatia.

O fato dos dados ecocardiográficos basais terem identificado que os dois grupos não eram homogêneos nos três parâmetros analisados, sugeriu que o modelo de cardiomiopatia desenvolvido não apresentava um padrão de lesão tecidual habitual em todos os animais. Entretanto, para não prejudicar a avaliação funcional, foi utilizado o teste de Ancova para a análise de co-variância.

O que foi possível analisar foi o fato de que os animais do grupo controle apresentavam uma pior função cardíaca em relação ao grupo co

cultura no período pré transplante, pois foi visibilizado uma menor FE e maiores volumes sistólicos e diastólicos finais do ventrículo esquerdo.

Com relação ao efeito funcional do transplante combinado de células tronco mesenquimais e mioblásticas na cardiomiopatia induzida pela doxorrubicina, não foi possível avaliar o seu efeito, pois os dados ecocardiográficos foram semelhantes tanto no grupo controle como no grupo co cultura, trinta dias após o transplante, nos três parâmetros analisados.

Embora, neste estudo não ter sido possível visibilizar uma melhora funcional nos animais submetidos ao transplante combinado de células, foram identificadas tanto morfológicamente como pela imunohistoquímica, células de origem muscular esqueléticas e novos vasos sanguíneos na parede anterior do ventrículo esquerdo, local onde as células foram injetadas.

Isso sugere que os tecidos afetados pela doxorrubicina passaram a expressar receptores ou ligantes específicos que facilitaram o tráfego, a adesão e a infiltração das células-tronco nos sítios de injúria. Além disso, demonstraram suprimir a inflamação local e repor as células danificadas.

A co-cultura de células da musculatura estriada esquelética com células mesenquimais, talvez possa trazer uma alternativa às diferenças morfofuncionais entre mioblastos e cardiomiócitos que resulte em acoplamento eletromecânico com sucesso⁹.

Uma possível justificativa que podemos inferir ao fato de que não houve melhora funcional após o transplante das células, pode ser em consequência de que as células foram injetadas apenas na parede anterior

do ventrículo esquerdo e como a cardiomiopatia acomete todo o ventrículo, o número de células transplantadas pode ter sido insuficiente e também as regiões lateral e inferior do ventrículo esquerdo não foram tratadas com as células.

Um outro detalhe importante que é necessária discussão, está relacionado à forma de aplicação das células no miocárdio. Existem estudo onde as células tronco mesenquimais foram injetadas via acesso venoso periférico, termo conhecido como “homing” após infarto do miocárdio. Entretanto, foi demonstrado em estudos com ratos que menos de 1% das células infundidas ainda residiam no coração infartado quatro horas após a infusão⁷⁹.

A injeção das células tronco via intracoronária também é uma forma de administração utilizada por algumas publicações, entretanto um trabalho bastante interessante realizado por Nakamuta et al, sugeriu que a forma mais efetiva de injeção das células é a realizada por injeção direta no músculo, pois desta forma existe uma maior aderência das células ao miocárdio lesado⁸⁰.

Em nosso trabalho é importante ressaltar que as células-tronco co-cultivadas permaneceram no tecido lesado ao final de 30 dias. Em nossas análises histológicas, foram encontradas células com características musculares, sendo ainda possível observar que há presença de angiogênese, fato esse que não ocorreu no grupo que não recebeu células co-cultivadas.

As células-tronco mesenquimais podem ser facilmente isoladas e rapidamente expandidas *ex vivo*. Sua atuação na restauração de tecido miocárdico defeituoso ocorre por meio de diversos mecanismos. No principal deles, desencadeado após o transplante, essas células iniciam a produção de fatores de crescimento reparadores, objetivando a produção, localmente, de fatores de crescimento e citocinas. Além disso, elas podem suprimir a inflamação local e repor células danificadas. Por fim, essas células são capazes de contribuir para a criação de um ambiente favorável ao reparo de tecido cardíaco endógeno.

A terapia celular para reparo cardíaco é um dos mais promissores tratamentos para doenças cardiovasculares. Entretanto, muitas informações, como os mecanismos fundamentais do reparo e os tipos celulares adequados, ainda não estão bem esclarecidas.

9 Conclusões

Analisando-se os dados obtidos neste trabalho pode-se sugerir que:

- Foi identificado através da presença de células musculares esqueléticas e vasos sanguíneos nas regiões submetidas ao transplante combinado de células tronco mesenquimais e mioblastos esqueléticos, sendo que no grupo controle foi identificado apenas degeneração do tecido cardíaco.
- Não foi visualizado melhora funcional dos animais do grupo submetido ao transplante combinado de células na análise intergrupo e tão pouco entre os grupos, após trinta dias do transplante. Desta forma, o tratamento proposto não foi efetivo neste modelo de cardiomiopatia dilatada induzida pela doxorubicina.

10 Referências Bibliográficas

- 1 Mendez GF, Cowie MR. The epidemiological features of heart failure in developing countries: a review of the literature. *Int J Cardiol.* 2001;80(2-3):213-9.
- 2 Datasus. Estatísticas Vitais - Mortalidade e Nascidos Vivos. p.Acesso em 20/09/2007. 2007.
- 3 Kajstura J, Leri A, Finato N, Di Loreto C, Beltrami CA, Anversa P. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(15):8801-5.
- 4 McMurray J, Pfeffer MA. New therapeutic options in congestive heart failure: Part II. *Circulation.* 2002;105(18):2223-8.
- 5 Guarita-Souza LC, Carvalho KA, Woitowicz V, Rebelatto C, Senegaglia A, Hansen P, Miyague N, Francisco JC, Olandoski M, Faria-Neto JR, Brofman P. Simultaneous autologous transplantation of cocultured mesenchymal stem cells and skeletal myoblasts improves ventricular function in a murine model of Chagas disease. *Circulation.* 2006;114(1 Suppl):I120-4.
- 6 Hughes S. Cardiac stem cells. *J Pathol.* 2002; 197(4):468-78.
- 7 Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Gattermann N, Hernandez A, Sorg RV, Kögler G, Wernet P. Intracoronary, human autologous stem cell transplantation for myocardial regeneration following myocardial infarction. *Dtsch Med Wochenschr.* 2001;126(34-35):932-8.
- 8 Brehm M, Zeus T, Strauer BE. Stem cells--clinical application and perspectives. *Herz.* 2002;27(7):611-20.

- 9 Souza LC, Carvalho KA, Rebelatto C, Senegaglia A, Furuta M, Miyague N, Hansen P, Francisco JC, Olandowski M, Brofman PR. Combined transplantation of skeletal myoblasts and mesenchymal cells (cocultivation) in ventricular dysfunction after myocardial infarction. *Arq Bras Cardiol.* 2004;83(4):294-9; 288-93. Erratum in: *Arq Bras Cardiol.* 2005 May;84(5):table of contents. Olandowski, Marcia [corrected to Olandwski, Marcia]. *Arq Bras Cardiol.* 2004;83(6):521.
- 10 Czarnecki CM. Animal models of drug-induced cardiomyopathy. *Comp Biochem Physiol C.* 1984; 79(1):9-14.
- 11 Young MD. Pathologic Effects of Adryamicin (NSC-123127) In Experimental Systems. *Cancer Chemotherapy Reports* 1975. 1975,159-173
- 12 Jensen BV, Skovsgaard T, Nielsen SL. Functional monitoring of anthracycline cardiotoxicity: a prospective, blinded, long-term observational study of outcome in 120 patients. *Ann Oncol.* 2002;13(5):699-709.
- 13 Bachur NR, Hildebrand RC, Jaenke RS. Adriamycin and daunorubicin disposition in the rabbit. *J Pharmacol Exp Ther.* 1974;191(2):331-40.
- 14 Jaenke RS. An anthracycline antibiotic-induced cardiomyopathy in rabbits. *Lab Invest.* 1974;30(3):292-304
- 15 Long HJ, Diamond SS, Raflo CP, Burningham RA. Dose-response relationships of chronic adriamycin toxicity in rabbits. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1984;20(1):129-35.

- 16 Klimtová I, Simůnek T, Mazurová Y, Hrdina R, Gersl V, Adamcová M. Comparative study of chronic toxic effects of daunorubicin and doxorubicin in rabbits. *Hum Exp Toxicol*. 2002;21(12):649-57.
- 17 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-7.
- 18 Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium. *Pediatr Transplant*. 2003;7 Suppl 3:86-8.
- 19 Min JY, Yang Y, Converso KL, Liu L, Huang Q, Morgan JP, Xiao YF. Transplantation of embryonic stem cells improves cardiac function in postinfarcted rats. *J Appl Physiol*. 2002;92(1):288-96.
- 20 Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, Schümichen C, Nienaber CA, Freund M, Steinhoff G. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet*. 2003;361(9351):45-6.
- 21 Machado V, Cabral A, Monteiro P, Gonçalves L, Providência LA. Carvedilol as a protector against the cardiotoxicity induced by anthracyclines (doxorubicin). *Rev Port Cardiol*. 2008;27(10):1277-96.
- 22 Singal PK, Li T, Kumar D, Danelisen I, Iliskovic N. Adriamycin-induced heart failure: mechanism and modulation. *Mol Cell Biochem*. 2000;207(1-2):77-86.

- 23 Davies KJ, Doroshow JH. Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. I. Anthracycline radical formation by NADH dehydrogenase. *J Biol Chem*. 1986;261(7):3060-7
- 24 Kalyanaraman B, Joseph J, Kalivendi S, Wang S, Konorev E, Kotamraju S. Doxorubicin-induced apoptosis: implications in cardiotoxicity. *Mol Cell Biochem*. 2002;234-235(1-2):119-24.
- 25 Myers C. The role of iron in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Semin Oncol*. 1998;25(4 Suppl 10):10-4.
- 26 Singal PK, Deally CM, Weinberg LE. Subcellular effects of adriamycin in the heart: a concise review. *J Mol Cell Cardiol*. 1987;19(8):817-28.
- 27 Doroshow JH. Anthracycline antibiotic-stimulated superoxide, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical production by NADH dehydrogenase. *Cancer Res*. 1983;43(10):4543-51.
- 28 Bachur NR, Gee MV, Friedman RD. Nuclear catalyzed antibiotic free radical formation. *Cancer Res*. 1982;42(3):1078-81.
- 29 Svingen BA, Powis G. Pulse radiolysis studies of antitumor quinones: radical lifetimes, reactivity with oxygen, and one-electron reduction potentials. *Arch Biochem Biophys*. 1981;209(1):119-26.
- 30 Yoon DJ, Liu CT, Quinlan DS, Nafisi PM, Kamei DT. Intracellular trafficking considerations in the development of natural ligand-drug molecular conjugates for cancer. *Ann Biomed Eng*. 2011;39(4):1235-51.
- 31 Chatterjee K, Zhang J, Honbo N, Karliner JS. Doxorubicin cardiomyopathy. *Cardiology*. 2010;115(2):155-62. Epub 2009 Dec 11. Review.

-
- 32 Steinhauser ML, Lee RT. Regeneration of the heart. *EMBO Mol Med*. 2011;3(12):701-12
- 33 Greenberg B. Acute decompensated heart failure - treatments and challenges. *Circ J*. 2012;76(3):532-43
- 34 Bocchi EA, Marcondes-Braga FG, Bacal F, Ferraz AS, Albuquerque D, Rodrigues Dde A, Mesquita ET, Vilas-Boas F, Cruz F, Ramires F, Villacorta H Jr, de Souza Neto JD, Rossi Neto JM, Moura LZ, Beck-da-Silva L, Moreira LF, Rohde LE, Montera MW, Simões MV, Moreira Mda C, Clausell N, Bestetti R, Mourilhe-Rocha R, Mangini S, Rassi S, Ayub-Ferreira SM, Martins SM, Bordignon S, Issa VS. Atualização da Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica – 2012. *Arq Bras Cardiol*. 2012 Jan;98(1 Suppl 1):1-33.
- 35 Scorsin M, Marotte F, Sabri A, Le Dref O, Demirag M, Samuel JL, Rappaport L, Menasché P. Can grafted cardiomyocytes colonize peri-infarct myocardial areas? *Circulation*. 1996;94(9 Suppl):II337-40.
- 36 Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, Mickle DA, Zhang J, Mohabeer MK, Rao V, Ivanov J. Cardiomyocyte transplantation improves heart function. *Ann Thorac Surg*. 1996;62(3):654-60; discussion 660-1.
- 37 Murry CE, Wiseman RW, Schwartz SM, Hauschka SD. Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis. *J Clin Invest*. 1996;98(11):2512-23.
- 38 Scorsin M, Hagege AA, Marotte F, Mirochnik N, Copin H, Barnoux M, et al. Does transplantation of cardiomyocytes improve function of infarcted myocardium? *Circulation* 1997;96(9 Suppl):II-188-93

-
- 39 Wang JS, Shum-Tim D, Galipeau J, Chedrawy E, Eliopoulos N, Chiu RC. Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2000;120(5):999-1005.
- 40 Kim EJ, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Jia ZQ, Tomita S, et al. Angiogenesis by endothelial cell transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2001;122(5):963-71.
- 41 Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernandez A, Sorg RV, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002;106(15):1913-8
- 42 Menasche P. Cell transplantation in myocardium. *Ann Thorac Surg.* 2003;75(6 Suppl):S20-8.
- 43 Rezai N, Podor TJ, McManus BM. Bone marrow cells in the repair and modulation of heart and blood vessels: emerging opportunities in native and engineered tissue and biomechanical materials. *Artif Organs.* 2004;28(2):142-51.
- 44 Carvalho KA, Guarita-Souza LC, Rebelatto CL, Senegaglia AC, Hansen P, Mendonca JG, et al. Could the coculture of skeletal myoblasts and mesenchymal stem cells be a solution for postinfarction myocardial scar? *Transplant Proc.* 2004;36(4):991-2.
- 45 Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation.* 2002;105(1):93-8.

-
- 46 Guarita-Souza LC, Carvalho KA, Rebelatto C, Senegaglia A, Hansen P, Furuta M, Miyague N, Francisco JC, Olandoski M, Faria-Neto JR, Oliveira SA, Brofman PR. Cell transplantation: Differential effects of myoblasts and mesenchymal stem cells. *Int J Cardiol.* 2006;111(3):423-9.
 - 47 Zhang J, Li GS, Li GC, Zhou Q, Li WQ, Xu HX. Autologous mesenchymal stem cells transplantation in adriamycin-induced cardiomyopathy. *Chin Med J. (Engl)* 2005;118(1):73-6.
 - 48 Carvalho KA, Rebelatto CLK, Senegaglia AC, Hansen P, Souza LCG, Francisco JC, Olandoski M, Brofman PRS. New model to optimize the myocardium regeneration: co-culture of skeletal myoblasts and mesenchymal stem cells. *J Bras transpl.* 2004;7(1):28-33.
 - 49 Fang D, Nguyen TK, Leishear K, Finko R, Kulp AN, Hotz S, Van Belle PA, Xu X, Elder DE, Herlyn M. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res.* 2005;65(20):9328-37.
 - 50 Chachques JC, Acar C, Herreros J, Trainini JC, Prosper F, D'Attellis N, et al. Cellular cardiomyoplasty: clinical application. *Ann Thorac Surg.* 2004;77(3):1121-30
 - 51 Strauer BE, Kornowski R. Stem cell therapy in perspective. *Circulation.* 2003;107(7):929-34.
 - 52 Ye M, Chen S, Wang X, Qi C, Lu G, Liang L, et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor in bone marrow stromal cells of rat. *Neuroreport* 2005;16(6):581-4.

-
- 53 Deng J, Petersen BE, Steindler DA, Jorgensen ML, Laywell ED. Mesenchymal stem cells spontaneously express neural proteins in culture and are neurogenic after transplantation. *Stem Cells*. 2006;24(4):1054-64.
- 54 Tang LJ, Gao Y, Zhang Z, Li H, Shan YQ. Human bone marrow multipotent adult progenitor cells differentiate into hepatocyte-like cells with hepatocyte growth factor plus fibroblast growth factor-4 in vitro. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*. 2005;13(9):652-5.
- 55 Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. 1970;3(4):393-403.
- 56 Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*. 2002;416(6880):542-5.
- 57 Bocchi E. Cell Transplantation for treatment of patients with heart failure. *Rev Cardiol Estado de São Paulo*. 2003;427-33
- 58 Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest*. 1999;103(5):697-705
- 59 Tomita S, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Kim EJ, Sakai T, et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation*. 1999;100(19 Suppl):II247-56.

-
- 60 Fukuda K. Application of mesenchymal stem cells for the regeneration of cardiomyocyte and its use for cell transplantation therapy. *Hum Cell*. 2003;16(3):83-94.
- 61 Fontes PA, Thomson AW. Stem cell technology. Interview by Abi Berger. *BMJ*. 1999;319(7220):1308.
- 62 Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med*. 2001;7(4):430-6.
- 63 Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest*. 2002;109(3):337-46.
- 64 Carvalho KA, Simeoni RB, Guarita-Souza LC, Francisco JC, Abdelwahid E, Myiague NI, Chachques JC, Rivetti LA, Oliveira L, Malvezzi M, Olandoski M, Gremski W. Angiogenesis without functional outcome after mononuclear stem cell transplant in a doxorubicin-induced dilated cardiomyopathy murine model. *Int J Artif Organs*. 2008;31(5):431-8.
- 65 Wright M. Pharmacologic effects of ketamine and its use in veterinary medicine. *J Am Vet Med Assoc*. 1982;180(12):1462-71.
- 66 Delaporte C, Dehaupas M, Fardeau M. Comparison between the growth pattern of cell cultures from normal and Duchenne dystrophy muscle. *J Neurol Sci*. 1984;64(2):149-60.

-
- 67 Rebuelto M, Albarellos G, Ambros L, Kreil V, Montoya L, Bonafine R, et al. Pharmacokinetics of ceftriaxone administered by the intravenous, intramuscular or subcutaneous routes to dogs. *J Vet Pharmacol Ther.* 2002;25(1):73-6.
- 68 Scorsin M, Hagege AA, Dolizy I, Marotte F, Mirochnik N, Copin H, Barnoux M, le Bert M, Samuel JL, Rappaport L, Menasché P. Can cellular transplantation improve function in doxorubicin-induced heart failure? *Circulation.* 1998;10:98(19 Suppl):II151-5; discussion II155-6.
- 69 He A, Jiang Y, Gui C, Sun Y, Li J, Wang JA. The antiapoptotic effect of mesenchymal stem cell transplantation on ischemic myocardium is enhanced by anoxic preconditioning. *Can J Cardiol.* 2009;25(6):353–358.
- 70 Nagaya N, Fujii T, Iwase T, Ohgushi H, Itoh T, Uematsu M, et al. Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;287(6):H2670–2676.
- 71 Ohnishi S, Yanagawa B, Tanaka K, Miyahara Y, Obata H, Kataoka M, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells attenuates myocardial injury and dysfunction in a rat model of acute myocarditis. *J Mol Cell Cardiol.* 2007;42(1):88–97
- 72 Koh GY, Soonpaa MH, Klug MG, Pride HP, Cooper BJ, Zipes DP, et al. Stable fetal cardiomyocyte grafts in the hearts of dystrophic mice and dogs. *J Clin Invest.* 1995;96(4):2034-42.

-
- 73 Suzuki K, Murtuza B, Suzuki N, Smolenski RT, Yacoub MH. Intracoronary infusion of skeletal myoblasts improves cardiac function in doxorubicin-induced heart failure. *Circulation*. 2001;104(12 suppl I):I-213-7.
- 74 Yoo KJ, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Jia ZQ, Kim EJ, et al. Heart cell transplantation improves heart function in dilated cardiomyopathic hamsters. *Circulation*. 2000;102(19 suppl III):III-204-9.
- 75 Ferreira ALA, Russell RM, Rocha N, Ladeira MSP, Salvadori DMF, Nascimento M, et al. Effect of lycopene on doxorubicin-induced cardiotoxicity: An echocardiographic, histological and morphometrical assessment. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2007; 101(1):16-24.
- 76 Bachner N, Tsadok Y, Adam D. Increase in endocardial rotation during doxorubicin treatment. *Ann NY Acad Sci*. 2010; 128-132.
- 77 Singal PK, Iliskovic N. Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 1998;339(13):900-5.
- 78 SISSON, D.; O'GRADY, M.R.; CALVERT, C.A. Myocardial diseases of dogs. In: FOX, P.R.; SISSON, D.; MOÏSE, N.S. Textbook of canine and feline cardiology. 2.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1999. cap.27, p.581-619.
- 79 Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, Feinberg MS, Etzion S, Tessone A, et al. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation*. 2003; 108(7):863-8.

- 80 Nakamuta JS, Danoviz ME, Marques FL, dos Santos L, Becker C, Gonçalves GA, Vassallo PF, Schettert IT, Tucci PJ, Krieger JE. Cell therapy attenuates cardiac dysfunction post myocardial infarction: effect of timing, routes of injection and a fibrin scaffold. *PLoS One*. 2009;4:e6005.