



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ**

ESCOLA DE MEDICINA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DA SAÚDE

**FABIANE BARCHIKI**

**ANÁLISE FUNCIONAL E MORFOLÓGICA DO MODELO  
EXPERIMENTAL DE INFARTO PARA ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS  
EM CARDIOLOGIA**

CURITIBA

2013

**FABIANE BARCHIKI**

**ANÁLISE FUNCIONAL E MORFOLÓGICA DO MODELO EXPERIMENTAL DE  
INFARTO PARA ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS EM CARDIOLOGIA**

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

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Slud Brofman

Co-orientador: Prof. Dr. Nelson Itiro Miyague

CURITIBA

2013

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por mais esta conquista.

Agradeço aos meus pais Hélio e Maridalva que sempre me ensinaram o valor e a importância de se obter o conhecimento como algo que é totalmente seu e ninguém pode lhe tirar.

A minha irmã Ihasmin pelos construtivos diálogos.

Ao meu irmão Pedro, que me demonstrou como é bom sorrir, que podemos superar dificuldades, reaprendendo a viver com limitações. E que devemos sempre lutar mesmo quando a vitória possa ser impossível. A saudade que sinto de você é imensa.

Ao meu noivo Ederson que sempre esteve comigo nas horas boas sorrindo e ruins me dando força quando mais precisei e que me incentivou a correr atrás de meus objetivos não me deixando desistir frente as dificuldades.

Ao apoio que recebi de minhas companheiras na busca pelo conhecimento Dra. Alexandra Cristina Senegaglia, Dra. Carmen Lúcia Kuniyoshi Rebelatto.

Aos integrantes do Laboratório Experimental de Cultivo Celular, em especial a Danielle Jackowski, Letícia Fracaro e Lidiane Maria Boldrini Leite que estão todos os dias compartilhando os resultados dos experimentos e muitas risadas.

Ao Luiz Guilherme Achcar Capriglione que não mediu esforços para manter nossos ratinhos vivos até o ultimo dia de experimento.

A Paula Hansen Suss pelo apoio no trabalho

Ao Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da PUCPR, Álvaro Roberto Gonçalves Machado e Misael Gomes Barbosa que sempre deram o apoio necessário ao desenvolvimento dos procedimentos cirúrgicos.

Ao Laboratório de Anatomia Patológica na Pesquisa Clínica e Experimental da PUCPR, Ana Paula Camargo, Marina de Azevedo e Prof<sup>a</sup> Dra. Lucia de Noronha que auxiliaram no processamento histológico de muitas amostras.

Ao Biotério da PUCPR, ao Rafael Zotz que sempre manteve o padrão de animais que precisávamos para a qualidade de nosso estudo.

A Prof<sup>a</sup> Dra. Marcia Olandoski pelo auxílio na compreensão e confecção dos dados estatísticos.

Ao Prof. Dr. Sérgio Adriane Bezerra de Moura pelas risadas e pelas maravilhosas aulas em forma de bate-papo que me ensinaram muito.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Nelson Itiro Miyague pela atenção, sorrisos, um grande companheiro durante a expectativa dos resultados do estudo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Roberto Slud Brofman pela gentileza, carinho e atenção todos estes anos.

## RESUMO

**Introdução:** A ocorrência do infarto do miocárdio destaca-se dentre as doenças cardiovasculares sendo necessário o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. A terapia com células-tronco tem este objetivo e para testá-las é necessário o desenvolvimento de pesquisas pré-clínicas com a utilização de modelos experimentais, que se assemelham a condição clínica. A metodologia de indução a doença tem de ser detalhada e haver o conhecimento das características morfofuncionais cardíacas do animal de modo a atestar a eficácia desta nova terapia. **Objetivo:** Avaliar as características morfofuncionais cardíacas de um modelo de indução ao infarto do miocárdio em ratos para utilização nas pesquisas em terapia celular. **Metodologia:** Este estudo foi aprovado no Comitê de Ética no Uso de Animais da PUCPR (Nº 540). Foram utilizados ratos Wistar, machos (4 meses de idade). Os animais foram divididos em quatro grupos: Sadio (S) não submetido a procedimento cirúrgico; Cirurgia Simulada (CS) submetido à cirurgia de indução do IAM sem oclusão da artéria coronária (AC); Evolução Natural (EN), com oclusão da AC e fração de ejeção (FE) <40%; Injeção Meio (IM), com oclusão da AC e FE <40%. FE foi avaliada sete dias após a indução da lesão. Dois dias depois, o grupo IM recebeu uma injeção de 200µL de Iscove's Modified Dulbecco's (IMDM). 30 dias após a injeção foi realizada nova avaliação da FE e eutanásia dos ratos. Os corações foram removidos, fixados, desidratados e embebidos em parafina. As secções de cinco micrômetros foram cortadas e coradas com hematoxilina eosina (HE) e tricrômico de Masson (TM). **Resultados:** A análise dos parâmetros ecocardiográficos possibilitou conhecer a função cardíaca em animais sadios e como esta é influenciada após a indução ao infarto do miocárdio, promovendo aumento da área do VE e redução na FE. Esta avaliação também demonstrou que a injeção do meio de cultura não promoveu nenhuma alteração funcional em relação aos animais do grupo EN. A avaliação morfológica em HE do grupo S permitiu a compreensão dos aspectos normais. O grupo CS demonstrou que o procedimento cirúrgico não causa alterações morfológicas quando comparado ao grupo S. O TM evidenciou nos grupos S e CS marcação para regiões distintas de fibras de colágeno no tecido conjuntivo perimuscular. Nos grupos EN e IM a coloração em HE demonstrou que o infarto promoveu um remodelamento tecidual com a morte de cardiomiócitos substituição por tecido conjuntivo fibroso. A coloração para TM revelou áreas de intensa substituição do miocárdio por tecido conjuntivo rico em fibras colágenas. **Conclusão:** Pelas avaliações morfofuncionais cardíacas conclui-se que a metodologia utilizada de indução ao infarto é eficaz no desenvolvimento da doença e a utilização da injeção de meio de cultura não promove alterações quando comparado aos animais que não receberam a injeção. Demonstrando que pode-se utilizar este modelo experimental nas pesquisas em terapia celular com o objetivo de reestabelecer a função cardíaca após o infarto do miocárdio e que pode-se utilizar o meio de cultura como veículo na administração da terapia celular.

Palavras chave: Infarto do miocárdio, Modelo experimental, Terapia celular, Morfologia cardíaca.

## ABSTRACT

**Introduction:** The occurrence of myocardial infarction stands out among cardiovascular diseases requiring the development of new therapeutic strategies. The stem cell therapy has this purpose and to test them is necessary to develop pre-clinical research with the use of experimental models, which resemble the clinical condition. The methodology of inducing the disease must be detailed and have knowledge of the cardiac morphofunctional characteristics of the animal in order to certify the effectiveness of this new therapy. **Objective:** Evaluate cardiac morphofunctional characteristics of a model to induce myocardial infarction in rats for use in research in cell therapy. **Methods:** This study was approved by the Ethics Committee on Animal Use of PUCPR (No. 540). We used male Wistar rats (4 months old). The animals were separated into four groups: Healthy (H) not undergo surgical procedures; Sham-operated (SH) underwent surgery induction of AMI with no occlusion of the coronary artery (CA); Natural Evolution (NE), with occlusion of the CA and ejection fraction (EF) <40%; Medium Injection (MI), with occlusion of the CA and EF<40%. EF was evaluated seven days after the lesion induction. Two days after, the group MI received an injection of 200 $\mu$ L of Iscove's Modified Dulbecco's (IMDM). 30 days after the injection was performed new evaluation of FE and euthanasia of rats. The hearts were removed, fixed, dehydrated and embedded in paraffin. Five micrometer sections were sliced and stained with hematoxylin/eosin (H&E) and Masson's trichrome (MT). **Results:** The analysis of echocardiographic parameters, allowed to know cardiac function in healthy animals and how this is influenced after induction with myocardial infarction, increasing the area LV and reduced EF. This evaluation also demonstrated that injection in the culture medium did not promote any functional alteration in relation to animals NE. The morphological evaluation of the group H allowed the understanding of the normal aspects. The SH group demonstrated that the surgical procedure did not cause morphological alterations when group H compare. The MT evidenced in the groups H and SH has marking for discrete regions of collagen fibers in the perimuscular connective tissue. In groups NE and MI myocardial infarction proved a tissue remodeling with death of cardiomyocyte replacement by fibrous connective tissue. The staining for MT revealed areas of intense replacement of myocardium by connective tissue rich in collagen fibers. **Conclusion:** By morphofunctional cardiac evaluations concluded that the methodology used to induce infarction is effective in disease development and use of injecting culture medium does not promote changes when compared to animals that did not receive the injection. Demonstrating that can use this model in experimental research in cell therapy with the objective of restore cardiac function after myocardial infarction and who can use the medium as a vehicle in the administration of cell therapy.

Key words: Acute myocardial infarction, Experimental model, Cell therapy, Cardiac morphology.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenho esquemático das três camadas que compõem a parede do coração. ....	18
Figura 2: Artéria coronária direita, artéria coronária esquerda (DAE e artéria circunflexa esquerda). ....	19
Figura 3: Obstrução da artéria coronária descendente anterior esquerda do coração. Em preto a oclusão da artéria e em verde a zona de infarto. ....	20
Figura 4: Desenvolvimento de um infarto do miocárdio em humanos: A) Miocárdio normal. B) Após 12 a 18 horas, o miocárdio infartado mostra eosinofilia (coloração avermelhada) nos cortes do coração corados com hematoxilina e eosina. C) Cerca de 24 horas após o início do infarto, neutrófilos polimorfonucleares se infiltram nos miócitos necróticos na periferia do infarto. D) Após cerca de 3 semanas, porções periféricas do infarto são compostas por tecido de granulação com proeminentes capilares, fibroblastos, células linfóides e macrófagos. Os restos necróticos foram em grande parte removidos dessa área e uma pequena quantidade de colágeno foi depositada. E) Depois de 3 meses ou mais, a região infartada foi substituída por tecido de cicatrização. ...	22
Figura 5: Delineamento das etapas e grupos do estudo. ....	32
Figura 6: Indução anestésica por via inalatória em campânula com algodão embebido em Halotano. ....	35
Figura 7: Manutenção anestésica por administração de máscara facial contendo algodão embebido em Halotano. ....	36
Figura 8: Sutura em bolsa com fio de algodão nº10. ....	36
Figura 9: Visualização da musculatura intercostal em relação a contração cardíaca para escolha do espaço intercostal para exposição cardíaca. ....	37
Figura 10: Ventilação pulmonar manual. ....	37
Figura 11: Oclusão da artéria coronária descendente anterior. A seta indica a artéria. ....	38
Figura 12: Toracorráfia. ....	38
Figura 13: Monitoramento cardíaco. ....	40
Figura 14: Avaliação ecocardiográfica. ....	40
Figura 15: Corte paraesternal longitudinal do coração. ....	41

Figura 16: Desenho esquemático das regiões do coração visualizadas durante a ecocardiografia.....	41
Figura 17: Obtenção da via aérea por meio de intubação orotraqueal.....	43
Figura 18: Toracotomia mediana.....	44
Figura 19: Injeção de meio na área de transição entre o tecido lesionado e sadio. ....	44
Figura 20: Toracotomia mediana para retirada do coração.....	45
Figura 21: Fixação do órgão em formalina 10%.....	47
Figura 22: Clivagem da amostra em quatro fragmentos paralelos após a fixação. ....	47
Figura 23: Acondicionamento da amostra em cassete para processamento histológico. ....	48
Figura 24: Bloco em parafina contendo a amostra.....	48
Figura 25: Lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina possibilitando a identificação do ventrículo esquerdo (VE) e possíveis locais com lesão.....	50
Figura 26: Desenho esquemático do corte transversal do coração, demonstrando área de transição entre tecido isquêmico e sadio, e a área infartada. ....	51
Figura 27: A- Desenho esquemático do plano cartesiano de identificação do bloco de TMA, composto por dez indivíduos com duas amostras, uma da área de transição e outra da área infartada. B- Bloco em parafina contendo o TMA. ....	51
Figura 28: Aparência do coração saudável após remoção do órgão. ....	64
Figura 29: Aparência do coração infartado, após a remoção do órgão.....	65
Figura 30: Visão macroscópica dos cortes corados em Hematoxilina e Eosina. A) grupo S; B) grupo CS; C) grupo EN; D) CS. VE= ventrículo esquerdo, VD= ventrículo direito. ....	66
Figura 31: Coloração HE, apresentando os grupos de estudo nos aumentos de 100x e 400x na região central do VE. + = aspecto normal, * = remodelação tecidual.....	67
Figura 32: Coloração HE, apresentando os grupos de estudo nos aumentos de 100x e 400x na região lateral do VE. + = aspecto normal, * = remodelação tecidual.....	68



Figura 33: Coloração Tricrômio de Masson, apresentando os grupos de estudo nos aumentos de 100x e 400x na região central do VE.. + = aspecto normal, \* = deposição de colágeno. .... 70

Figura 34: Coloração Tricrômio de Masson, apresentando os grupos de estudo nos aumentos de 100x e 400x na região lateral do VE.. + = aspecto normal, \* = deposição de colágeno. .... 71

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Apresentação dos números de animais utilizados: óbitos, momento do óbito, aprovação dentre os critérios de inclusão no estudo. NA – não se aplica.	54
Tabela 2- Comparação da Média, Mediana, Mínimo, Máximo, Desvio Padrão do peso obtido nos diferentes grupos nas duas avaliações. ....	55
Tabela 3 - Comparações entre os valores de $p$ obtidos das variáveis de peso dos animais. ....	56
Tabela 4 - Comparação entre os valores de $p$ entre os momentos de avaliação do Peso. ....	56
Tabela 5 – Comparação da Média, Mediana, Mínimo, Máximo, Desvio Padrão da Frequência Cardíaca obtida nos diferentes grupos nas duas avaliações. ....	57
Tabela 6 - Comparação entre os valores de $p$ entre os momentos de avaliação da Frequência Cardíaca. ....	58
Tabela 7 – Comparação da Média, Mediana, Mínimo, Máximo, Desvio Padrão da ADF obtida nos diferentes grupos nas duas avaliações. ....	58
Tabela 8 – Comparações entre os valores de $p$ obtidos das variáveis da Área Diastólica Final dos animais. ....	59
Tabela 9 – Comparação entre os valores de $p$ entre os momentos de avaliação da Área Diastólica Final. ....	60
Tabela 10 – Comparação da Média, Mediana, Mínimo, Máximo, Desvio Padrão da Área Sistólica Final obtida nos diferentes grupos nas duas avaliações. ....	60
Tabela 11 – Comparações entre os valores de $p$ obtidos das variáveis da Área Sistólica Final dos animais. ....	61
Tabela 12 – Comparação entre os valores de $p$ entre os momentos de avaliação da Área Sistólica Final. ....	62
Tabela 13 - Comparação da Média, Mediana, Mínimo, Máximo, Desvio Padrão da FE obtida nos diferentes grupos nas duas avaliações. ....	62
Tabela 14 - Comparações entre os valores de $p$ obtidos das variáveis da FE dos animais. ....	63
Tabela 15- Comparação entre os valores de $p$ entre os momentos de avaliação da FE. ....	64

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Apresentação da média, mediana e desvio padrão da mensuração do Peso dos animais nas duas avaliações.....	55
Gráfico 2 – Apresentação da média, mediana e desvio padrão da mensuração da Frequência Cardíaca nas duas avaliações.....	57
Gráfico 3 – Apresentação da média, mediana e desvio padrão da mensuração da Área Diastólica Final do VE nas duas avaliações. ....	59
Gráfico 4 – Apresentação da média, mediana e desvio padrão da mensuração da ASF do VE nas duas avaliações. ....	61
Gráfico 5 - Apresentação da média, mediana e desvio padrão da mensuração da FE do VE nas duas avaliações.....	63

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AC – artéria coronária
- ADF– área diastólica final
- Ang II – angiotensina II
- ASF– área sistólica final
- ATP – trifosfato de adenosina (do inglês *adenosine triphosphate*)
- CEUA-PUCPR – Comitê de Ética em Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná
- COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
- CS – cirurgia simulada
- CT – célula-tronco
- CTM – célula-tronco mesenquimal
- CTMO – célula-tronco da medula óssea
- DAE – artéria descendente anterior esquerda
- EN – evolução natural
- FE – fração de ejeção
- g – grama
- HE – hematoxilina e eosina
- IM – injeção de meio
- IMDM – Iscove's Modified Dulbecco's
- LSD – diferença mínima significativa (do inglês *least significant difference*)
- NA – não se aplica
- $p$  – nível de significância estatística
- PBS – tampão fosfato-salina (do inglês *phosphate buffer saline*)
- PUCPR – Pontifícia Universidade Católica do Paraná
- S – animais sadios
- SHAM – simulação (do inglês *SHAM*)
- TGF- $\beta$  – fator de transformação do crescimento beta (do inglês *transforming growth factor beta*)
- TM – Tricrômio de Masson
- TMA – micro arranjo de tecidos artesanal (do inglês *tissue microarray*)
- VE– ventrículo esquerdo

VEGF– Fator de crescimento do endotélio vascular (do inglês *vascular endothelial growth factor*)

VDF– volume diastólico final

VSF– volume sistólico final

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	O coração e a doença isquêmica cardíaca .....	17
2.2	Regeneração cardíaca e células-tronco.....	22
2.3	O rato Wistar como modelo experimental .....	24
2.4	Avaliação ecocardiográfica .....	27
2.5	Histopatologia .....	29
3	OBJETIVO .....	30
4	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
5	METODOLOGIA .....	31
5.1	Desenho do estudo .....	31
5.2	Grupos de estudo.....	32
5.3	Pesagem dos animais.....	33
5.4	Indução ao infarto do miocárdio.....	33
5.5	Avaliação ecocardiográfica .....	39
5.6	Injeção de meio de cultura .....	42
5.7	Eutanásia .....	45
5.8	Fixação e embocagem do coração .....	46
5.9	Coloração em hematoxilina e eosina .....	49
5.10	Confecção do micro arranjo de tecido artesanal .....	50
5.11	Avaliação histológica do TMA .....	52
5.11.1	Coloração tricrômio de Masson .....	52
5.12	Análise estatística .....	53
6	RESULTADOS.....	53
6.1	Mortalidade dos animais no decorrer do estudo .....	53
6.2	Variação do peso .....	54
6.3	Avaliação ecocardiográfica .....	56
6.3.2	Frequência cardíaca .....	56
6.3.3	Área diastólica final.....	58
6.3.4	Área sistólica final.....	60
6.3.5	Fração de ejeção .....	62

6.4 Avaliação morfológica .....	64
6.4.1 Hematoxilina e eosina.....	65
6.4.2 Tricrômio de Masson .....	69
7 DISCUSSÃO.....	72
8 CONCLUSÃO .....	80
9 REFERÊNCIAS .....	81
10 ANEXO .....	88
10.1 Parecer do Comitê de Ética em Uso de Animais da PUCPR 1ª Versão ..	88
10.2 Parecer do Comitê de Ética em Uso de Animais da PUCPR 2ª Versão ..	89
10.3 Parecer do Comitê de Ética em Uso de Animais da PUCPR 3ª Versão ..	90
10.4 Parecer do Comitê de Ética em Uso de Animais da PUCPR 3ª Versão, Título do Projeto Atualizado .....	91
10.5 Apresentação de resumo na Mostra de Pesquisa da Pós-Graduação PUCPR .....	93
10.6 Prêmio.....	94
10.7 XIII Mostra de Pesquisa da Pós-graduação PUCPR .....	95
10.8 Apresentação de resumo no 6º Congresso Brasileiro de Células-tronco e Terapia Celular .....	96
10.9 Submissão do Artigo: Comparison of two surgical techniques for creating na acute myocardial infarct in rats .....	97
10.10 Apresentação de resumo no 7º Congresso Brasileiro de Células-tronco e Terapia Celular .....	98

# 1 INTRODUÇÃO

Pesquisadores buscam por novas abordagens terapêuticas para recuperar a função de órgãos ou tecidos lesados. Dentre as novas tecnologias desenvolvidas para esta recuperação tem-se o uso de biomateriais que se assemelhem aos sistemas biológicos e a o uso da terapia celular que procura recuperar ou substituir o tecido que não desempenha mais sua função adequadamente. A terapia celular teve início com a transfusão de sangue, posteriormente o transplante de medula óssea e como a descoberta das células-tronco (CT) a busca pela recuperação de tecidos específicos.

O conhecimento das CT, que possuem a capacidade de se diferenciar em tipos celulares específicos de modo a auxiliar em reparos em todo organismo tornaram-se objeto de estudo. Presentes desde o embrião até a vida adulta seu uso terapêutico está em teste em diferentes áreas como na hematologia, endocrinologia, dermatologia, neurologia, oftalmologia, pneumologia, doenças autoimune, ortopedia e cardiologia. Na cardiologia os ensaios *in vitro* e *in vivo* procuram recuperar o coração lesado. Os testes pré-clínicos utilizam modelos animais que possuem uma fisiologia semelhante a humana possibilitando a avaliação da capacidade de recuperação e segurança. Um modelo muito utilizado é o rato, a indução a doença neste modelo é realizada por um estímulo químico ou um procedimento cirúrgico. No caso do infarto do miocárdio o procedimento cirúrgico se demonstra eficaz. Há várias descrições de metodologias de indução a doença, sendo importante a utilização de um protocolo bem descrito com caracterização funcional e morfológica do modelo sadio e após o desenvolvimento da doença. Possibilitando avaliar se a terapia celular proporciona um efeito benéfico recuperando o coração.



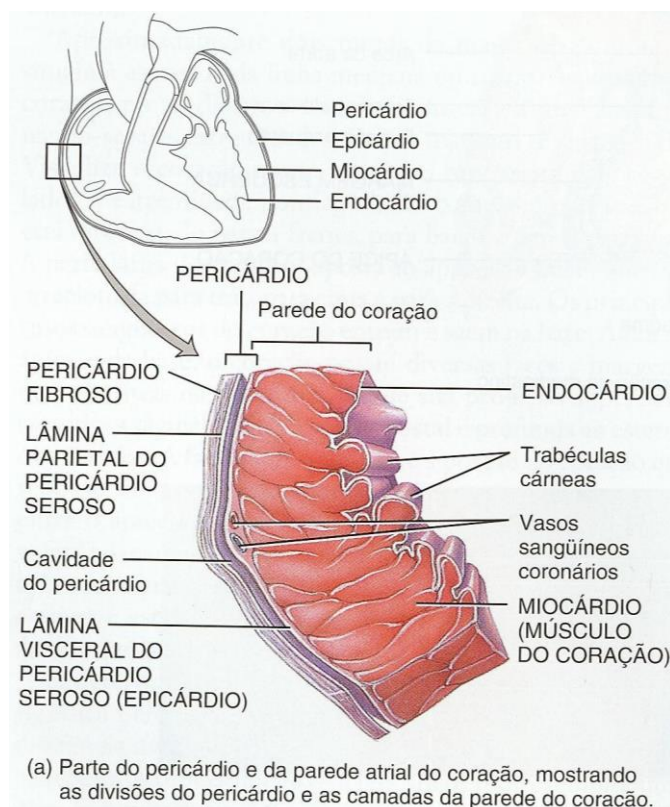
## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O coração e a doença isquêmica cardíaca

O coração dos mamíferos funciona como duas bombas independentes entre as quais está interposta a circulação pulmonar, que devem trabalhar em regime de fluxo constante e pressões variáveis, pois a circulação pulmonar é cinco vezes menos resistente que a circulação geral. O arranjo anatômico-funcional proporciona a homeostase dos gases oxigênio e gás carbônico e de outras substâncias. É necessária que uma câmara do coração funcione num regime de pressão muito baixo facilitando o retorno de sangue pelo sistema venoso, e uma câmara de saída com força suficiente para bombear o sangue de modo a garantir a circulação em todo organismo. Este bombeamento ocorre pela contração do músculo cardíaco. A geometria do órgão que é composta por cavidades, feixes musculares e sistema de valvas permite transferir a energia da contração gerada na parede para o sangue contido na cavidade (KRIEGER, 2008 p.239).

O sangue entra nos ventrículos pelas valvas atrioventriculares, a valva mitral no lado esquerdo e a valva tricúspide no lado direito. Os folhetos dessas valvas são sustentados pelas cordoalhas tendíneas, que são cordões tendinosos fortes ligados pelos músculos papilares à superfície interna da parede ventricular. As artérias aorta e pulmonar são guarnecidas pelas valvas aórticas e pulmonar, respectivamente, cada uma contendo três válvulas semilunares. A parede do coração é composta por três camadas: o epicárdio mais externo, miocárdio no meio e endocárdio internamente (Figura 1). O coração é circundado e envolvido pelos pericárdios visceral e parietal, que estão separados pela cavidade pericárdica (RUBIN, 2006 p. 536).

Figura 1: Desenho esquemático das três camadas que compõem a parede do coração.



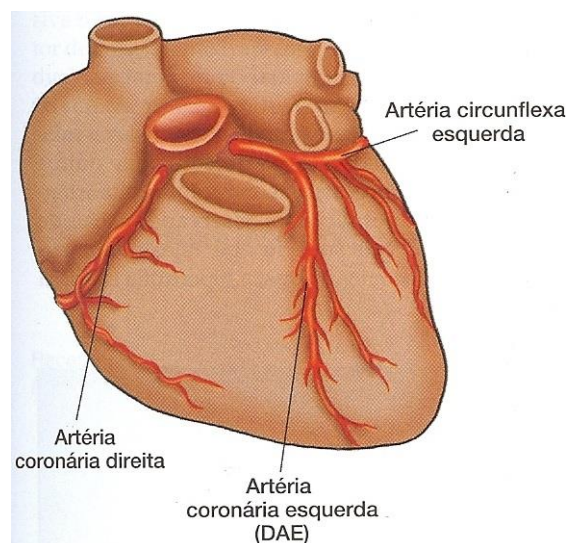
Fonte: RUBIN, 2006.

A entrada e saída de sangue no coração é regulada pelo ciclo cardíaco, que se refere a um padrão repetitivo de contração e relaxamento do músculo cardíaco. A fase de contração denomina-se sístole e a de relaxamento diástole. Estes termos podem ser utilizados para referendar tanto átrios quanto ventrículos. A contração atrial ocorre próximo do final da diástole quando os ventrículos estão relaxados. Quando os ventrículos se contraem durante a sístole, os átrios estão relaxados. Durante o tempo em que tanto os átrios como os ventrículos estão relaxados, o retorno de sangue venoso enche os átrios. O aumento de pressão resultante faz com que as válvulas atrioventriculares se abram e que o sangue flua dos átrios para os ventrículos. O ventrículo direito bombeia o sangue para os pulmões onde ocorrerão trocas gasosas oxigenando o sangue e o ventrículo esquerdo bombeia o sangue para a aorta que será distribuída na circulação sistêmica (FOX, 2007 pag. 381).

A irrigação no coração é realizada pelas artérias coronárias esquerda e direita que se originam nos seios de Valsalva da valva aórtica, ou imediatamente

acima deles. Nos humanos o tronco da artéria coronária esquerda se bifurca, no primeiro e segundo centímetro de sua origem, nas artérias descendente anterior esquerda (DAE) e circunflexa. A artéria coronária DAE está situada no sulco interventricular anterior e fornece sangue para a porção anterior do ventrículo esquerdo, parte anterior do ventrículo direito adjacente e metade a dois terços anteriores do septo interventricular. Na região apical, a artéria DAE alimenta os ventrículos circunferencialmente (Figura 2) (RUBIN, 2006 p. 538).

Figura 2: Artéria coronária direita, artéria coronária esquerda (DAE e artéria circunflexa esquerda).



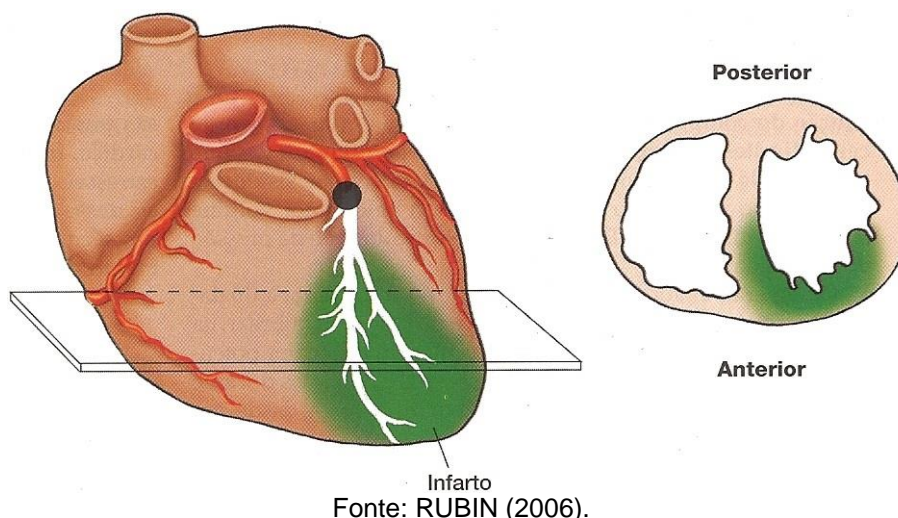
Fonte: RUBIN (2006).

O fluxo sanguíneo no miocárdio ocorre de fora para dentro, ou seja, a partir do epicárdio para o endocárdio. Assim o endocárdio é mais vulnerável a isquemia quando o fluxo através de uma importante artéria coronária é comprometido (RUBIN, 2006 p. 538).

A cardiomiopatia isquêmica é caracterizada pela obstrução da circulação coronária (Figura 3), e é a mais comum dentre as doenças cardiovasculares (LOPES et al., 2009). Apresentam duas formas de lesões, uma com perda de um segmento específico do miocárdio e outra com múltiplas áreas lesionadas com grande cicatriz na parede ventricular (KAJSTURA et al., 2008). Muitos pacientes sobrevivem ao infarto do miocárdio, porém progridem para a disfunção ventricular esquerda (GOWDAK e SCHETTERT, 2005; KRIEGER, 2008 p.481).

No Brasil a doença isquêmica do coração é a segunda maior causa específica de óbito (DATASUS, 2011; MANSUR & FAVARATO, 2012).

Figura 3: Obstrução da artéria coronária descendente anterior esquerda. Em preto a oclusão da artéria e em verde a zona de infarto.



No infarto do miocárdio ocorre uma disfunção que leva ao baixo débito cardíaco, e o coração procura realizar alterações compensatórias, com variações moleculares, celulares e intersticiais. Em casos mais graves ocorre o risco de morte (MATSUBARA E ZORNOFF, 1995). Estas alterações procuram reestabelecer a função normal do coração que durante a sístole com a contração dos ventrículos ejetam cerca de 60% do sangue presente no ventrículo ao final da diástole caracterizando a fração de ejeção (FE) (RUBIN, 2006 p. 538).

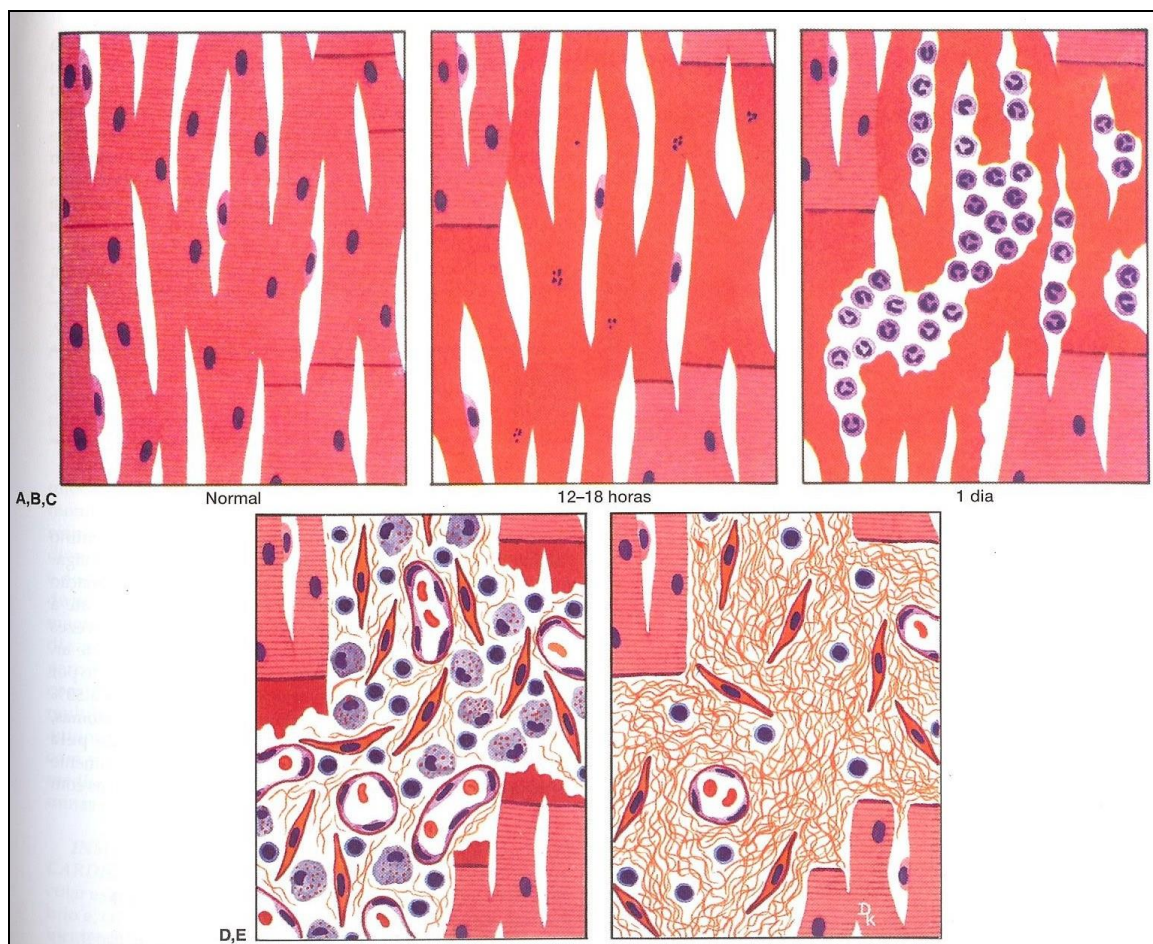
O infarto do miocárdio provocado pela interrupção do fluxo sanguíneo em uma região do músculo cardíaco tem como consequência a hipóxia tecidual e necrose devido a morte dos cardiomiócitos. A falta de oxigênio na célula compromete a fosforilação oxidativa mitocondrial, perdendo a produção de ATP (adenosina trifosfato). Na falta de ATP a via glicolítica anaeróbia é incrementada, gerando acúmulo de lactato e de íons de hidrogênio. A acidose intracelular inibe a glicólise quanto ao metabolismo de ácidos graxos. A deficiência de ATP promove alterações nos sistemas de transporte de íons tanto das organelas como da membrana celular. O trocador iônico  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPase é inibido, intensificando a perda de  $\text{K}^+$  e incrementando os níveis de  $\text{Na}^+$ . O influxo de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e água ocasiona o intumescimento da célula.

Ocorre ainda o aumento de  $\text{Ca}^{++}$  citosólico, o que induz a ativação de proteases e fosfolipases que clivam o citoesqueleto. A degradação dos fosfolípidios e as alterações no metabolismo dos ácidos graxos alteram a fluidez e a função da membrana provocando um aumento da permeabilidade que resulta na ruptura desta. Em consequência da liberação do conteúdo citoplasmático no espaço extracelular gera uma resposta inflamatória aguda que vem a prejudicar as células adjacentes (KRIEGER, 2008 p.544).

Na reparação tecidual, macrófagos, neutrófilos, fibroblastos e células endoteliais são recrutados para a região afetada por vias específicas envolvendo citocinas, alterações de matriz extracelular e moléculas de adesão (GOWDAK et al., 2004; GOWDAK e SCHETTERT, 2005; KRIEGER, 2008 p.481; NOVOTNY et al., 2008; LOPES et al., 2009). Os fibroblastos produzidos aumentam a quantidade de colágeno, o ventrículo infartado torna-se remodelado e muitas semanas depois o miocárdio é substituído por tecido fibrótico de baixa celularidade (Figura 4). Estas mudanças estruturais promovem alterações funcionais como o aumento do ventrículo esquerdo, diminuição da FE, alteração da massa e geometria cardíaca (MATSUBARA E ZORNOFF, 1995; SOUZA, 2005; PSALTIS et al., 2008).



Figura 4: Desenvolvimento de um infarto do miocárdio em humanos: A) Miocárdio normal. B) Após 12 a 18 horas, o miocárdio infartado mostra eosinofilia (coloração avermelhada) nos cortes do coração corados com hematoxilina e eosina. C) Cerca de 24 horas após o início do infarto, neutrófilos polimorfonucleares se infiltram nos miócitos necróticos na periferia do infarto. D) Após cerca de 3 semanas, porções periféricas do infarto são compostas por tecido de granulação com proeminentes capilares, fibroblastos, células linfóides e macrófagos. Os restos necróticos foram em grande parte removidos dessa área e uma pequena quantidade de colágeno foi depositada. E) Depois de 3 meses ou mais, a região infartada foi substituída por tecido de cicatrização.



Fonte: RUBIN (2006).

## 2.2 Células-tronco na Regeneração cardíaca

O melhor entendimento dos complexos processos de reparação tecidual permitiu o surgimento de novas estratégias terapêuticas, entre elas a terapia celular, a qual visa evitar ou reverter a perda celular e o declínio funcional do órgão após o infarto do miocárdio (GOWDAK e SHETTERT, 2005; NOVOTNY et al., 2008).

Uma grande variedade de células está em teste, disponibilizando dados pré-clínicos e clínicos da eficácia funcional e segurança relacionada ao risco de rejeição destas no tratamento do infarto do miocárdio, dentre as quais incluem as células-tronco embrionárias (RUFAlHAH et al., 2010), os mioblastos esqueléticos (ZHU et al., 2009), as células mononucleares da medula óssea (OBRADOVIĆ et al., 2009), as células progenitoras circulantes como as progenitoras endoteliais (RUFAlHAH et al., 2010; SENEGAGLIA et al., 2010), as células-tronco mesenquimais (CTM) (MIN et al., 2002a; REBELATTO et al., 2008; BROFMAN et al., 2004; ZHU et al., 2009; BERARDI, 2010; BERARDI et al., 2011) e as células-tronco residentes cardíacas (DAWN et al., 2005; NOVOTNY et al., 2008; ORTAK et al., 2008; HWANGBO et al., 2010).

Há vários aspectos a serem elucidados com relação ao melhor tipo celular como: fonte, via de transplante, estágio da doença para o transplante (MOTA; SOARES; SANTOS, 2005), modelo animal e protocolo de indução de infarto a ser utilizado (SOUZA, 2005). Pesquisas utilizando as CT da medula óssea, demonstraram sua eficácia na recuperação da função cardíaca (ORLIC et al., 2001; PIAO et al., 2005; JIANG et al., 2006; HOU et al., 2007) e comprovaram que a injeção das células promove a melhora da perfusão e desempenho contrátil do coração (KOCHER et al., 2001; BERARDI, 2010; BERARDI et al., 2011).

A melhora observada pode ser devido a três fatores: diferenciação em cardiomiócitos, fusão das CT com células existentes no próprio tecido e devido aos efeitos parácrinos sobre as células vizinhas (BREHM; STANSKE; STRAUER, 2008; STRAUER; BRHEM; SCHANNWELL, 2008; NOVOTNY et al., 2008). Foi demonstrado que os efeitos parácrinos são importantes no benefício do transplante e resultam em um aumento da espessura da parede do ventrículo esquerdo, reduzindo o remodelamento patológico, promovendo a função de contratilidade ventricular em pacientes pós-infarto do miocárdio (BOCCHI e ISSA, 2003; NOVOTNY et al., 2008). Estes efeitos também podem ser antiapoptóticos para as CT residentes ou induzir a diferenciação destas células em progenitores mais comissionados. Além disso, as CT podem ser mobilizadas

da medula óssea para a circulação e subsequentemente para o local da lesão (VRIJSEN et al., 2009).

Desde a primeira descrição do uso de CT para o tratamento da doença cardíaca (TOMITA, et al., 1999) diferentes técnicas de isolamento foram testadas, o número de estudos clínicos publicados aumentou e demonstrou a segurança e eficácia destas células em diversas condições clínicas (BREHM; STANSKE; STRAUER, 2008; STRAUER; BRHEM; SCHANNWELL, 2008), no Brasil estes estudos começaram em 2002 (SCHETTERT, 2008).

Mais estudos são necessários para estabelecer os verdadeiros efeitos terapêuticos do transplante de CT na disfunção cardíaca, e devem avaliar a sobrevivência, proliferação e diferenciação desta no local lesionado e se há melhoria do tecido danificado (VRIJSEN et al., 2009).

### **2.3 O rato Wistar como modelo experimental**

O Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) elaborou uma série de princípios a serem analisados na escolha do modelo experimental a ser utilizado. Os animais selecionados devem ser de espécie, qualidade, quantidade, facilidade no manuseio e execução do procedimento técnico e de custo operacional apropriado ao estudo (MINICUCCI et al., 2007). É dever do pesquisador proporcionar assistência ao animal em sua dieta e higiene, com utilização de drogas anestésicas, analgésicos e antibióticos no período pós-operatório (COBEA, 1991).

FAGUNDES e TAHA (2004) defendem a utilização dos modelos animais e propõem a nomenclatura “modelos de animais em doenças da espécie humana” cujos mecanismos patológicos são suficientemente similares aqueles de uma doença humana. Esta doença pode ser tanto induzida como de ocorrência natural. A utilização do modelo animal tem sido desenvolvida para estudo das causas, mecanismos e terapêutica das doenças humanas, proporcionando o conhecimento da melhor espécie a ser utilizada como modelo, a viabilidade do procedimento, as consequências fisiopatológicas e a eficácia terapêutica.



O uso tradicional de algumas espécies acaba por consagrar alguns modelos experimentais que se tornam de uso frequente, devendo ter características suficientes para ser semelhante ao objeto imitado e ter a suficiente capacidade de ser manipulado sem as limitações do objeto imitado. A maior limitação no desenvolvimento de pesquisas com utilização de seres humanos é a limitação ética, pois são necessários uma série de requisitos de modo a resguardar a integridade física e psicoemocional dos investigados, e ainda há as limitações inerentes a própria doença. Portanto é necessária a utilização de modelos experimentais para a investigação das doenças (FAGUNDES e TAHA, 2004).

Para a realização de um estudo é preciso a avaliação de um Comitê de Ética que normatiza os critérios da pesquisa e proporciona ao investigado todo esclarecimento e informação a respeito dos eventuais benefícios ou malefícios da conduta proposta (PINHEIRO e ACRA, 2007). Há mais de cento e cinquenta anos os modelos animais têm sido desenvolvidos para estudo das causas, mecanismos e terapêutica. O modelo animal de doença foi criado para contornar obstáculos de ordem ética e de operacionalização na pesquisa dos motivos causais de doenças em seres humanos (FAGUNDES e TAHA, 2004).

O modelo animal proporciona melhor compreensão da fisiopatologia e desenvolvimento de novos tratamentos terapêuticos. Para o estudo da insuficiência cardíaca utiliza-se modelos experimentais que simulam esta doença em humanos (SOUZA, 2005).

Um modelo amplamente utilizado é o rato, pois nele é possível realizar a indução da disfunção e hipertrofia cardíaca e uma variedade de intervenções, de maneira a se aproximar da condição clínica (GABALLA e GOLDMAN, 2002; MINICUCCI et al., 2011).

Segundo SOUZA (2005) e MINICUCCI e colaboradores (2011) o infarto do miocárdio em ratos determinado pela oclusão da artéria coronária esquerda, provoca dilatação do VE, e mostra similaridade com a fase de remodelação ventricular após o infarto do miocárdio em humanos na prática clínica. Esta melhor compreensão da fisiopatologia da doença proporciona o desenvolvimento de novos tratamentos terapêuticos para a disfunção cardíaca. Dentre estes

tratamentos, está a terapia celular, que é amplamente estudada em experimentos utilizando o rato como modelo animal (ETZION et al., 2001; MIN et al., 2002 ; BROFMAN, et al., 2004; SALEMI et al., 2004; DAWN et al., 2005; GELAPE et al., 2005; TANG et al. 2005; PIAO et al. 2005; HOU et al. 2007; WERNECK-DE-CASTRO et al., 2006; MINICUCCI et al., 2007; WANG et al., 2008; SANTOS et al., 2008; PABIS et al., 2008; KRIEGER, 2008 p.130; BERARDI et al., 2010; LOUZADA et al., 2010; BERARDI et al., 2011; KANASHIRO-TAKEUCHI et al., 2011; MINICUCCI et al.,2011; GOVINDAN et al., 2012; GAO et al., 2011).

A anatomia cardíaca do rato é composta por dois átrios e dois ventrículos, separados por valvas atrioventriculares (RODRIGUES et al., 1999). Sua artéria coronária esquerda tem a função de irrigar o VE e pode ser vista a olho nu, a oclusão desta artéria ocasiona o infarto. O remodelamento fisiopatológico ventricular após o infarto do miocárdio em ratos é similar ao que acontece em humanos (MINICUCCI et al., 2011). No decorrer de 21 dias ocorre o remodelamento tecidual, iniciado pelo afinamento da parede do miocárdio na região do infarto com distensão muscular ocasionado pela morte dos cardiomiócitos. O tecido necrótico é absorvido e substituído por tecido fibroso (MINICUCCI et al., 2007). Já na área não infartada do músculo cardíaco há um espessamento devido a hipertrofia pelo aumento de estresse de maneira a manter a função mecânica do ventrículo (GABALLA e GOLDMAN, 2002). Este remodelamento gera uma cicatriz, com intensa deposição de colágeno (GABALLA e GOLDMAN, 2002).

Além da similaridade morfofuncional há outras vantagens em se utilizar ratos como modelo experimental de infarto do miocárdio, dentre elas podemos citar: a oclusão cirúrgica é facilmente realizada e não requer equipamentos sofisticados; a viabilidade econômica na aquisição e manutenção dos animais. Os corações são pequenos, por isso facilitando sua total avaliação histológica frente ao infarto do miocárdio, e, principalmente, demonstram reprodutibilidade dos resultados nos estudos pré-clínicos (FISHBEIN et al., 1978; MINICUCCI et al., 2007). Consequentemente possibilita a avaliação da eficácia de novas

terapias de maneira a melhorar a função cardíaca (SENEGAGLIA et al., 2010, LOUZADA et al., 2010).

As cepas de ratos mais utilizadas como modelo pré-clínico são a Sprague-Dawley e a Wistar. Há vários estudos que induzem o infarto do miocárdio no rato Wistar e utilizam a terapia celular como tentativa de promover a recuperação do órgão lesado (BROFMAN, et al., 2004; SALEMI et al., 2004; WERNECK-DE-CASTRO et al., 2006; PABIS et al., 2008; BERARDI et al., 2010; BERARDI et al., 2011; KANASHIRO-TAKEUCHI et al., 2011; MINICUCCI et al.,2011).

## **2.4 Avaliação ecocardiográfica**

A remodelação cardíaca decorrente do infarto do miocárdio promove alterações na composição, na massa, no volume e na geometria ventricular. A presença e a intensidade desta remodelação estão diretamente associadas ao aparecimento e a progressão da disfunção ventricular (MINICUCCI et al., 2011).

Como método de avaliação da gravidade do infarto do miocárdio *in vivo* é utilizado o exame ecocardiográfico, que em virtude dos avanços tecnológicos nos equipamentos de imagem ultra-sonográfica permitem apresentar resolução espacial e temporal de modo a se obter imagens acuradas. Pode ainda determinar o tamanho das câmaras cardíacas, massa ventricular, avaliação hemodinâmica e quantificação de valvopatias. É um exame não invasivo e é utilizado na maioria das investigações pré-clínicas nos estudos em cardiologia em animais de laboratório (MIN et al., 2002 ; BROFMAN, et al., 2004; SALEMI et al., 2004; DAWN et al., 2005; GELAPE et al., 2005; TANG et al. 2005; PIAO et al. 2005; HOU et al. 2007; WERNECK-DE-CASTRO et al., 2006; MINICUCCI et al., 2007; WANG et al., 2008; SANTOS et al., 2008; PABIS et al., 2008; KRIEGER, 2008 p.130; BERARDI et al., 2010; BERARDI et al., 2011; KANASHIRO-TAKEUCHI et al., 2011; MINICUCCI et al.,2011; GOVINDAN et al., 2012; GAO et al., 2011).

A imagem ultra-sonográfica tem o potencial de substituir técnicas mais invasivas. A ecocardiografia transtorácica pode avaliar a morfologia e a função

do VE, determinando o débito cardíaco o que substitui o uso de implante cirúrgico de transdutores para a medida do fluxo aórtico (KRIEGER, 2008 p.130).

As ondas de ultrassom são vibrações geradas mecanicamente que induzem refrações e compressões alternadas de qualquer meio que atravessam. O transdutor utilizado em coração de rato opera em frequências de 5 a 12 MHz, e quanto maior a frequência utilizada menor é o poder de penetração. Como o rato é um animal pequeno o uso de transdutores de alta frequência possibilita uma boa resolução temporal com capacidade de distinção entre dois eventos no tempo. A resolução temporal é determinada pelo número de quadros que pode ser adquirido por segundo geralmente expresso em Hz, não sendo empecilho para a obtenção de imagem mesmo com 300 a 500 batimentos cardíacos por minuto. As ondas de ultrassom atravessam os meios como um feixe, obedecendo aos princípios físicos de reflexão e refração. Quando um feixe de ultrassom é direcionado ao coração, propaga-se em linha reta, até encontrar a superfície de contato entre dois meios com impedância acústica diferentes, como por exemplo, entre o sangue e o músculo cardíaco. Nesta superfície, parte do ultrassom é refletida, voltando ao transdutor, e parte é refratada, continuando seu trajeto em direção a estruturas mais profundas. As imagens cardíacas são formadas a partir do ultrassom refletido pelas diferentes superfícies, ou ecos, e construídas de forma que sejam mostradas as distâncias percorridas pelo feixe de ultrassom para atingir as diferentes estruturas cardíacas (KRIGER 1993, p.131).

Os parâmetros ecocardiográficos avaliados após infarto do miocárdio do VE são: frequência cardíaca, área e volume sistólico e diastólico final e FE, possibilitando a avaliação morfológica e funcional do miocárdio *in vivo* (GOWDAK e SHETTERT, 2005; NOVOTNY et al., 2008).

Muitos pesquisadores tomam como critério a inclusão nos estudos somente dos animais que apresentam uma disfunção ventricular grave que é caracterizada pela FE menor que 40% no exame ecocardiográfico (GELAPE et al., 2005; MINICUCCI et al., 2007; PABIS et al., 2008; SENEGAGLIA et al., 2010; TUCCI et al., 2011). Para obtenção das medidas dos diâmetros sistólico final e diastólico final e a espessura de parede do VE utilizamos o plano paraesternal

longitudinal pela ecocardiografia bidimensional ou pelo modo M. Essas medidas devem ser obtidas perpendiculares ao eixo longitudinal do VE, sempre com o auxílio do traçado eletrocardiográfico. Os volumes ventriculares e a FE são geralmente calculados usando algoritmos baseados na geometria do VE. A FE do VE pode ser estimada a partir dos diâmetros ventriculares, mas este método possui limitações quando há alterações da contração segmentar ou na geometria do VE, sendo utilizado o método Simpson, no qual os volumes ventriculares são medidos a partir de imagens de planos apicais ortogonais de quatro e duas câmaras na diástole e na sístole (KRIGER 1993, p.132).

Há pesquisas que realizam a avaliação ecocardiográfica pré e pós-tratamento comparando os valores obtidos para determinar se a terapia foi efetiva (SALEMI et al., 2004; DAWN et al., 2005; TANG et al. 2005; PIAO et al. 2005; HOU et al. 2007; WERNECK-DE-CASTRO et al., 2006; WANG et al., 2008; KANASHIRO-TAKEUCHI et al., 2011; MINICUCCI et al., 2011) uma outra metodologia para avaliar se a terapia proporciona benefício é utilizar animais com disfunção grave e avaliar após tratamento se ocorre alguma melhora clínica (BROFMAN, et al., 2004; PABIS et al., 2008; BERARDI et al., 2010; BERARDI et al., 2011).

## **2.5 Histopatologia**

O grande desafio da terapia celular na cardiologia é criar uma estratégia que vise minimizar a morte dos cardiomiócitos com otimização do reparo cardíaco e eventual redução do remodelamento cardíaco após infarto do miocárdio. O processo de remodelamento foi descrito por meio de estudos histológicos, após a oclusão da artéria coronária há a formação de edema, morte celular pela privação de oxigênio e nutrientes, gerando hipertrofia do músculo restante, as vias de sinalização comandam a resposta inflamatória que busca reorganizar o tecido e então inicia a substituição do tecido necrosado por tecido fibroso (ZORNOFF e SPADARO, 1997; VILAHUR *et al.* 2011). Estas alterações histopatológicas caracterizaram o infarto do miocárdio, apresentando dilatação e redução da espessura da parede livre do VE, com intensa deposição de

colágeno. O colágeno é uma glicoproteína com tripla-hélice, rica em glicina e prolina, principal componente da matriz extracelular e dos tecidos conjuntivos que auxilia na resistência do tecido fibroso que substituiu os cardiomiócitos (LODISH et al., 2005).

Os mecanismos de morte celular e substituição por novas células foram compreendidos por meio da avaliação histológica. Esta se desenvolveu muito com o uso de colorações e de anticorpos que possibilitaram identificar todos os acontecimentos ocasionado pela isquemia no coração.

Este melhor entendimento dos complexos processos de reparação tecidual (GOWDAK e SHETTERT, 2005; NOVOTNY et al., 2008) sugerem que uma das contribuições das CT no reparo cardíaco seria também por meio dos efeitos parácrinos associados a fatores de crescimento contribuindo com a regeneração tecidual (FORMIGA 2010).

É muito importante conhecer o funcionamento de um organismo saudável para então entender os mecanismos de ação da doença como o infarto do miocárdio e como combatê-la. Ao utilizarmos modelos experimentais na busca destes resultados faz-se necessário comprovar se a metodologia de indução a doença é mesmo adequada para as pesquisas propostas isto é proporcionado pelo conhecimento de sua anatomia e fisiologia. Na área da terapia celular estão em desenvolvimento pesquisas pré-clínicas e clínicas sendo importante avaliar as metodologias propostas e a maneira de administração destas células possibilitando determinar se ocorreu melhora após tratamento caracterizado pelos resultados funcionais e histológicos obtidos.

### **3 OBJETIVO**

Avaliar as características morfofuncionais cardíacas de um modelo de indução ao infarto do miocárdio para utilização nas pesquisas em terapia celular.

### **4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Mensurar a função cardíaca por parâmetros ecocardiográficos.

Avaliar a morfologia do miocárdio do VE sadio, após procedimento cirúrgico que simula a indução ao infarto do miocárdio, após a realização do infarto do miocárdio e após receber injeção de meio de cultura.

## **5 METODOLOGIA**

Este estudo possui aprovação do Comitê de Ética em Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (CEUA-PUCPR) sob o parecer número 540/2010 (Anexo 10.1, 10.2 e 10.3).

A manipulação dos animais seguiu as diretrizes postuladas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA,1991) e a Lei nº 11.794 de 2008 (PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA, 2011) quanto à criação e ao uso de animais para atividade de ensino e pesquisa.

Os animais foram provenientes do Biotério da Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Estes foram alocados em gaiolas com no máximo cinco indivíduos e mantidos em condições padrões de climatização e com períodos claro-escuro de 12 horas durante toda a duração do experimento. Foi fornecida água *ad libitum* e ração padronizada (Nuvital®, Colombo) para a espécie. A higiene das gaiolas foi realizada de acordo com os padrões estabelecidos pelo Biotério da PUCPR. A identificação dos animais foi realizada por marcação caudal com caneta de retroprojeter na cor azul (Pilot, São Paulo) e reforçada conforme a necessidade.

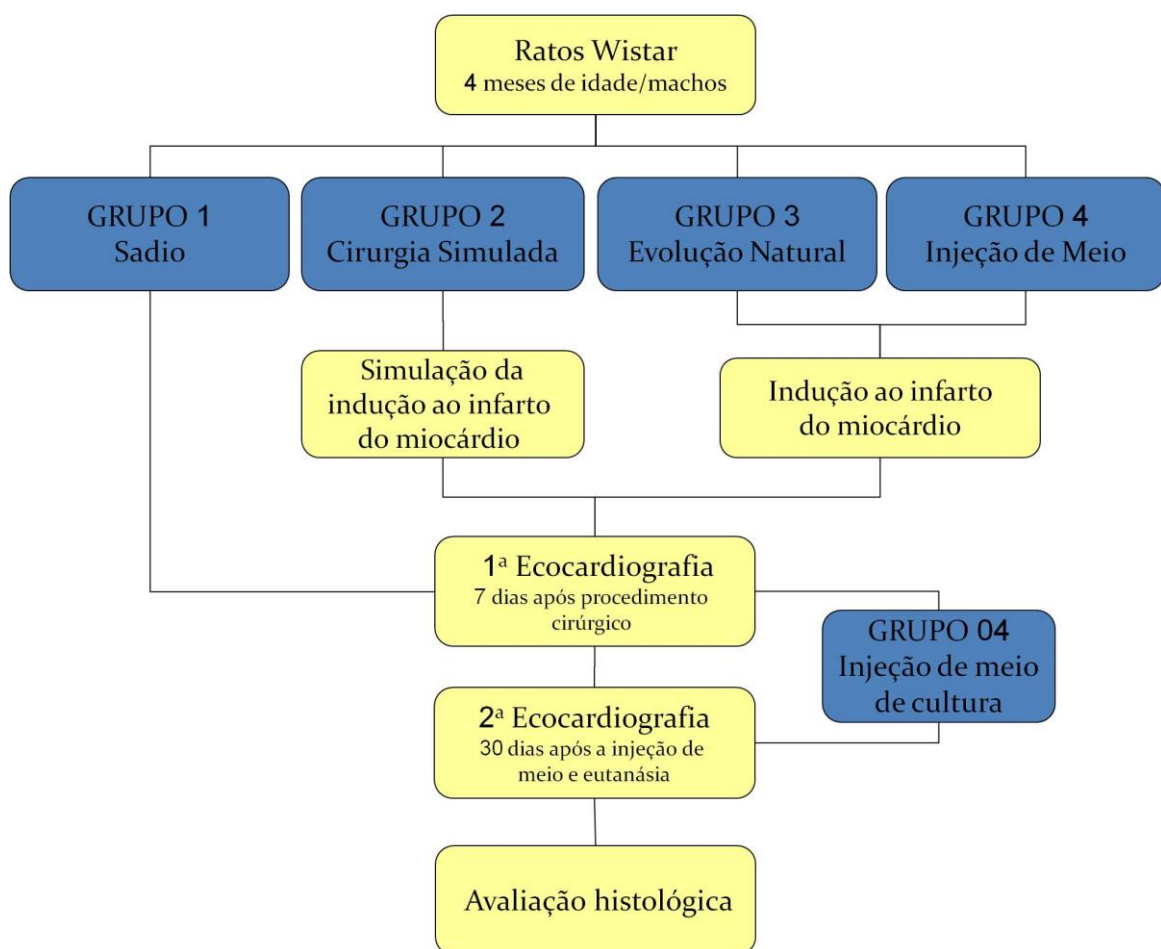
Os procedimentos cirúrgicos, avaliação ecocardiográfica e eutanásia foram realizados no Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da PUCPR. O processamento histológico foi realizado no Laboratório de Anatomia Patológica na Pesquisa Clínica e Experimental da PUCPR. A avaliação histológica foi realizada no Laboratório Experimental de Cultivo Celular da PUCPR.

### **5.1 Desenho do estudo**

Foram utilizados 145 ratos (*Rattus norvegicus*) machos, da linhagem Wistar com 4 meses de idade, com a intenção de se obter um número mínimo ao

final do estudo de 40 ratos sendo 10 animais por grupo de estudo. O procedimento de indução ao infarto nem sempre é eficaz, podendo ocorrer alta mortalidade durante o procedimento cirúrgico ou no pós-operatório devido à disfunção cardíaca. Há ainda os animais que não desenvolvem a miocardiopatia que é caracterizada pela avaliação ecocardiográfica com FE inferior a 40%. Estes animais foram excluídos do estudo e submetidos a eutanásia seguindo o protocolo padrão descrito a seguir. A Figura 5 mostra o organograma do estudo.

Figura 5: Delineamento das etapas e grupos do estudo.



Fonte: a autora.

## 5.2 Grupos de estudo

Foram delimitados quatro grupos de estudo: Animais Sadios (S), Cirurgia Simulada (CS), Evolução Natural (EN) e Injeção de Meio (IM).



O grupo S teve o intuito de caracterizar a função cardíaca e a morfologia do órgão saudável, sem a presença da doença ou submissão a procedimento cirúrgico.

No grupo CS os animais passaram por simulação do procedimento cirúrgico de indução ao infarto do miocárdio, mas sem a oclusão da artéria coronária demonstrando se o procedimento causa alguma alteração funcional ou morfológica.

No grupo EN os animais foram submetidos ao procedimento de indução ao infarto do miocárdio. Os indivíduos que não apresentaram FE inferior a 40% na primeira avaliação ecocardiográfica do VE, o que caracteriza a disfunção ventricular grave, foram excluídos do estudo.

O grupo IM os animais com disfunção ventricular grave foram submetidos a simulação do tratamento terapêutico com injeção “meio de cultura”, este é utilizado para nutrir as células em cultura *in vitro* sendo um “veículo” adequado para a administração da terapia celular.

### **5.3 Pesagem dos animais**

Todos os ratos foram pesados com a balança eletrônica de precisão Toledo modelo 9094C/4 (Toledo®, São Paulo) no primeiro e no último dia do estudo, para a avaliação do ganho e/ou perda de peso e cálculo das dosagens dos anestésicos e medicamentos utilizados.

### **5.4 Indução ao infarto do miocárdio**

A indução ao infarto do miocárdio seguiu o protocolo descrito por WERNECK-DE-CASTRO e colaboradores (2006) com algumas adaptações. Os ratos foram pré-medicados 5 minutos antes da cirurgia com a administração intramuscular de atropina (Atropion®, Ariston, São Paulo) 0,04mg/kg e meperidina (Petinan®, BioChimico®, Rio de Janeiro) 10mg/kg. Os ratos foram induzidos e mantidos anestesiados com Halotano (Tanohalo, Cristália, Itapira-SP). A indução anestésica foi realizada com auxílio de uma câmara de indução anestésica (Chiarorn, Brasil) com ~4% de Halotano (Figura 6).

A técnica cirúrgica aplicada utilizou materiais esterilizados, os ratos tiveram seus pelos removidos do sítio cirúrgico com o auxílio do aparelho de tricotomia com lâmina nº40. Após preparação, o rato foi posicionado em decúbito dorsal, com os membros anteriores fixados com esparadrapo. Sendo então realizada a antissepsia com auxílio de álcool 70% (Companhia Nacional de Álcool Piracicaba-SP) e clorexidina 2% (Riohex® 0,5%, Rioquímica, São José do Rio Preto-SP). Nova dose de anestésico foi administrada por máscara facial contendo algodão embebido em Halotano ~4%, conforme a necessidade e com respiração espontânea (Figura 7). Foi realizada uma incisão na pele na região do 5º espaço intercostal. Os músculos peitoral e grande dorsal foram separados e uma sutura contínua com fio de algodão (Mapfios, São José dos Pinhais) que foi preparada envolvendo estes músculos para realização da toracorráfia imediatamente após a oclusão da artéria coronária, conforme figura 8. Em seguida, foi realizada a toracotomia lateral esquerda da região do quarto ou quinto espaço intercostal com auxílio de uma pinça de Crile de 16 cm (Figura 9). O espaço intercostal foi escolhido de acordo com a visualização da maior intensidade do batimento cardíaco. Neste local foi realizada a toracotomia e a compressão do gradil costal direito rompendo o pericárdio e luxando o coração para fora do gradil costal. Neste momento o animal passou a receber ventilação controlada com auxílio de um respirador nasal, conforme figura 10. Após o coração ser exteriorizado, a artéria coronária esquerda foi identificada e ligada aproximadamente 2 mm de sua origem, entre o sulco da artéria pulmonar e a aurícula atrial esquerda utilizando um fio de seda 4.0 (Shalon® Suturas, São Luís de Montes Belos-GO) (Figura 11). Após oclusão da coronária o coração foi imediatamente reposicionado para dentro da cavidade torácica e a sutura previamente preparada foi ligada (Figura 12).

Durante a cirurgia e no período de recuperação, os ratos foram mantidos em mesa aquecedora (Master Digital SA300, Ch@mpion/Eletronics, França) a 37°C. Na recuperação os ratos receberam suporte ventilatório e massagem torácica externa quando necessário. Também foi administrado conforme necessidade medicações de emergência, tais como adrenalina, furosemida e

aminofilina na tentativa de restaurar a função cardiorrespiratória em decorrência dos efeitos deletérios após infarto.

Após a recuperação da anestesia foi fornecido água e ração. As medicações pós-cirúrgicas incluíram a administração de enrofloxacin 10mg/kg (Floxiclin, Biofarm, Jaboticabal-SP) pela via intramuscular e flunixin meglumine 2,5mg/kg (Megluminato de Flunixin, Flunixin, Uzinas Chímicas Brasileiras, Jaboticabal, SP) por via subcutânea por dois dias a cada 12 horas.

Figura 6: Indução anestésica por via inalatória em campânula com algodão embebido em Halotano.



Fonte: a autora.

Figura 7: Manutenção anestésica por administração de máscara facial contendo algodão embebido em Halotano.



Fonte: a autora.

Figura 8: Sutura em bolsa com fio de algodão nº10.



Fonte: a autora.

Figura 9: Visualização da toracotomia lateral esquerda para exposição cardíaca.



Fonte: a autora.

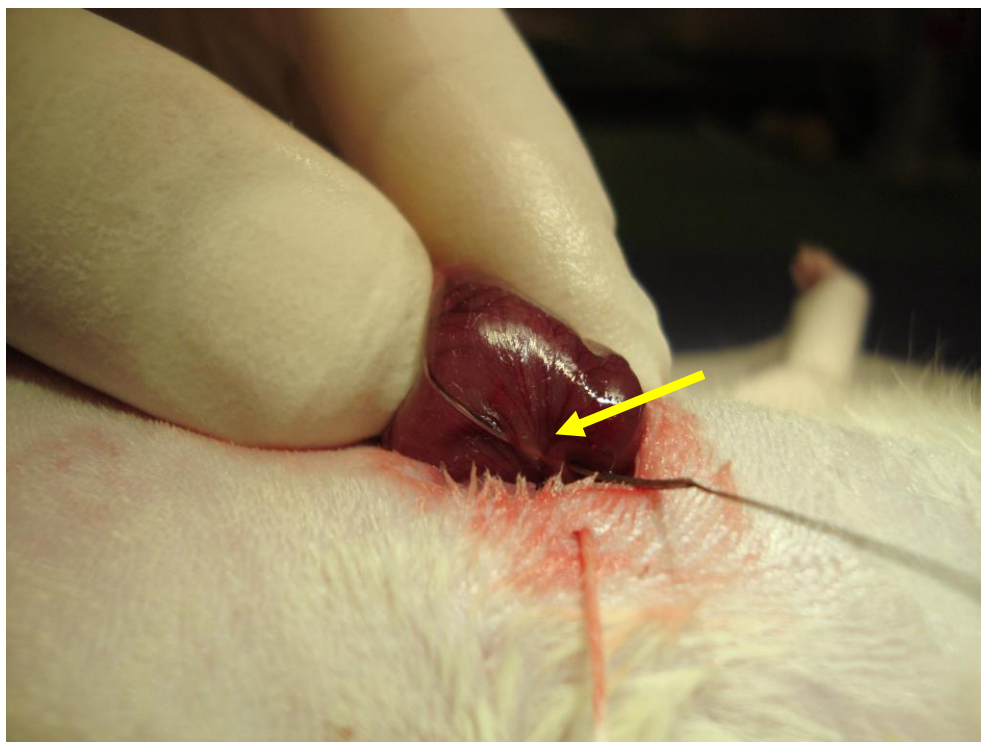
Figura 10: Ventilação pulmonar manual.



Fonte: a autora.



Figura 11: Oclusão da artéria coronária descendente anterior. A seta indica a artéria.



Fonte: a autora.

Figura 12: Toracorráfia.



Fonte: a autora.

## 5.5 Avaliação ecocardiográfica

O calendário do estudo foi elaborado em relação ao grupo IM, sendo a primeira avaliação ecocardiográfica realizada no sétimo dia pós-lesão miocárdica, a injeção de meio foi dois dias após a primeira ecocardiografia e a segunda avaliação no 30º dia após a injeção de meio, ambas as avaliações ecocardiográficas seguiram a mesma metodologia. Este calendário foi transposto a todos os grupos do estudo.

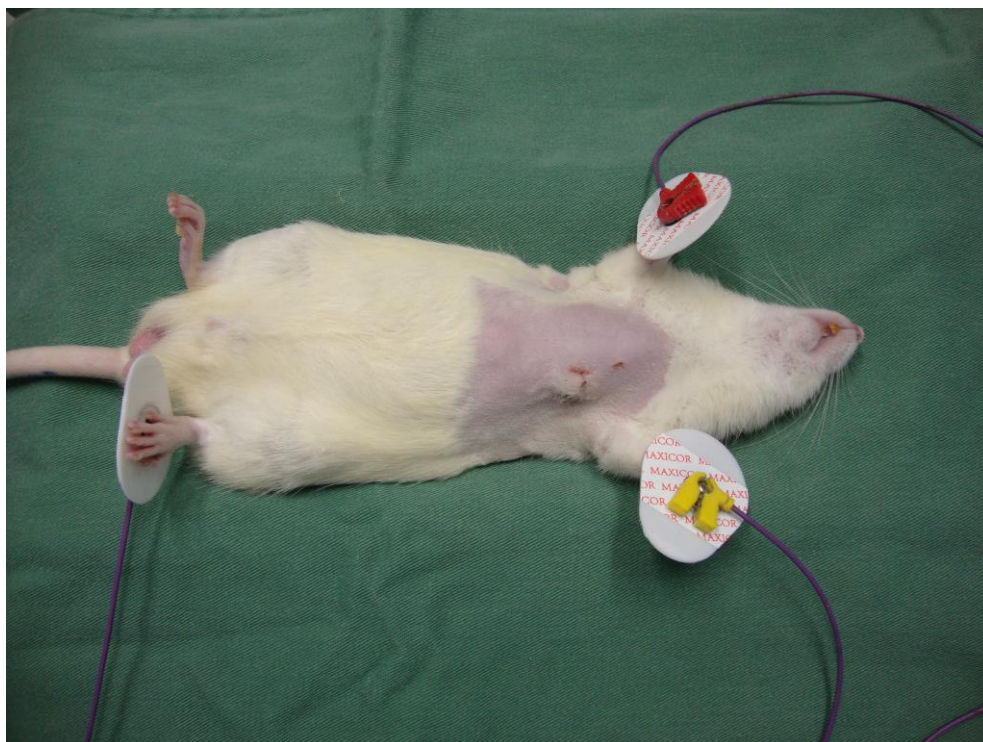
No sétimo dia após a indução ao infarto os ratos foram anestesiados com a administração de cetamina (50mg/kg) associada a xilazina (5mg/kg) (Kensol®, König, Santana de Parnaíba-SP) por via intramuscular. Após remoção dos pelos da região torácica esquerda, os animais foram posicionados em decúbito dorsal, em canaleta especialmente projetada, a qual permite leve rotação lateral esquerda para a realização do exame. Foram conectados nos membros os eletrodos pediátricos (Maxicor®, Pinhais-PR) conforme padrão para monitoração da frequência cardíaca e obtenção do traçado eletrocardiográfico (Figura 13).

Foi realizada uma ecocardiografia transtorácica bidimensional com o equipamento Sonos 5500 (Hewlett Packard, USA) utilizando um transdutor multifrequencial (linear 15L67-15mHz) específico para pequenos animais, o qual foi posicionado na porção ântero-lateral esquerda da parede torácica (Figura 14).

Foram obtidas imagens no corte paraexternal longitudinal, no qual se visibilizavam o átrio esquerdo, a valva mitral, o VE, a valva aórtica e a aorta (Figura 15 e 16). Foram analisados os parâmetros: área diastólica e sistólica final e FE do VE. Com a mensuração da área foi calculado o volume e a FE utilizando o método de Simpson. O calculo para determinação da FE utiliza os valores de  $(VDF-VSF/VDF) \times 100$ . Todas as medidas foram obtidas em três ciclos cardíacos por um único observador e posteriormente calculadas suas médias. As imagens foram gravadas em fita VHS e em disco óptico.

Nos grupos EN e IM foram excluídos do estudo os animais que apresentaram FE maior que 40%, o que não caracteriza a disfunção ventricular grave.

Figura 13: Monitoramento cardíaco.



Fonte: a autora.

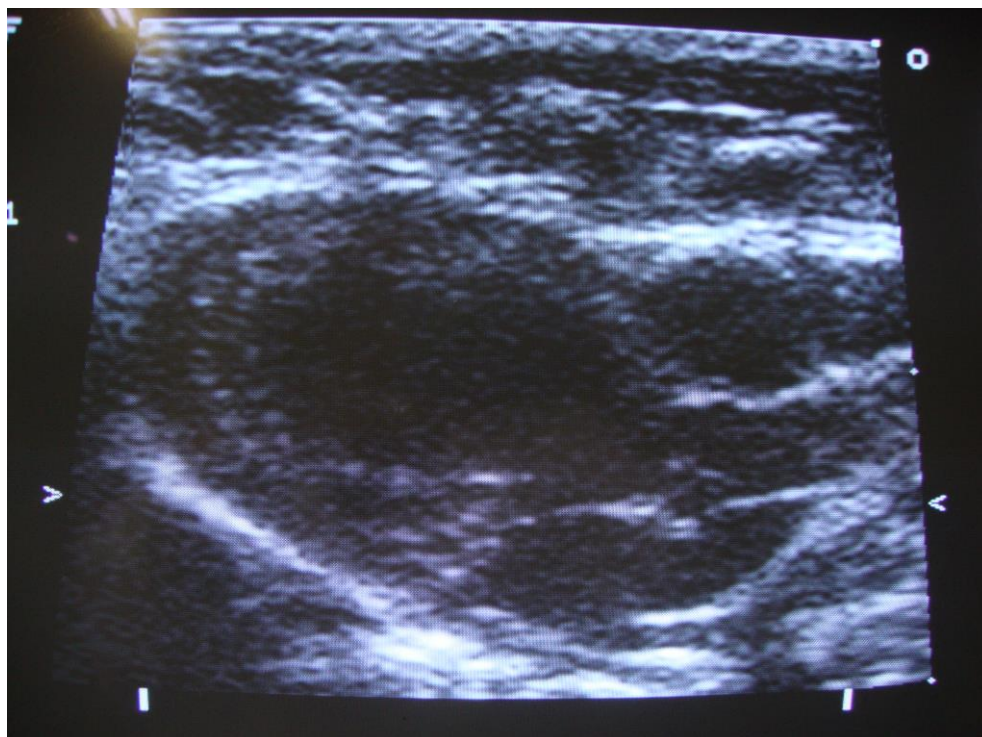
Figura 14: Avaliação ecocardiográfica.



Fonte: a autora.

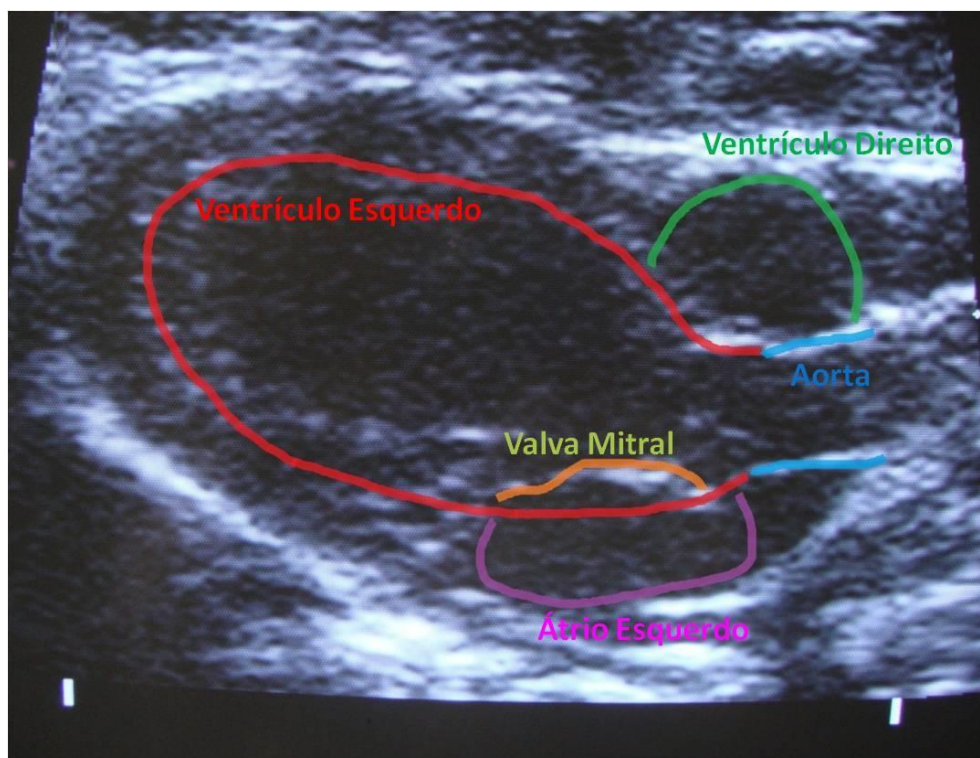


Figura 15: Corte paraesternal longitudinal do coração.



Fonte: a autora.

Figura 16: Desenho esquemático das regiões do coração visualizadas durante a ecocardiografia.



Fonte: a autora.

## 5.6 Injeção de meio de cultura

Os ratos receberam medicação pré-anestésica atropina (0,04mg/kg) associada a meperidina (10mg/kg) por via intramuscular e Cetamina (12,5mg/kg) associado ao Diazepam 0,5% (Teuto, Anápolis) (1,25 mg/kg) por via intraperitoneal.

A indução anestésica foi realizada com auxílio de uma câmara de indução anestésica (Chiarorn, Brasil) com ~4% de Halotano. A vaporização do anestésico inalatório foi ajustada conforme necessário para manter um plano cirúrgico de anestesia. Então foi administrado por via oral Cloridrato de Bupivacaína com Epinefrina (Neocaína Cristália, São Paulo) para facilitar a obtenção das vias aéreas por meio de intubação orotraqueal (Figura 17) com cateter intravenoso periférico número 16 (BD Angiocath™, Juiz de Fora) que foi conectado ao sistema de ventilação mecânica controlada (HAVARD®, Inc., respirador modelo 683, Massachusetts, USA). Ajustado a uma frequência respiratória de 60 movimentos por minuto e um volume inspiratório de 2,5mL.

Então o rato foi posicionado em decúbito dorsal com os membros anteriores fixados com esparadrapo e realizou-se a antisepsia da região conforme descrito previamente. Foi realizada uma incisão na pele sobre o esterno, desde o processo xifoide até a altura da 4ª espaço intercostal. O esterno foi cortado medialmente com auxílio de uma tesoura 10cm (Figura 18). Com o auxílio de um afastador autostático (Quinelato, Rio Claro) e uma pinça Kelly (Quinelato, Rio Claro) prende-se a musculatura torácica possibilitando a visualização do coração no mediastino. Utilizou-se uma haste flexível com algodão (Cotonetes® da Johnson & Johnson, São Paulo) estéril para romper e afastar o pericárdio e de aderir o coração da musculatura torácica quando necessário. Após a identificação visual da área infartada observada pela presença da área pálida no miocárdio, foi realizada uma injeção com 200 µL de meio Iscove's Modified Dulbecco's (IMDM) (Gibco – Invitrogen, Grand Island – NY - USA), por meio de uma seringa com capacidade de 1mL com agulha 0,45x13 (Advantive, Masif Artigos Médicos e Hospitalares, Curitiba - PR) na região de transição entre o tecido integro e o lesionado, conforme Figura 19. Após à injeção, as bordas do osso esterno foram aproximadas e fechadas

através de uma sutura contínua simples com fio monofilamentar de nylon 4-0 (Shalon® Suturas, São Luís de Montes Belos-GO). A pele foi suturada com pontos isolados simples com fio de nylon 4-0. Após o retorno da respiração espontânea o animal foi desconectado do sistema de ventilação mecânica e removido o cateter. Os cuidados na recuperação dos animais foram similares aos descritos na metodologia de indução ao infarto.

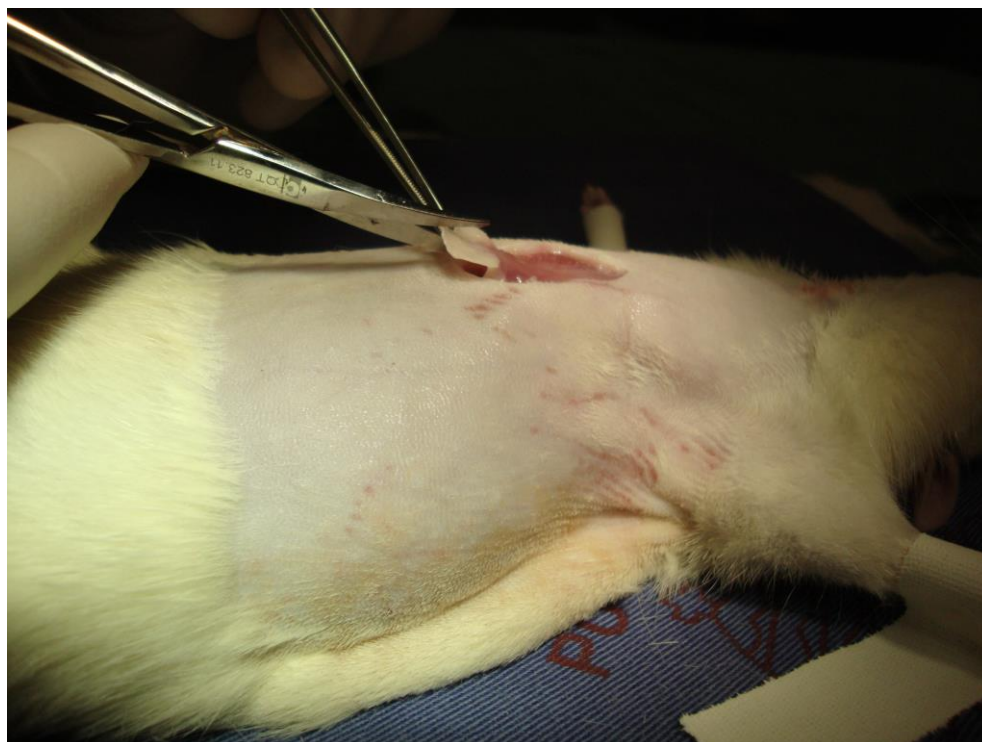
Figura 17: Obtenção da via aérea por meio de intubação orotraqueal.



Fonte: a autora.



Figura 18: Toracotomia mediana.



Fonte: a autora.

Figura 19: Injeção de meio na área de transição entre o tecido lesionado e sadio.



Fonte: a autora.

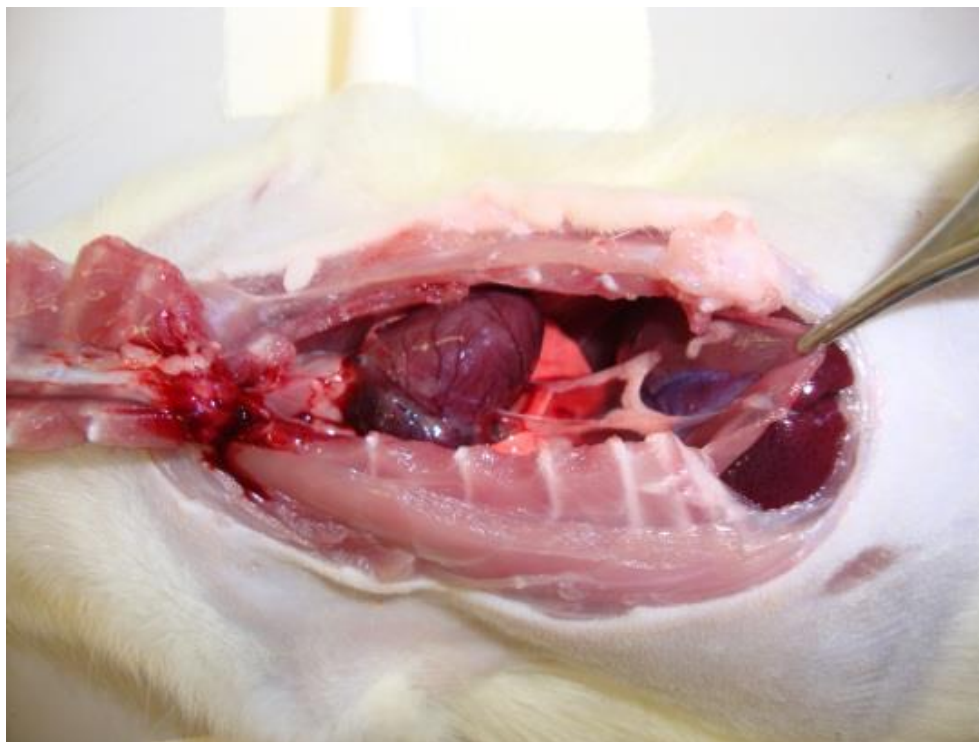
## 5.7 Eutanásia

Após a realização da segunda avaliação ecocardiográfica os animais foram submetidos a eutanásia.

Os ratos foram eutanasiados de forma individual e sem a presença de outros animais. A eutanásia foi realizada por overdose anestésica com a administração de Cetamina 240mg/kg associada a Xilazina 30 mg/Kg por via intramuscular. Após anestesia profunda os ratos foram alocados em uma câmara de indução anestésica com halotano ~4%. A parada cardiocerebrorespiratória foi diagnosticada por meio de auscultação cardiorrespiratória verificando a ausência de batimentos cardíacos e movimentos respiratórios, também foi avaliado a perda total dos reflexos protetores, tais como: palpebral, corneano e podal (pinçar a falange).

Em seguida, foi realizada a necropsia realizando uma toracotomia mediana (Figura 20) para a remoção do coração. Após remoção o mesmo foi lavado com solução fisiológica de Cloreto de Sódio 0,9% (Irrigufisio, Segmenta, Ribeirão Preto-SP) para a remoção do excesso de sangue.

Figura 20: Toracotomia mediana para retirada do coração.



Fonte: a autora.

## 5.8 Fixação e procedimentos histotécnicos

Após a remoção e lavagem o coração foi fixado em formalina 10% (Biotec, Labmaster, Pinhais-PR) por 24 horas (Figura 21). Após a fixação, o coração foi clivado em quatro fragmentos por cortes paralelos da base ao ápice (Figura 22) e acondicionado em cassete para processamento histológico (Figura 23). A desidratação e emblocagem foram realizadas pelo Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR. O processamento foi realizado no histotécnico (Leica TP1020). Isto é feito em dois estágios: 1º Substituição da água por álcool etílico (Merck, Darmstadt-Alemanha) - passando o tecido em soluções de na concentração 70%, 80% e 90%. 2º Clarificação ou Diafanização, substituição do álcool por um solvente de parafina miscível com o álcool. Utilizamos o Xilol (F. Maia Indústria e Comércio, Cotia-SP) e o tecido foi submetido a três banhos até que o álcool foi substituído por este.

A amostra impregnada por xilol foi submetida a três trocas de parafina (Biotec, Pinhais) líquida aquecida a 65°C. O tecido logo ficou inteiramente saturado com parafina, sendo que, a parafina líquida passa a ocupar todos os espaços do tecido, que antes continha água. A parafina endurece a medida que esfria, onde monta-se o bloco de parafina (inclusão) (Figura 24), para que possa ser cortado em fatias delgadas. Os banhos são sucessivos com duração de uma hora cada, totalizando 12 horas de processamento. A inclusão do bloco de parafina utilizou o Inclusor Leica EG1160.

Figura 21: Fixação do órgão em formalina 10%.



Fonte: a autora.

Figura 22: Clivagem da amostra em quatro fragmentos paralelos após a fixação.



Fonte: a autora.

Figura 23: Acondicionamento da amostra em cassete para processamento histológico.



Fonte: a autora.

Figura 24: Bloco em parafina contendo a amostra.



Fonte: a autora.

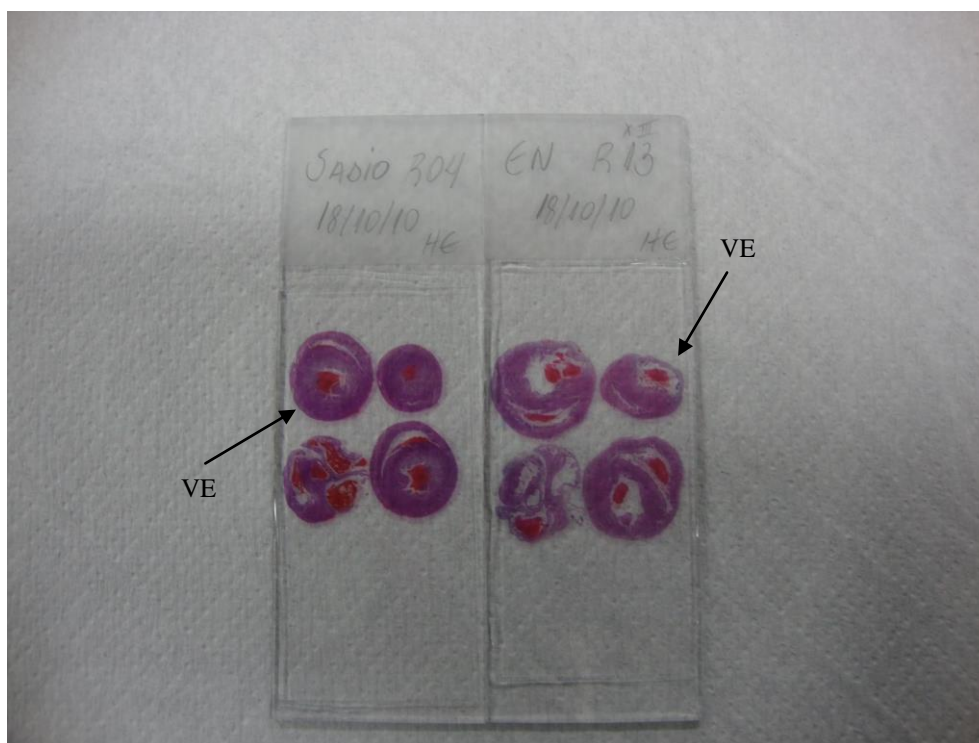


## 5.9 Coloração em hematoxilina e eosina

Após a inclusão os blocos passaram por microtomia realizada no micrótomo Leica RM2145. Os cortes histológicos com espessura entre 4 e 5 micras foram “esticados” em banho histológico (Leica) contendo água a aproximadamente 50°C e retirados do banho com lâmina silanizada (ImmunoSlide, Easy Path, São Paulo-SP) para uma melhor aderência do corte a lâmina. As lâminas passaram por secagem de uma hora em estufa 60°C. Estando prontas para coloração.

Realizou-se a coloração com Hematoxilina e Eosina (HE) para identificação do local lesionado pelo infarto. As lâminas com os cortes foram banhadas em xilol a 65°C por três vezes de 5 minutos. Após a retirada da parafina as lâminas passaram por três banhos em álcool nas concentrações 99%, 95% e 70% de 1 minuto cada para reidratação. Então foram lavadas em água por 5 minutos. Após retiradas da água foi colocado o corante Hematoxilina (Alfatec Quimica Fina, Barueri) por 8 minutos. Nova lavagem em água por 5 minutos foi realizada e então colocado o corante Eosina (Alfatec Quimica Fina, Barueri) por 3 minutos. Nova lavagem em água por 5 minutos foi realizada. As lâminas então foram desidratadas por álcool 95% por 1 minuto e álcool absoluto por três vezes de 1 minuto, e então diafanizadas em 3 banhos por 1 minuto em xilol. Para a montagem da lâmina utilizamos a resina Erv-mount (Easy Path, São Paulo-SP) e lamínula (Easy Path, São Paulo-SP) (Figura 25). Esta coloração cora em azul os núcleos e em rosa o citoplasma celular.

Figura 25: Lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina possibilitando a identificação do ventrículo esquerdo (VE) e possíveis locais com lesão.



Fonte: a autora.

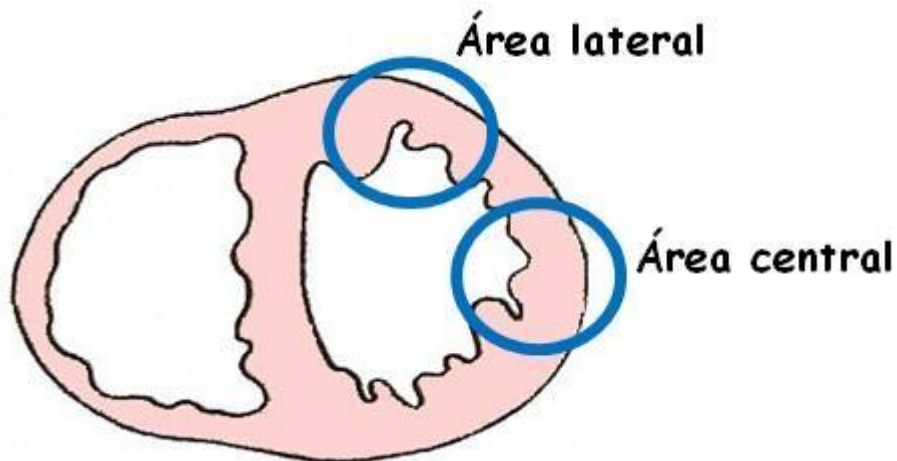
### 5.10 Confeção do micro arranjo de tecido artesanal

A visualização das lâminas após a coloração em HE nos grupos EM e IM possibilita a identificação da área infartada no VE e da área de transição entre a região isquêmica ocasionada pelo infarto e a região de tecido saudável, denominadas área central do VE e lateral do VE localizada próximo ao septo do coração. Esta localização foi utilizada como parâmetro nos grupos S e CS que não possuem o infarto, como demonstrado na Figura 26.

Por meio da técnica de Micro Arranjo de Tecidos Artesanal (TMA) foi confeccionado um novo bloco em parafina contendo somente as áreas lateral e central. Como as amostras são pequenas foi possível montar em um único bloco as amostras de todos os animais do grupo de estudo, possibilitando ainda economia na utilização de corantes na análise histológica. A identificação das amostras utilizou um mapa do tipo plano cartesiano onde as colunas foram

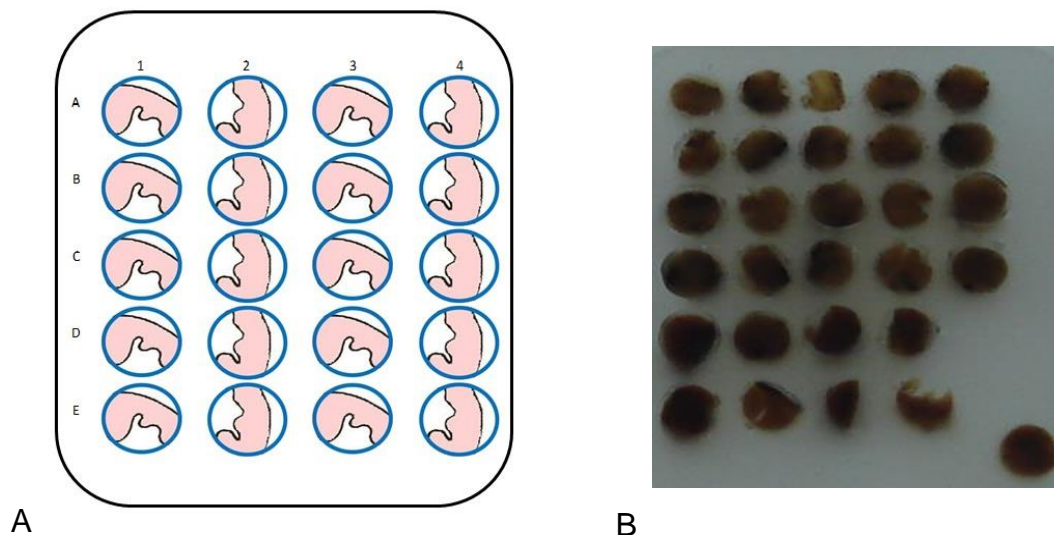
identificadas com os números e as linhas com as letras (Figura 27). Formando no total quatro blocos respectivos aos grupos de estudo.

Figura 26: Desenho esquemático do corte transversal do coração, demonstrando área lateral que corresponde a região de transição entre tecido isquêmico e sadio nos grupos EM e CS, e a área central correspondente a região infartada.



Fonte: a autora.

Figura 27: A- Desenho esquemático do plano cartesiano de identificação do bloco de TMA, composto por dez indivíduos com duas amostras, uma da área lateral e outra da área central. B- Bloco em parafina contendo o TMA.



Fonte: a autora.

## **5.11 Avaliação histológica do TMA**

Os blocos contendo o TMA foram cortados no micrótomo com espessura entre 4 e 5 micras os cortes foram “esticados” em banho histológico contendo água a aproximadamente 50°C e retirados do banho com lâmina silanizada.

### **5.11.1 Coloração tricrômio de Masson**

Para detecção da fibrose no músculo cardíaco foi utilizado a coloração Tricrômio de Masson que cora em azul o tecido fibrótico e em vermelho as fibras musculares.

Nesta coloração utilizamos o kit Tricômio de Masson (com Azul Anilina) fabricado pela Easy Path (Bio-Optica Milano s.p.a., Milão – Itália). Seguimos a metodologia descrita pelo fabricante.

Resumidamente as lâminas foram desparafinizadas em xilol por 5 minutos. Então se iniciou o processo de hidratação da amostra por banhos subsequentes em álcool 99%, 95% e 70% lavando então a amostra em água. Foi preparada uma solução com os reagentes A e B em igual proporção, ambos os reagentes eram de Hematoxilina Férrica de Weigert, esta solução foi utilizada para cobrir a amostra por 10 minutos. Então a lâmina foi lavada em água corrente e seca. O reagente C (Ácido Pícrico) foi colocado de modo a cobrir a amostra permanecendo por 6 minutos. Nova lavagem com água destilada foi realizada. E então colocado o reagente D (Fucsina) que agiu por 4 minutos. Seguida por nova lavagem da lâmina em água corrente. Colocamos então o reagente E (Ácido Fosfomolibdico) que agiu por 5 minutos. Então as lâminas foram secas e sobre a amostra foi colocado o reagente F (Azul de Anilina) por 5 minutos. As lâminas foram lavadas em água destilada e submetidas a desidratação em série de álcool ascendente até o xilol e então montadas com Erv-mount e lamínula.

## **5.12 Análise estatística**

Inicialmente, os grupos de animais S, CS, EN e IM foram comparados em relação às variáveis FE, Área Sistólica Final (ASF) e Área Diastólica Final (ADF), em cada um dos momentos de avaliação (7 dias pós-lesão miocárdica e 30 dias pós injeção de meio) e em relação à diferença entre as duas avaliações. Para tanto, testou-se a hipótese nula de que as médias são iguais nos 4 grupos, versus a hipótese alternativa de que pelo menos um dos grupos tem média diferente dos demais. Para as variáveis que tiveram a rejeição da hipótese nula (igualdade das médias), os grupos foram comparados dois a dois.

Em seguida, dentro de cada grupo, foram comparadas as duas avaliações. Para tanto, testou-se a hipótese nula de que a média na primeira avaliação é igual à média na segunda avaliação, versus a hipótese alternativa de médias diferentes.

Os resultados obtidos no estudo foram descritos por médias, medianas, valores mínimos, valores máximos e desvios padrões. Para a comparação dos grupos em relação às variáveis quantitativas, foi considerado o modelo de análise de variância com um fator (ANOVA). Para as comparações múltiplas foi usado o teste LSD (least significant difference). A comparação entre as duas avaliações, dentro de cada grupo, foi feita considerando-se 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.

## **6 RESULTADOS**

### **6.1 Mortalidade dos animais no decorrer do estudo**

Iniciamos o estudo com 145 animais que foram divididos entre os grupos avaliados chegando ao final do estudo um total de 51 animais, a Tabela 1 nos demonstra o número de animais utilizados em cada grupo, a mortalidade,

momento dos óbitos e quantos animais foram incluídos no estudo quando necessário o critério de FE do VE inferior a 40%.

Tabela 1- Apresentação dos números de animais utilizados: óbitos, momento do óbito, aprovação dentre os critérios de inclusão no estudo. NA – não se aplica.

<b><i>n° de ratos/ Grupos</i></b>	<b><i>Sadio</i></b>	<b><i>Cirurgia Simulada</i></b>	<b><i>Evolução Natural</i></b>	<b><i>Injeção Meio</i></b>
<b><i>Procedimento de indução ao infarto do miocárdio</i></b>	NA	14	40	80
<b><i>Óbito durante procedimento de infarto do miocárdio</i></b>	NA	0	13	19
<b><i>Óbito após o procedimento de infarto do miocárdio</i></b>	NA	0	5	19
<b><i>Submetidos a 1ª avaliação ecocardiográfica</i></b>	11	14	22	42
<b><i>FE &lt;40%</i></b>	NA	NA	11	18
<b><i>Injeção de meio</i></b>	NA	NA	NA	18
<b><i>Óbito relacionado ao procedimento de injeção de meio</i></b>	NA	NA	NA	3
<b><i>Submetidos a 2ª avaliação ecocardiográfica</i></b>	11	14	11	15

Nos grupos S e CS o índice de sobrevivência foi de 100 %, demonstrando que o procedimento cirúrgico sem a oclusão da artéria coronária não oferece risco. No grupo EN o índice de sobrevivência a cirurgia de oclusão da artéria coronária foi de 55%, dentre estes 50% não se enquadravam na FE inferior a 40%, não ocorrendo novos óbitos após esta classificação. No grupo IM o índice de sobrevivência a oclusão coronária foi de 52,5% e dentre estes animais obteve-se 42,9% de aprovação no critério ecocardiográfico, 83,3% dos animais submetidos a segunda cirurgia para a injeção de meio, sobreviveram até o ultimo dia do estudo.

## **6.2 Variação do peso**

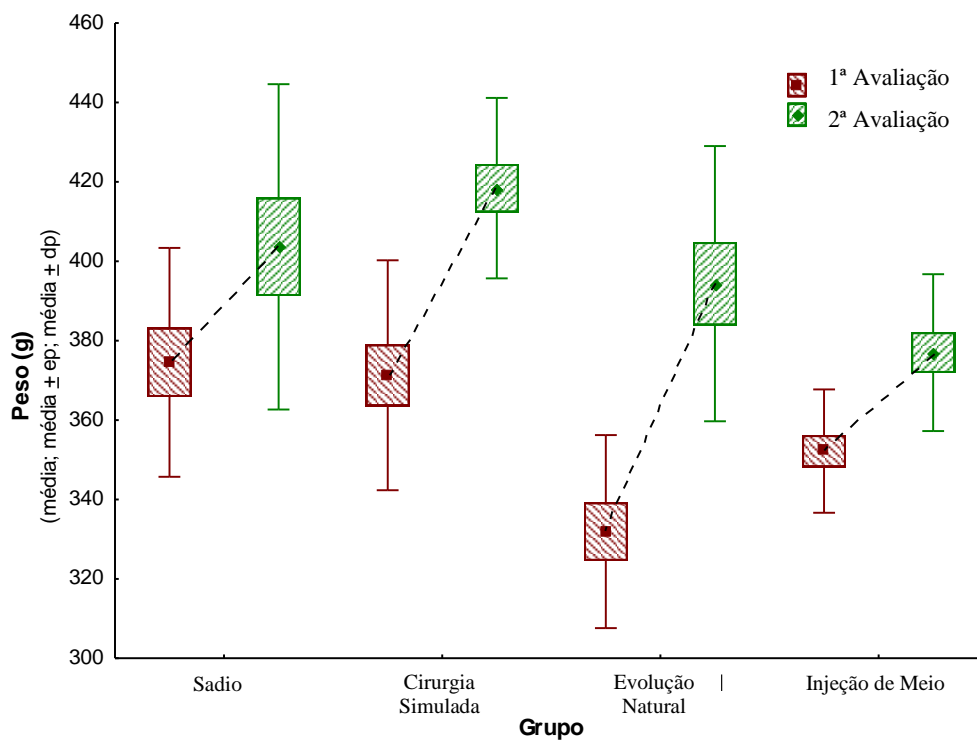
A avaliação do peso corporal dos animais foi realizada em dois momentos: no dia do início do estudo e ao término após 39 dias de acompanhamento (Tabela 2). Nas tabelas abaixo são apresentados os resultados obtidos para

cada variável. O Gráfico 1 possibilita comparar entre os grupos a variação de peso no decorrer do estudo.

Tabela 2- Comparação da Média, Mediana, Mínimo, Máximo, Desvio Padrão do peso obtido nos diferentes grupos nas duas avaliações.

Variável	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p
<b>Peso inicial</b>	S	11	374,55	380,00	300,00	415,00	28,82	<0,001
	CS	14	371,29	369,50	315,00	423,00	28,97	
	EN	11	331,91	335,00	300,00	372,00	24,32	
	IM	15	352,20	351,00	329,00	385,00	15,53	
<b>Peso final</b>	S	11	403,64	410,00	330,00	467,00	40,98	0,005
	CS	14	418,43	413,50	369,00	450,00	22,73	
	EN	11	394,36	400,00	315,00	430,00	34,68	
	IM	15	377,00	377,00	345,00	415,00	19,76	
<b>Diferença (Final – Inicial)</b>	S	11	29,09	40,00	-60,00	68,00	40,29	0,001
	CS	14	47,14	49,50	27,00	80,00	13,10	
	EN	11	62,45	58,00	10,00	95,00	24,70	
	IM	15	24,80	23,00	5,00	61,00	12,85	

Gráfico 1 – Apresentação da média, mediana e desvio padrão da mensuração do Peso dos animais nas duas avaliações.



Considerando-se que houve diferença significativa entre os 4 grupos, estes foram comparados dois a dois. Na Tabela 3 são apresentados os valores de  $p$  dessas comparações.

Tabela 3 - Comparações entre os valores de  $p$  obtidos das variáveis de peso dos animais.

<b>Variável</b>	<b>Valor de <math>p</math></b>					
	S x CS	S x EN	S x IM	CS x EN	CS x IM	EN x IM
<b>Peso inicial</b>	0,744	<0,001	0,027	<0,001	0,042	0,043
<b>Peso final</b>	0,220	0,465	0,028	0,049	<0,001	0,145
<b>Diferença (final – inicial)</b>	0,067	0,002	0,653	0,119	0,015	<0,001

Na Tabela 4 e no Gráfico 1 são apresentados, para cada grupo, os valores de  $p$  das comparações entre os momentos de avaliação.

Tabela 4 - Comparação entre os valores de  $p$  entre os momentos de avaliação do Peso.

<b>Grupo</b>	<b>Valor de <math>p</math> (Início x Final)</b>
<b>S</b>	0,038
<b>CS</b>	<0,001
<b>EN</b>	<0,001
<b>IM</b>	<0,001

### 6.3 Avaliação ecocardiográfica

A avaliação ecocardiográfica possibilitou a mensuração da frequência cardíaca, ADF, ASF e a FE.

#### 6.3.2 Frequência cardíaca

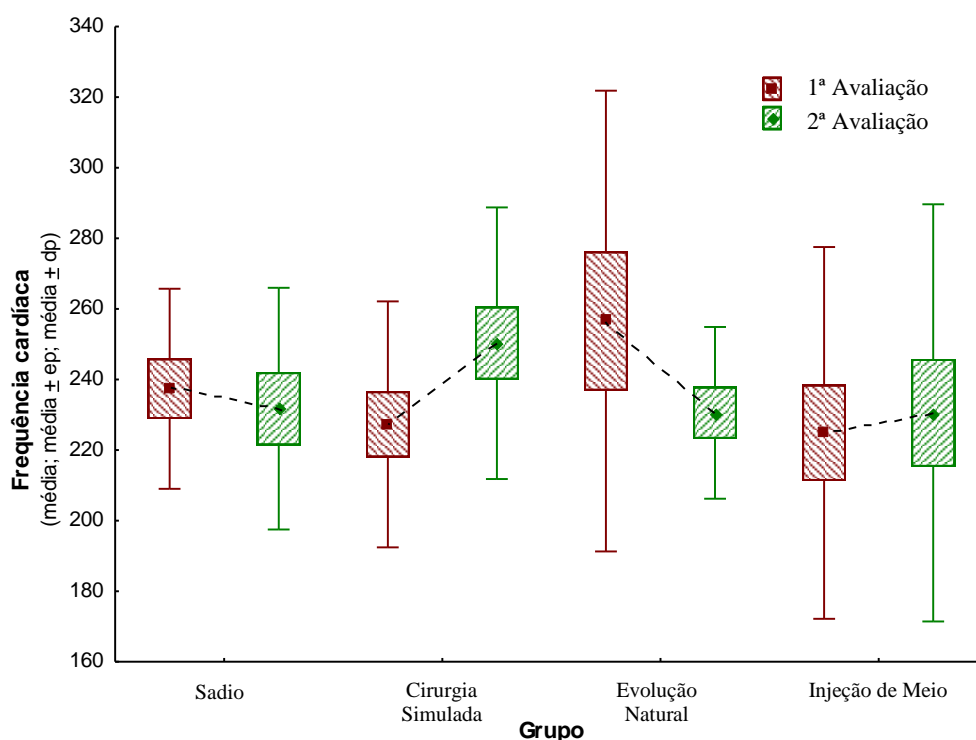
A monitoração da frequência cardíaca com a obtenção do traçado eletrocardiográfico unido a imagem ecocardiográfica permitiu determinar com precisão os momentos de sístole e diástole no miocárdio possibilitando a demarcação do local a ser medido para o cálculo de área do VE. Temos na Tabela 5 a apresentação dos valores obtidos para frequência cardíaca em ambas as avaliações. No Gráfico 2 podemos observar a médias dos valores obtidos para frequência cardíaca nos dois momentos de avaliação.



Tabela 5 – Comparação da Média, Mediana, Mínimo, Máximo, Desvio Padrão da Frequência Cardíaca obtida nos diferentes grupos nas duas avaliações.

Variável	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p
<b>1ª Avaliação frequência cardíaca</b>	S	11	237,36	237,00	202,00	303,00	28,35	0,350
	CS	14	227,29	225,00	161,00	279,00	34,86	
	EN	11	256,55	266,00	98,00	331,00	65,28	
	IM	15	224,87	239,00	120,00	322,00	52,67	
<b>2ª Avaliação frequência cardíaca</b>	S	11	231,73	227,00	191,00	308,00	34,24	0,557
	CS	14	250,29	251,50	182,00	333,00	38,48	
	EN	11	230,55	224,00	195,00	277,00	24,33	
	IM	15	230,53	246,00	61,00	297,00	59,11	
<b>Diferença (Final – Inicial)</b>	S	11	-5,64	-2,00	-67,00	37,00	31,86	0,253
	CS	14	23,00	12,50	-60,00	100,00	47,42	
	EN	11	-26,00	-35,00	-83,00	117,00	60,84	
	IM	15	5,67	1,00	-189,00	177,00	83,43	

Gráfico 2 – Apresentação da média, mediana e desvio padrão da mensuração da Frequência Cardíaca nas duas avaliações.



Comparamos também os valores de  $p$ , para cada grupo, entre as duas avaliações (Tabela 6).

Tabela 6 - Comparação entre os valores de  $p$  entre os momentos de avaliação da Frequência Cardíaca.

<b>Grupo</b>	<b>Valor de <math>p</math> (Início x Final)</b>
<b>S</b>	0,570
<b>CS</b>	0,093
<b>EN</b>	0,187
<b>IM</b>	0,796

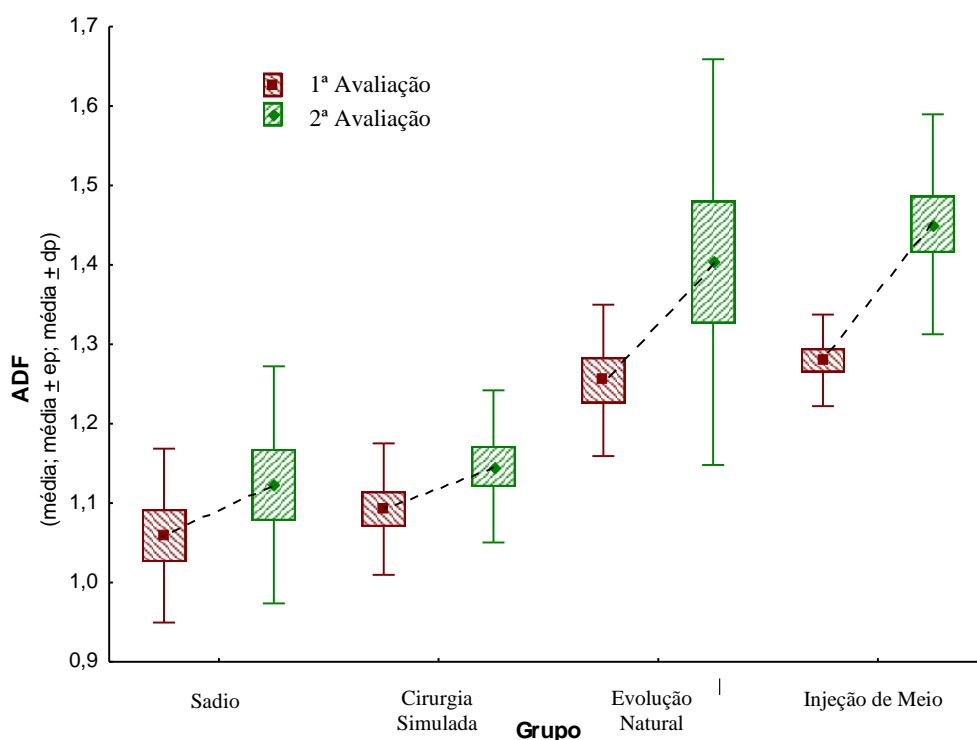
### 6.3.3 Área diastólica final

A mensuração da ADF foi realizada na imagem obtida pela ecocardiografia no momento de diástole sendo delimitado toda a área interna do VE. O Gráfico 3 possibilita observar a diferença da área ventricular, temos medidas proporcionais entre os grupos S e CS, bem como entre os grupos EN e IM havendo diferença significativa quando comparado grupos que possuem o infarto em relação aos que não possuem. Temos na Tabela 7 a apresentação dos valores obtidos na mensuração da área do VE.

Tabela 7 – Comparação da Média, Mediana, Mínimo, Máximo, Desvio Padrão da Área Diastólica Final obtida nos diferentes grupos nas duas avaliações.

<b>Variável</b>	<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>Média</b>	<b>Mediana</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Valor de <math>p</math></b>
<b>1ª Avaliação da ADF</b>	S	11	1,06	1,05	0,88	1,21	0,11	<0,001
	CS	14	1,09	1,06	0,97	1,20	0,08	
	EN	11	1,25	1,28	1,12	1,45	0,10	
	IM	15	1,28	1,28	1,19	1,39	0,06	
<b>2ª Avaliação da ADF</b>	S	11	1,12	1,16	0,89	1,31	0,15	<0,001
	CS	14	1,15	1,16	0,93	1,28	0,10	
	EN	11	1,40	1,42	1,00	1,90	0,26	
	IM	15	1,45	1,43	1,22	1,72	0,14	
<b>Diferença (Final – Inicial)</b>	S	11	0,06	0,06	-0,07	0,26	0,10	0,077
	CS	14	0,05	0,04	-0,10	0,20	0,11	
	EN	11	0,15	0,18	-0,22	0,45	0,21	
	IM	15	0,17	0,16	0,03	0,36	0,12	

Gráfico 3 – Apresentação da média, mediana e desvio padrão da mensuração da Área Diastólica Final do ventrículo esquerdo nas duas avaliações.



Considerando-se que houve diferença significativa entre os 4 grupos, estes foram comparados dois a dois. Na tabela abaixo são apresentados os valores de  $p$  dessas comparações.

Tabela 8 – Comparações entre os valores de  $p$  obtidos das variáveis da Área Diastólica Final dos animais.

Variável	Valor de $p$					
	S X CS	S X EN	S X IM	CS X EN	CS X IM	EN X IM
1ª Avaliação da ADF	0,340	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,463
2ª Avaliação da ADF	0,727	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,468

Na Tabela 9 são apresentados, para cada grupo, os valores de  $p$  das comparações entre os momentos de avaliação.

Tabela 9 – Comparação entre os valores de  $p$  entre os momentos de avaliação da Área Diastólica Final.

<b>Grupo</b>	<b>Valor de <math>p</math> (Início x Final)</b>
<b>S</b>	0,064
<b>CS</b>	0,100
<b>EN</b>	0,042
<b>IM</b>	<0,001

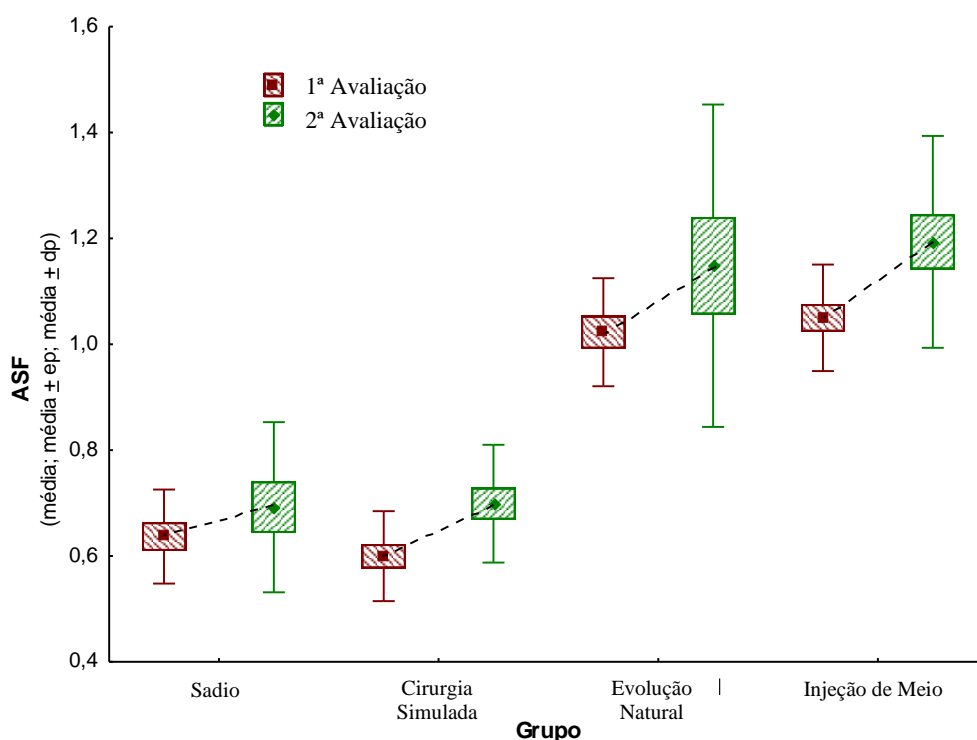
### 6.3.4 Área sistólica final

A mensuração da ASF foi realizada da mesma maneira que a ADF na imagem obtida pela ecocardiografia durante a sístole. O Gráfico 4 nos possibilita observar a diferença entre os grupos que possuem infarto ou não. Temos na Tabela 10 a apresentação dos valores obtidos na mensuração da área do VE.

Tabela 10 – Comparação da Média, Mediana, Mínimo, Máximo, Desvio Padrão da Área Sistólica Final obtida nos diferentes grupos nas duas avaliações.

<b>Variável</b>	<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>Média</b>	<b>Mediana</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Valor de <math>p</math></b>
<b>1ª Avaliação da ASF</b>	S	11	0,64	0,61	0,49	0,74	0,09	<0,001
	CS	14	0,60	0,59	0,43	0,77	0,08	
	EN	11	1,02	0,99	0,88	1,22	0,10	
	IM	15	1,05	1,02	0,92	1,30	0,10	
<b>2ª Avaliação da ASF</b>	S	11	0,69	0,70	0,43	0,94	0,16	<0,001
	CS	14	0,70	0,71	0,43	0,90	0,11	
	EN	11	1,15	1,24	0,57	1,62	0,30	
	IM	15	1,19	1,18	0,90	1,59	0,20	
<b>Diferença (Final – Inicial)</b>	S	11	0,06	0,00	-0,11	0,29	0,13	0,571
	CS	14	0,10	0,14	-0,14	0,29	0,13	
	EN	11	0,13	0,19	-0,40	0,40	0,23	
	IM	15	0,14	0,18	-0,17	0,33	0,16	

Gráfico 4 – Apresentação da média, mediana e desvio padrão da mensuração da Área Sistólica Final do ventrículo esquerdo nas duas avaliações.



Considerando-se que houve diferença significativa entre os 4 grupos, estes foram comparados dois a dois. Na Tabela 11 são apresentados os valores de  $p$  dessas comparações.

Tabela 11 – Comparações entre os valores de  $p$  obtidos das variáveis da Área Sistólica Final dos animais.

<b>Variável</b>	<b>Valor de <math>p</math></b>					
	<b>S X CS</b>	<b>S X EN</b>	<b>S X IM</b>	<b>CS X EN</b>	<b>CS X IM</b>	<b>EN X IM</b>
<b>1ª Avaliação da ASF</b>	0,336	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,471
<b>2ª Avaliação da ASF</b>	0,934	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,576

Na Tabela 12 são apresentados, para cada grupo, os valores de  $p$  das comparações entre os momentos de avaliação.

Tabela 12 – Comparação entre os valores de *p* entre os momentos de avaliação da Área Sistólica Final.

<b>Grupo</b>	<b>Valor de <i>p</i> (Início x Final)</b>
<b>S</b>	0,176
<b>CS</b>	0,012
<b>EN</b>	0,103
<b>IM</b>	0,003

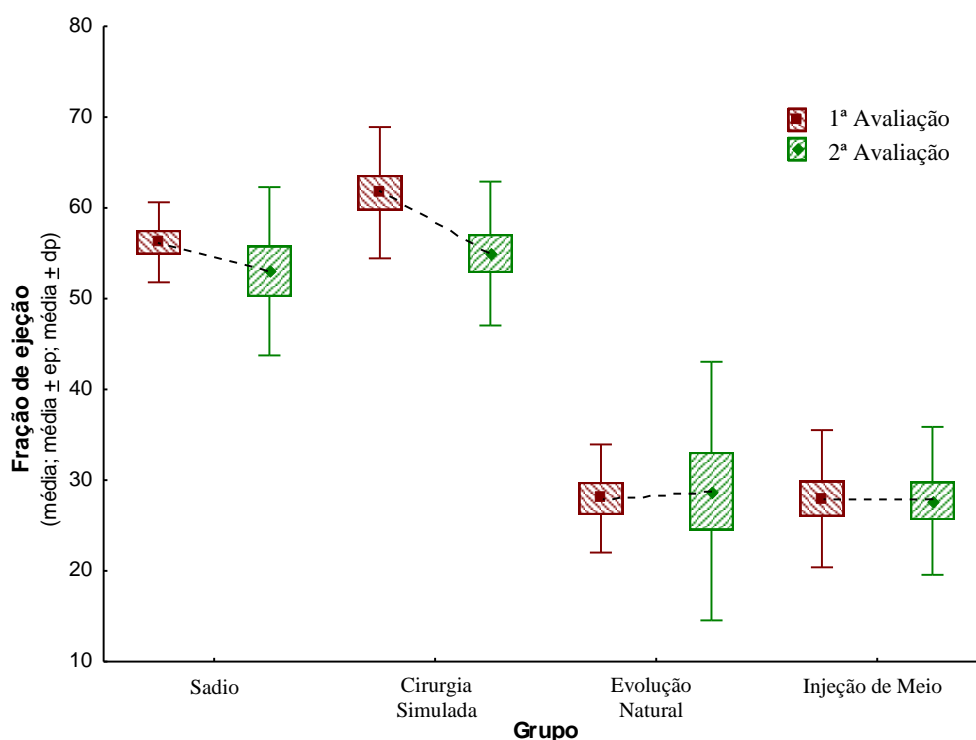
### 6.3.5 Fração de ejeção

A FE foi calculada de acordo com o método de Simpson, demonstrando quanto de sangue é pelo ventrículo esquerdo para a circulação corpórea (Tabela 13 e Gráfico 5).

Tabela 13 - Comparação da Média, Mediana, Mínimo, Máximo, Desvio Padrão da Fração de Ejeção obtida nos diferentes grupos nas duas avaliações

<b>Variável</b>	<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>Média</b>	<b>Mediana</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Valor de <i>p</i></b>
<b>1ª Avaliação da FE</b>	S	11	56,21	55,30	50,10	62,50	4,41	
	CS	14	61,67	60,60	48,90	74,80	7,23	
	EN	11	27,98	24,20	21,10	37,50	5,96	
	IM	15	27,95	30,03	11,37	35,90	7,56	<0,001
<b>2ª Avaliação da FE</b>	S	11	53,02	53,70	36,90	68,10	9,27	
	CS	14	54,97	52,75	41,70	73,10	7,93	
	EN	11	28,79	24,40	13,20	62,70	14,25	
	IM	15	27,72	27,20	15,77	43,00	8,15	<0,001
<b>Diferença (Final – Inicial)</b>	S	11	-3,19	-2,80	-15,40	12,80	10,37	
	CS	14	-6,71	-8,67	-19,20	16,90	11,06	
	EN	11	0,81	-2,10	-9,50	28,60	11,05	
	IM	15	-0,24	0,50	-12,83	20,50	8,19	0,237

Gráfico 5 - Apresentação da média, mediana e desvio padrão da mensuração da Fração de Ejeção do ventrículo esquerdo nas duas avaliações.



Considerando-se que houve diferença significativa entre os 4 grupos, estes foram comparados dois a dois. Na tabela abaixo (Tabela 14) são apresentados os valores de  $p$  dessas comparações.

Tabela 14 - Comparações entre os valores de  $p$  obtidos das variáveis da FE dos animais.

<b>Variável</b>	<b>Valor de <math>p</math></b>					
	<b>S X CS</b>	<b>S X EN</b>	<b>S X IM</b>	<b>CS X EN</b>	<b>CS X IM</b>	<b>EN X IM</b>
<b>1ª Avaliação da FE</b>	0,044	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,992
<b>2ª Avaliação da FE</b>	0,629	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,787

Na Tabela 15 são apresentados, para cada grupo, os valores de  $p$  das comparações entre os momentos de avaliação.

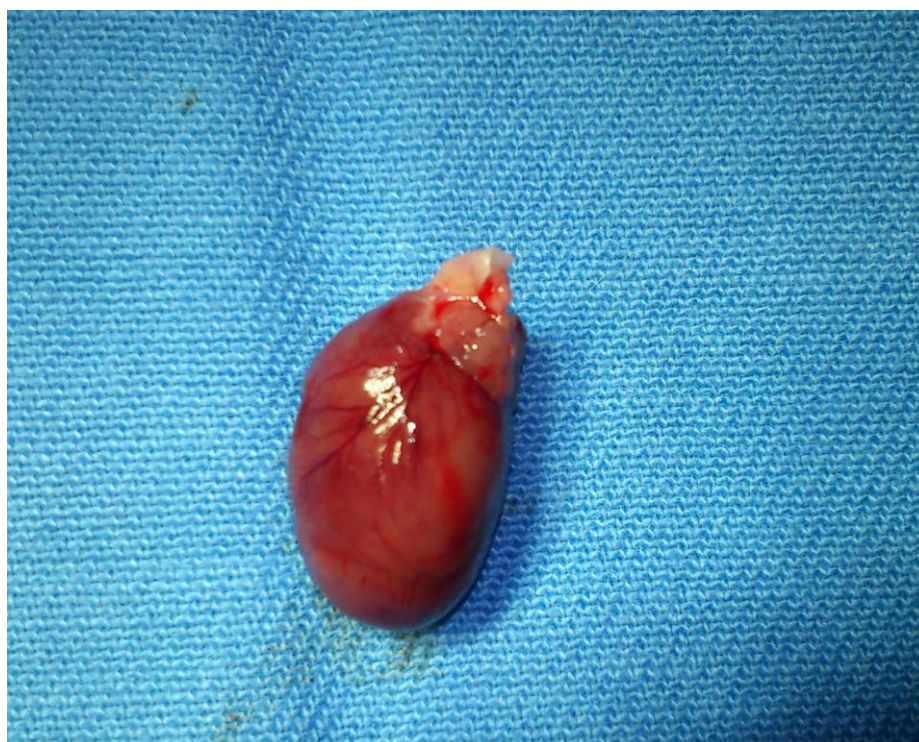
Tabela 15- Comparação entre os valores de  $p$  entre os momentos de avaliação da FE.

<b>Grupo</b>	<b>Valor de <math>p</math> (Início x Final)</b>
<b>S</b>	0,332
<b>CS</b>	0,041
<b>EM</b>	0,812
<b>IM</b>	0,913

#### 6.4 Avaliação morfológica

Após a remoção do coração vemos macroscopicamente a diferença entre o órgão que não foi submetido ao infarto (Figura 28) com aspecto integro e o infartado (Figura 29) que possui aspecto acinzentado, flácido e distorcido.

Figura 28: Aparência do coração saudável após remoção do órgão.



Fonte a autora.



Figura 29: Aparência do coração infartado, após a remoção do órgão.



Fonte: a autora

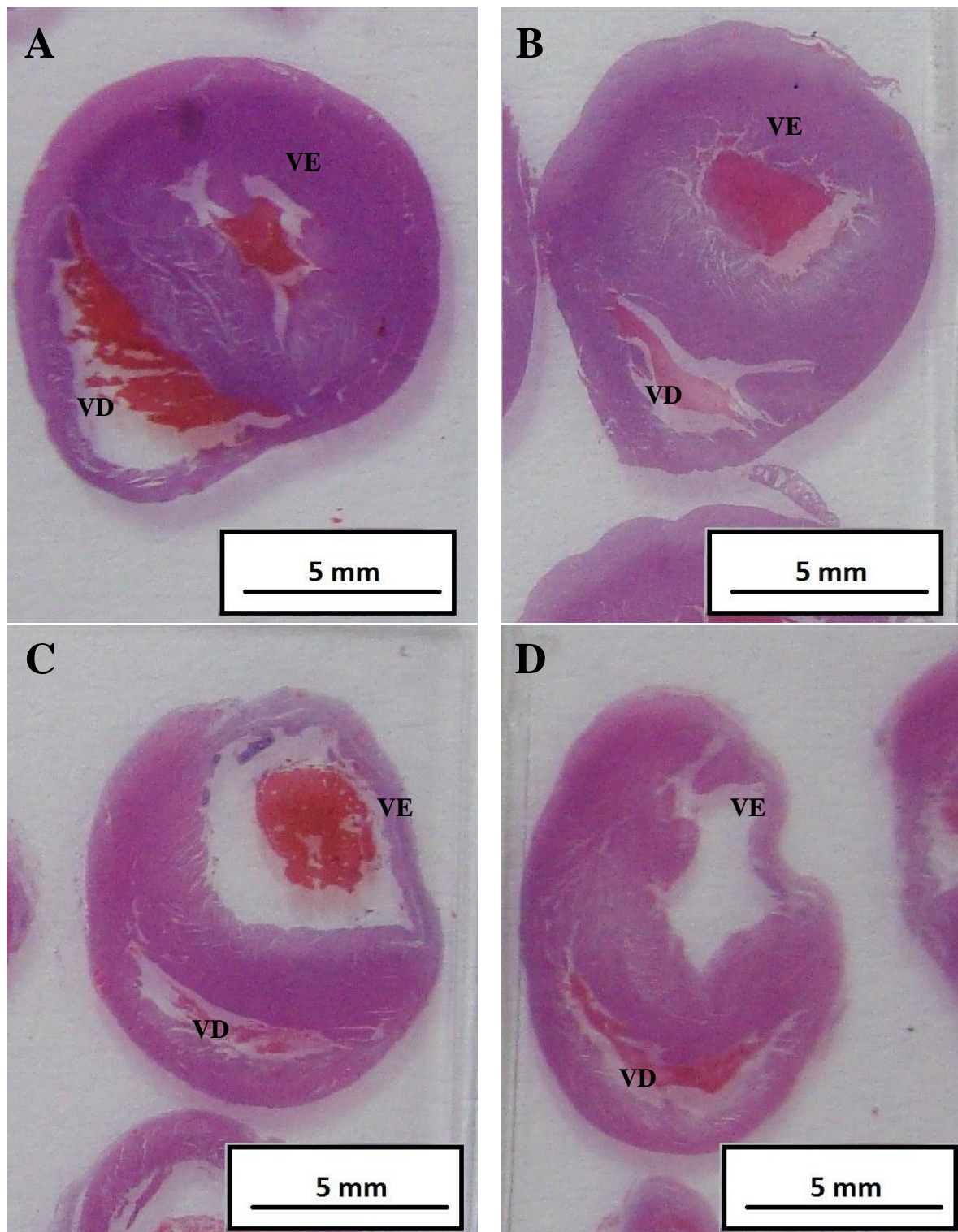
#### **6.4.1 Hematoxilina e eosina**

Na visão macroscópica do coração quando comparado os indivíduos saudáveis em relação aos que passaram pelo procedimento cirúrgico de indução ao infarto foi possível visualizar que o infarto promoveu a remodelação tecidual com redução na espessura da parede do ventrículo esquerdo e aumento da cavidade ventricular esquerda (Figura 30).

A coloração por HE nos possibilita identificar as fibras musculares no tecido saudável e o local lesionado em decorrência do infarto que apresenta a perda do alinhamento de feixes musculares e regiões em que o tecido muscular foi substituído por tecido conjuntivo fibroso.

A avaliação histológica demonstra os aspectos de normalidade do músculo cardíaco no grupo S e também no grupo CS. A avaliação das lâminas dos grupos EN e IM apresenta aspectos histopatológicos com áreas de reparo por substituição onde o músculo cardíaco afetado pelo infarto foi substituído por tecido conjuntivo fibroso na área central do VE correspondendo ao infarto (Figura 31) e na área lateral do VE próximo ao septo interventricular correspondendo a área de transição (Figura 32).

Figura 30: Visão macroscópica dos cortes corados em Hematoxilina e Eosina. A) grupo S; B) grupo CS; C) grupo EN; D) CS. VE= ventrículo esquerdo, VD= ventrículo direito.

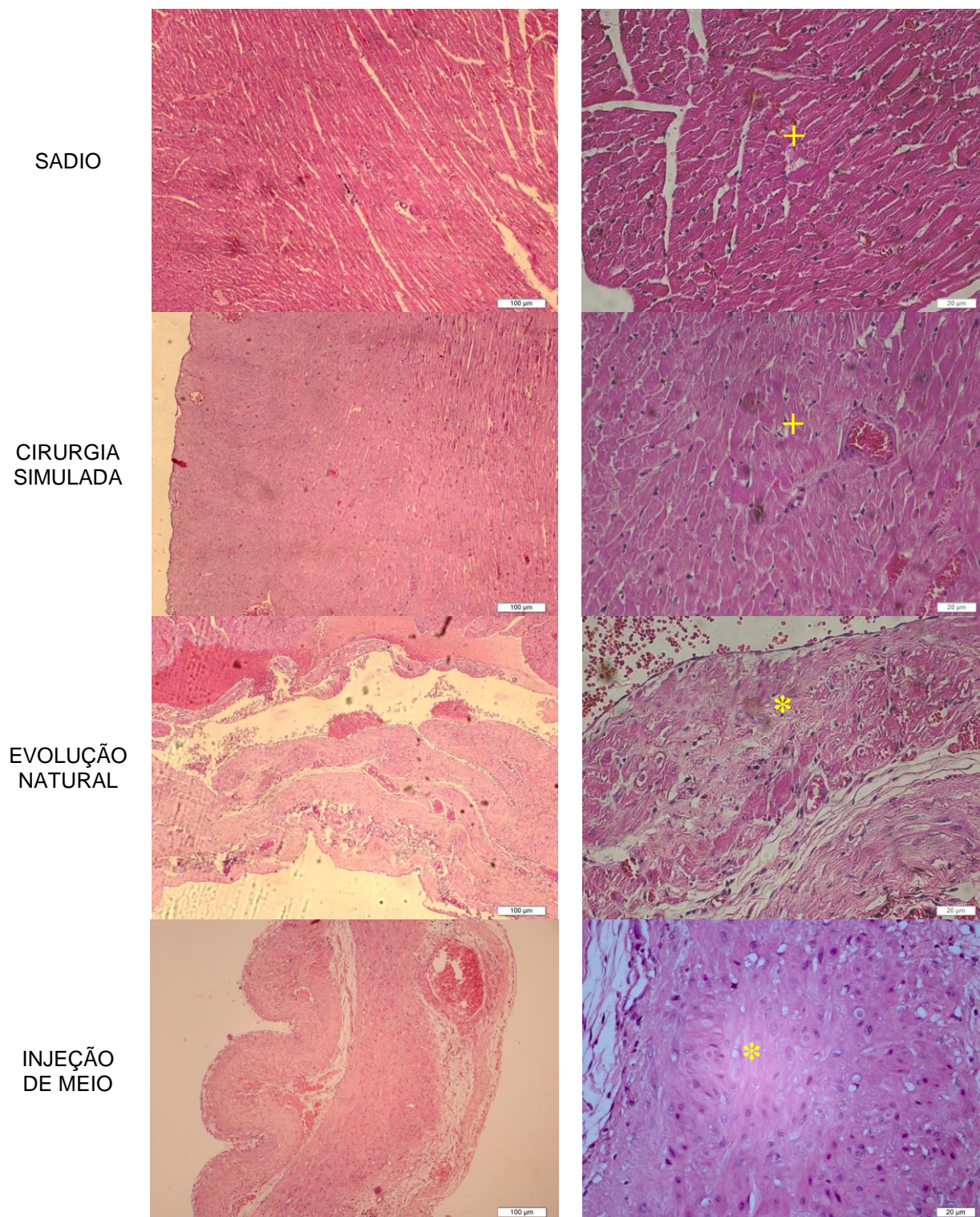


Fonte: a autora.



Figura 31: Coloração HE, apresentando os grupos de estudo nos aumentos de 100x e 400x na região central do VE. + = aspecto normal, \* = remodelação tecidual.

Hematoxilina/Eosina (H&E)

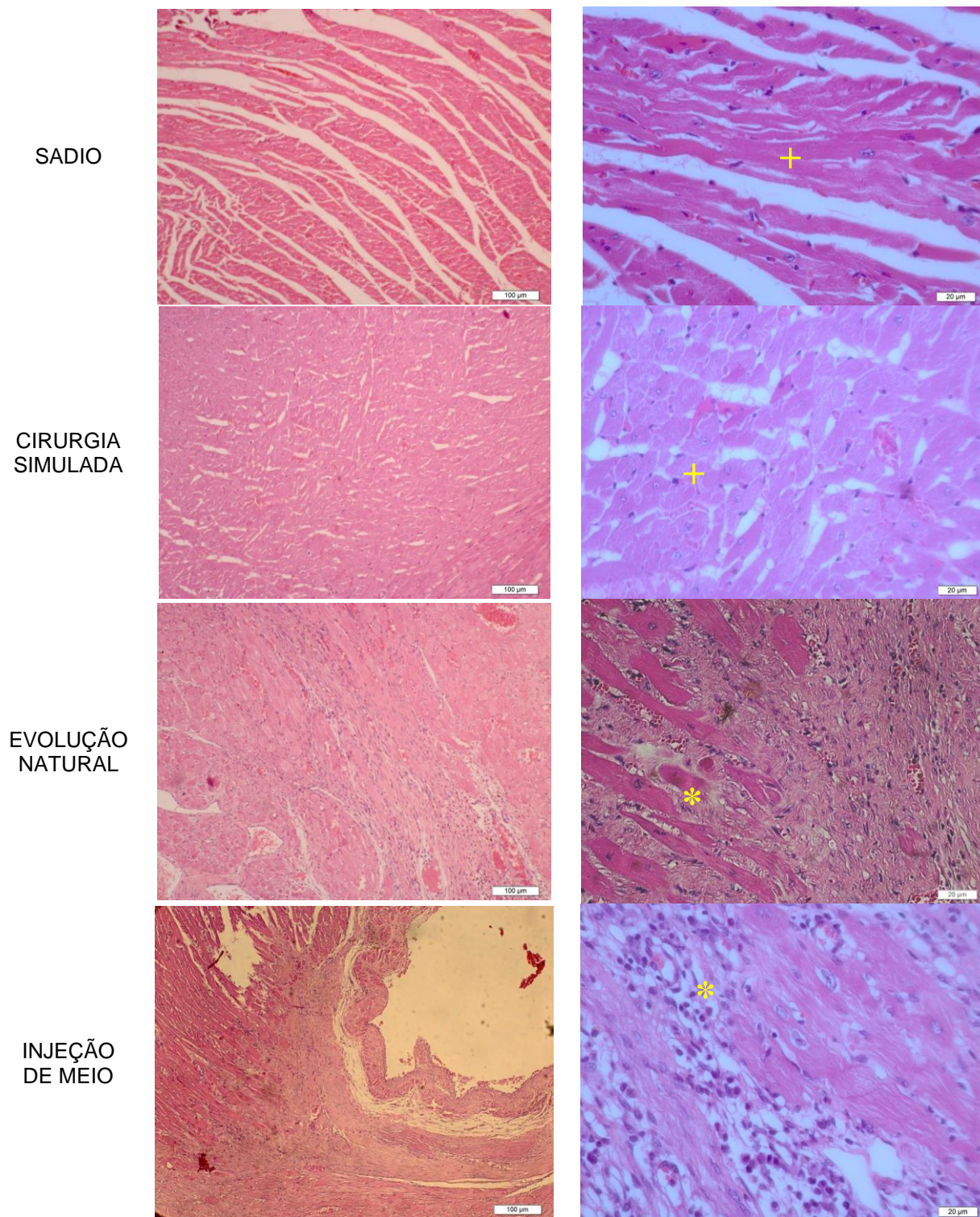


Fonte: a autora.



Figura 32: Coloração HE, apresentando os grupos de estudo nos aumentos de 100x e 400x na região lateral do VE. + = aspecto normal, \* = remodelação tecidual.

Hematoxilina/Eosina (H&E)



Fonte: a autora.

#### **6.4.2 Tricrômio de Masson**

O método histoquímico que utiliza o Tricrômio de Masson mostra as áreas com fibras colágenas em azul e em vermelho o tecido muscular.

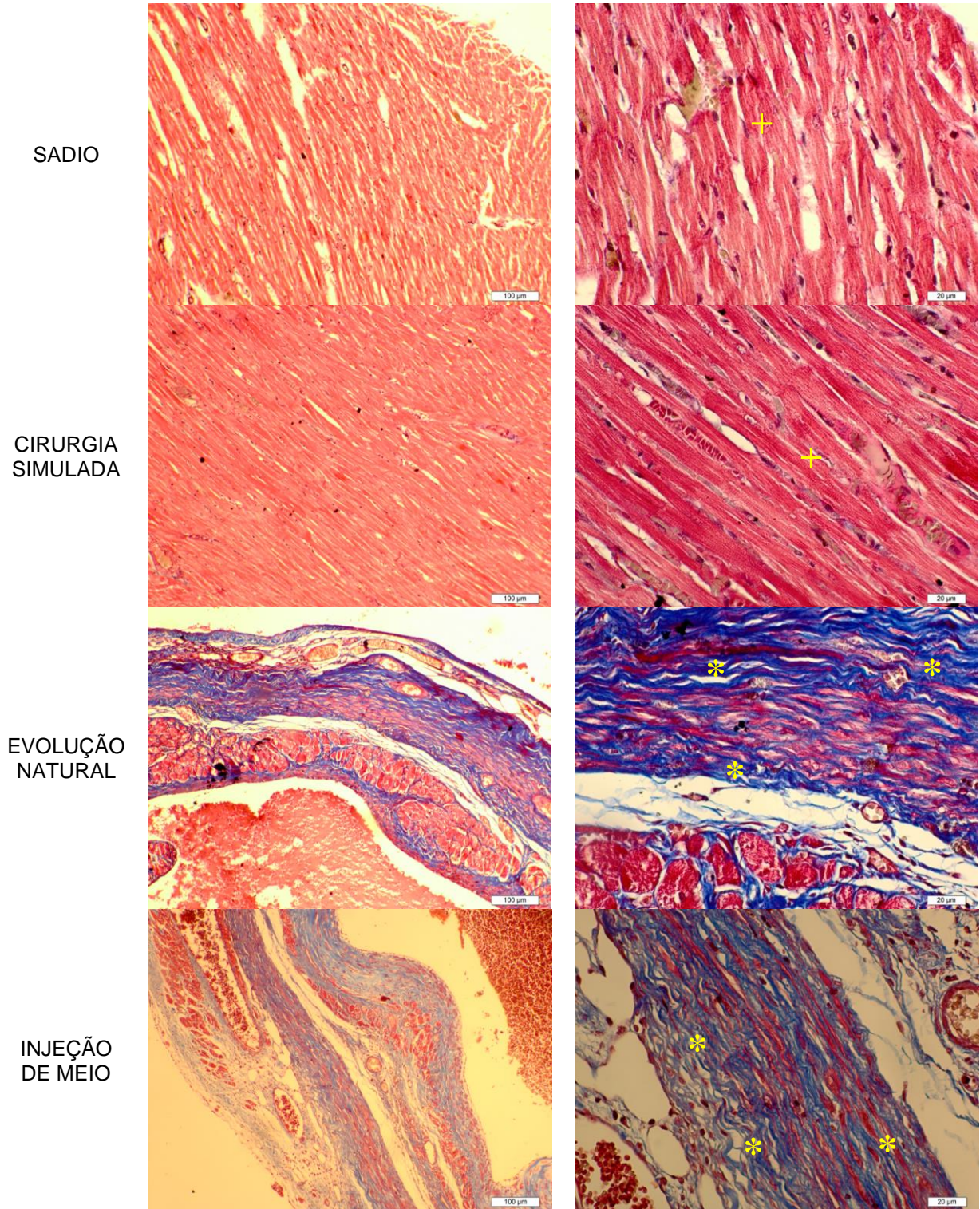
A avaliação das lâminas do grupo S e CS apresenta marcação discreta para fibras colágenas nas regiões de tecido conjuntivo perimuscular.

Nos grupo EN e IM a histoquímica revela áreas de intensa substituição do miocárdio por tecido conjuntivo rico em fibras colágenas, confirmando a alteração tecidual ocasionada pelo infarto, ocorrendo a perda do tecido muscular que promove a contração cardíaca alterando a funcionalidade do coração. Área central do VE correspondendo ao infarto (Figura 33) e área lateral do VE correspondendo a área de transição (Figura 34)



Figura 33: Coloração Tricrômio de Masson, apresentando os grupos de estudo nos aumentos de 100x e 400x na região central do VE. + = aspecto normal, \* = deposição de colágeno.

### Tricrômio de Masson

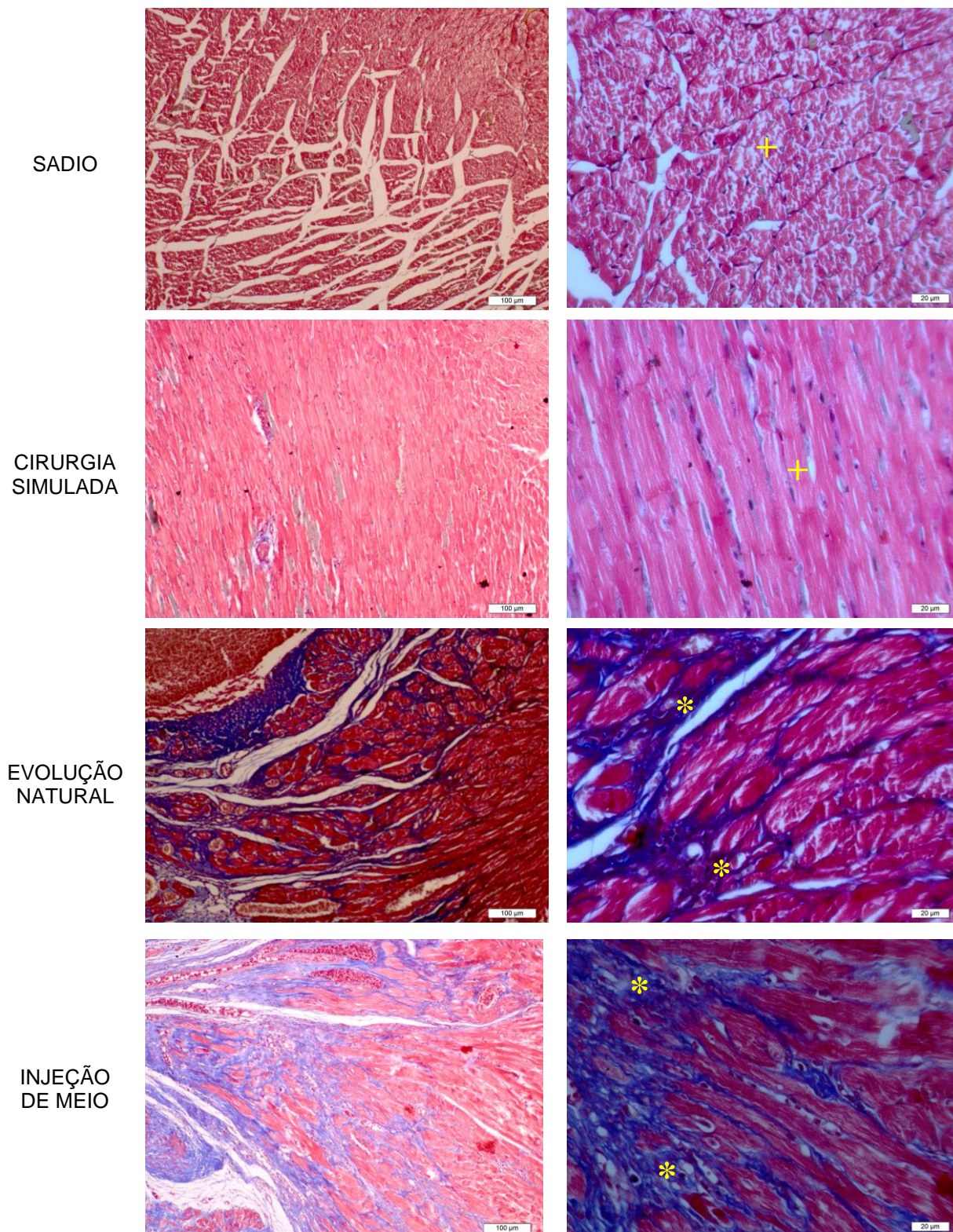


Fonte: a autora.



**Figura 34:** Coloração Tricrômio de Masson, apresentando os grupos de estudo nos aumentos de 100x e 400x na região lateral do VE.. + = aspecto normal, \* = deposição de colágeno.

### Tricrômio de Masson



Fonte: a autora.

## 7 DISCUSSÃO

O infarto do miocárdio é composto por vários eventos sequenciais, cerca de 10 segundos após a oclusão da artéria coronária, o tecido do músculo cardíaco se torna cianótico e, em vez de se contrair, faz um abaulamento durante a sístole. Nos humanos, visualmente nas primeiras 12 horas não é possível identificar macroscopicamente o infarto. Em 24 horas, o infarto pode ser reconhecido por sua coloração pálida na superfície do ventrículo acometido. Após 3 a 5 dias, o infarto se torna mosqueado e mais nitidamente delineado, com uma região pálida, amarelada e necrótica limitada por uma zona hiperêmica (RUBIN, 2006 p. 559). Estes eventos ocorrem quando o coração apesar da disfunção ventricular que está se desenvolvendo ainda consegue manter sua capacidade de bombear o sangue de modo a conduzir nutrientes e oxigênio a todo organismo. Quando isto não é possível ocorre o óbito.

No desenvolvimento da indução ao infarto do miocárdio nos modelos experimentais pesquisados encontramos resultados de mortalidade que são semelhantes aos estudos de Zornoff e colaboradores (2009) que apresentaram o índice entre 40 e 60% dos animais, Werneck-de-Castro e colaboradores (2006) de 35%, no estudo de Pabis e colaboradores (2008) foi de 34,5%. Esta mortalidade deve-se em decorrência do trauma cirúrgico, disfunção cardíaca e edema agudo de pulmão. A mortalidade pode ser de 100% quando o local da oclusão da artéria coronária é muito próxima a origem e ocorre o comprometimento da artéria septal e quando a área do infarto é maior que 65% do músculo (Werneck-de-Castro et al., 2006).

No estudo de Gao e colaboradores (2011) ocorreram 22,1% de óbitos no momento da indução ao infarto e 2,2% óbitos no grupo *Sham*, que corresponde ao grupo CS, onde não houve nenhum óbito. O grupo IM foi submetido a uma segunda cirurgia na qual foi administrada a injeção de meio, neste houve a necessidade de intubação orotraqueal do animal devido ao tempo necessário para a realização do procedimento e pelo fato que os animais já estavam com comprometimento cardíaco demonstrado pelo exame ecocardiográfico. A ocorrência de óbitos foi atribuída a disfunção ventricular e a intubação orotraqueal que é as cegas pode ocasionar traumatismos de vias aéreas, edema



de glote, hemorragias e complicações associadas que ocasionam a morte (SEIDEL et al., 1997).

Estas informações a respeito dos efeitos da intubação orotraqueal nos remetem a importância da utilização de outras metodologias de ventilação pulmonar como a bomba de ventilação manual que utilizamos no procedimento de indução ao infarto que se demonstrou eficaz e não promoveu danos as vias aéreas. Foram excluídos do estudo os animais que não apresentaram FE inferior a 40% o que correspondeu a 45,3% dos animais avaliados pela ecocardiografia, no estudo de Pabis e colaboradores (2008) foi de 26,5% esta variação pode ser pela metodologia empregada na indução ao infarto que não foi idêntica a utilizada.

Outro fator que pode levar ao óbito no procedimento que simula o transplante de células é o volume de meio de injetado na musculatura cardíaca infartada que já esta afetada e com uma menor espessura da parede do VE. O volume de 200µl que utilizamos já havia sido testado anteriormente em nosso grupo (BROFMAN, et al., 2004; BERARDI, 2010; BERARDI et al., 2011; OTTOBONI, 2012) e demonstrou ser seguro sua utilização e adequado. Escolhemos como local de injeção a transição entre a lesão e tecido saudável, pois neste local a espessura da parede do VE é maior que na lesão facilitando a aplicação e reduzindo o risco de perfuração total da parede do VE. Neste local também tem uma melhor oferta de nutrientes e oxigênio para promover a integração das células transplantadas no miocárdio. De acordo com Tousoulis e colaboradores (2008) comentaram os mecanismos de entrega e os tipos de células aplicadas nos estudos de regeneração do coração como a injeção direta na parede do ventrículo lesionado mais eficaz desde que não seja aplicada diretamente no local isquêmico ou cicatricial uma vez que nestes locais há um fornecimento insuficiente de sangue. Com estas informações optamos pela aplicação na região da borda cicatricial.

Uma das análises foi o acompanhamento da variação de peso que possibilitou a verificação de tendências a correlações entre os grupos, os grupos S e CS demonstraram valores diferentes dos grupos EN e IM. Pode-se verificar em geral que houve um ganho de peso em todos os grupos o que pode ser

atribuído ao fato de nossos animais ainda estarem em fase de crescimento. O rato é considerado adulto após atingir 267 gramas, mas continua em crescimento chegando aos 500 gramas (SIROIS, 2007) com expectativa de vida de três anos e meio (LAPCHIK; MATTARAIA; KO, 2009, p.241). Gao e colaboradores (2011) após oito semanas de acompanhamento não obteve variação de peso com diferença estatística em relação a animais infartados e o grupo *Sham*. Este resultado pode ser atribuído ao fato de não ter sido utilizado critérios para classificar a intensidade do infarto, podendo estes animais ter apenas infartos que não levam a um comprometimento grave do músculo cardíaco.

Este comprometimento pode ser avaliado pela ecocardiografia que vem ganhando espaço nos estudos morfológicos e funcionais em ratos infartados (SIROIS, 2007) com fundamental importância no diagnóstico das miocardiopatias. Permite a quantificação do grau de comprometimento da função sistólica, importante marcador prognóstico em pacientes com insuficiência cardíaca, assim como a detecção de alterações da contração segmentar, indicativo de doença arterial coronariana. Em pacientes com infarto do miocárdio, a ecocardiografia é amplamente utilizada para o diagnóstico, avaliação funcional, estratificação de risco e detecção de complicações, tais como comunicação interventricular, ruptura do músculo papilar, pseudo-aneurisma, trombo e ruptura da parede livre do VE (KRIEGER 2008, p.137).

Um dos parâmetros que pode-se avaliar durante a ecocardiografia é a frequência cardíaca que em ratos varia de 250 a 450 batimentos por minuto sob anestesia. Autores como Harkness (1993, p. 49) e Sirois (2007) demonstraram que os anestésicos como halotano, diazepam, cetamina e xilazina interferem na frequência cardíaca. No estudo utilizamos a associação de cetamina e xilazina e obteve-se grande variação nos valores obtidos não corroborando com Sirois (2007) e quando comparado ao estudo de Harkness (1993) obtivemos frequências cardíacas abaixo e acima de seus valores de referência. Mesmo com alterações nos resultados não proporcionaram diferença estatística significativa entre os grupos avaliados. A variação na frequência cardíaca pode estar ligada a ação do anestésico utilizado para a realização da ecocardiografia em cada organismo como demonstrou Sirois (2007).

A avaliação ecocardiográfica também permite visualizar e aferir a área e o volume do VE tanto em sístole quanto em diástole. Quando em diástole, corresponde ao momento do ciclo cardíaco em que o VE relaxa a musculatura acomodando um adequado volume de sangue para então a distribuí-lo pelo organismo levando oxigênio e nutrientes, e na sístole corresponde a contração deste VE e proporciona a ejeção do sangue que sai pela aorta sendo direcionado pelos vasos sanguíneos para ser distribuído por todo organismo (KRIGER 1993, p.140).

O conhecimento da área e volume diastólicos e sistólicos finais mensurados pelo ecocardiograma possibilita avaliar a funcionalidade do VE em bombear o sangue. Govindan e colaboradores (2012) utilizaram a ecocardiografia transtorácica em ratos Sprague-Dawley (330gr) sadios obtendo o valor da FE de 57% corroborando com nossos resultados. Já Gao e colaboradores (2011) obtiveram a FE de 81% nos animais *Sham* e Hwangbo e colaboradores (2010) mensuraram a FE em 71,2% também no grupo *Sham*. Ambos os pesquisadores obtiveram valores de FE superiores na primeira avaliação ecocardiográfica. Após 4 semanas eles repetiram a avaliação ecocardiográfica onde ocorreu uma redução de 5% na FE, em nossos resultados na segunda avaliação tivemos a redução de 10% na FE.

Na análise da ADF não foram observadas alterações quando comparados os grupos S com CS ou EN com IM. A disfunção ventricular pode ser observada 3 horas após a oclusão coronariana por comprometimento da contratilidade do miocárdio (ZORNOFF et al., 2009). A primeira avaliação foi com 7 dias após a oclusão, momento em que o miocárdio apresenta muito bem os efeitos ocasionados pelo infarto. Quando comparamos os animais não submetidos ao infarto em relação aos infartados foi observado que a dilatação ventricular ocorreu em ambas as avaliações ecocardiográficas. Sabe-se que a dilatação ventricular ocorre durante o processo de remodelamento após o infarto, determinando o aumento do volume diastólico final (VDF) do VE e o comprometimento da função sistólica ventricular (PFEFFER & BRAUNWALD, 1990).

Após o infarto do miocárdio ocorre o remodelamento tecidual do VE ocasionando a disfunção ventricular. Quando na avaliação ecocardiográfica do VE a FE é menor que 40% caracteriza-se uma disfunção ventricular grave (BROFMAN, et al., 2004; MINICUCCI et al., 2007). Este parâmetro foi tomado como critério de inclusão na pesquisa, sendo aplicado aos grupos EN e IM o que comprova a lesão e o acometimento do músculo cardíaco.

Nem todos os pesquisadores utilizam como critério de inclusão no estudo o valor da FE menor que 40%, Gao e colaboradores (2011) utilizaram animais infartados com a FE média de 46,3%. Hwangbo e colaboradores (2010) que também não utilizaram o critério tiveram a FE média de  $71,2 \pm 6,7\%$  no grupo *Sham*, e que após quatro semanas de acompanhamento foi para  $66,3 \pm 8,3\%$ , já no grupo que recebeu injeção de *PBS* a FE média de  $35,5 \pm 5,5\%$  aumentou para  $45,7 \pm 9,3\%$ , este valor não foi significativo. Guo e colaboradores (2007) injetou meio de cultura DMEM e a mensuração da FE foi de 58,3%. Tanto nos estudos dos grupos que receberam a injeção de tampão fosfato-salina (*PBS*) quanto a de meio demonstraram que estes não resultam em alteração funcional do coração. Este resultado foi semelhante ao do nosso grupo IM. Tanto o *PBS* quanto o meio de cultura que utilizamos eram apenas o veículo para a administração das células, estes resultados comprovam que os mesmos não determinaram qualquer alteração funcional, permanecendo a dilatação e o pouco espessamento da parede do VE.

A pesquisa pré-clínica possibilita obter resultados funcionais como os apresentados pela avaliação ecocardiográfica, havendo também a possibilidade da avaliação histológica que permite compreender como o órgão responde a lesão e como ocorre o processo de remodelamento ventricular ao nível celular.

Após 39 dias da indução ao infarto observou-se na avaliação histológica um tecido já remodelado onde apresentaram aspecto de fase reparadora da inflamação. Minicucci et al. (2007) nos explica que no rato este processo de remodelação leva 21 dias. Após o infarto o tecido necrótico é reabsorvido e substituído por tecido fibroso de cicatrização com deposição de colágeno e posterior contração da área fibrótica. Simultaneamente a necrose das miofibrilas, há desintegração do colágeno interfibrilar. Esse fato ocasiona perda do tecido de

sustentação, o que torna a região mais distensível e, conseqüentemente, mais suscetível a deformações. Assim, pode ocorrer deslizamento de áreas musculares necróticas, com realinhamento do miócitos na parede infartada. Como resultado, há afinamento da região e dilatação do segmento infartado. Essa dilatação aguda, caracterizada por adelgaçamento e distensão da região infartada, é denominada expansão do infarto (ZORNOFF e SPADARO, 1997).

Na visão macroscópica foi possível identificar o infarto, pois a região fica deprimida e macia, com aspecto flácido e distorcido, além da coloração pálida e acinzentada do tecido cicatrizado (RUBIN, 2006 p. 559). A possibilidade da identificação desta área também foi um dos motivos para a escolha da injeção intracardiaca do meio de cultura de modo a simular a utilização da terapia celular e comprovar que o mesmo não promove alterações morfofuncionais. A aplicação da injeção foi na transição do tecido saudável para isquêmico, não foi no centro da lesão, pois neste local a parede ventricular é muito fina podendo ocorrer uma perfuração da parede ocasionado hemorragia. Além disso, nesta região comprometida há pouco fornecimento de sangue e nutrientes que iriam prover as células transplantadas.

Com a oclusão da artéria coronária esquerda ocorre o infarto das paredes apical, anterior e ante-septal do ventrículo esquerdo. Primeiro ocorre a necrose no subendocárdio e posteriormente no subepicárdio em um período de várias horas resultando então um infarto transmural o qual foi identificado nas avaliações (RUBIN, 2006 p. 559; ZORNOFF, et al., 2009; DASKALOPOULOS, et al. 2012).

A sobrecarga no coração em curto prazo leva a um imediato aumento na síntese de colágeno. A fibrose intersticial, que ocorre em praticamente todas as formas de disfunção ventricular, constitui um aspecto obrigatório da resposta hipertrófica. O acúmulo de proteínas da matriz resulta, pelo menos em parte, da estimulação de fibroblastos cardíacos pelo TGF- $\beta$  (fator de crescimento transformador beta - citocina que regula a formação e degradação de matriz extracelular) e Angiotensina II (peptídeo que regula a pressão sanguínea e homeostase dos fluidos corporais). Após infarto do miocárdio, o processo de fibrose substitui os miócitos necróticos e impede a ruptura cardíaca. Tal como

muitas respostas adaptativas do coração, a fibrose miocárdica por fim interfere no relaxamento diastólico e desregula a difusão de oxigênio e nutrientes (RUBIN, 2006 p. 542; KRIEGER, 2008 p.240).

A perda do alinhamento de feixes musculares no coração com infarto cicatrizado determina o comprometimento da função sistólica da câmara não só em decorrência da perda de miócitos, mas também pela área do infarto, pois as diferentes localizações podem comprometer de modo diverso a capacidade do miocárdio de reduzir o volume da câmara no momento da sístole (KRIEGER, 2008 p.240).

A coloração em HE possibilitou a comparação no estudo do tecido sadio em relação ao isquêmico nos demonstrando a perda do alinhamento de feixes musculares no coração com infarto cicatrizado, a perda dos cardiomiócitos e a posição do infarto (KRIEGER, 2008 p.240).

Pela coloração de Tricrômio de Masson foi evidenciado grande deposição de colágeno na área fibrótica corroborando com a descrição histológica de Jin e colaboradores (2012) e Guo e colaboradores (2010). O acúmulo de matriz extracelular e miofibroblastos em áreas de lesão tecidual após isquemia induzida pelo infarto do miocárdio apresenta uma barreira potencial que prejudica a penetração de células-tronco reparadoras ou progenitoras mobilizadas a partir de reservatórios periféricos. O papel desempenhado pelos fibroblastos cardíacos na produção e degradação da matriz extracelular pode ser crucial na regulação da remodelação cardíaca e em permitir a mobilização de células-tronco e/ou progenitoras no miocárdio infartado (DAI et al., 2011). A realização do transplante celular intramiocárdico pode apresentar uma maior eficiência, já que as células-tronco/progenitoras têm dificuldade em chegar ao local isquêmico.

Um dos objetivos da terapia celular é a busca pela angiogênese, processo responsável pela formação de novos vasos sanguíneos, que são mediados por fatores angiogênicos como o VEGF (Fator de crescimento do endotélio vascular). As células endoteliais são ativadas por aquele fator, que resulta no aumento da permeabilidade do vaso, migração celular e proliferação auxiliando na recuperação do miocárdio após o infarto (WU et al, 2008; FORMIGA et al., 2010). Ainda são desconhecidas muitas das ações da terapia celular, sendo por

tanto necessário observar como estas agem no local lesionado e sistemicamente.

Os resultados da avaliação do modelo de infarto do miocárdio que realizamos demonstram que o modelo animal e a metodologia utilizada são eficazes para os estudos pré-clínicos de desenvolvimento de tratamentos para o infarto.

## 8 CONCLUSÕES

1 - Concluimos após as avaliações morfofuncionais cardíacas que a metodologia utilizada de indução ao infarto do miocárdio é eficaz sendo adequada para pesquisas pré-clínicas.

2 - A injeção do meio de cultura não determinou nenhuma alteração em relação aos animais do grupo EN sob a lesão e a disfunção ventricular.

3 - A análise dos parâmetros ecocardiográficos, área e volume sistólicos e diastólicos finais e FE, possibilitou conhecer como é a função cardíaca em animais sadios e infartados.

4 - A função cardíaca é influenciada após procedimento cirúrgico de indução ao infarto do miocárdio, promovendo aumento da área do VE e redução na FE.

5 - Durante a análise morfológica foi possível visualizar macroscopicamente a alteração de aspecto e coloração da região do VE nos animais infartos quando comparado aos animais que não possuíam infarto.

6 - Na avaliação histológica a coloração em HE nos possibilitou a identificação do infarto pela redução da espessura da parede do VE e pelo remodelamento tecidual no local. A coloração por Tricrômio de Masson possibilitou a verificação dos locais onde ocorreu a substituição do tecido muscular cardíaco pelo tecido conjuntivo devido a deposição de colágeno.



## 9 REFERÊNCIAS

BERARDI, Gel Roberto Marmit. **Transplante de células-tronco derivadas do tecido adiposo tratadas com óxido nítrico em ratos submetidos ao infarto do miocárdio**. Curitiba, 2010. Dissertação de Mestrado – Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

BERARDI, G.R.M.; REBELATTO, C.L.K.; TAVARES, H.F.; INGBERMAN, M.; SHIGUNOV, P.; BARCHIKI, F.; AGUIAR, A.M.; MIYAGUE, N.; FRANCISCO, J.C.; CORREA, A.; SENEGAGLIA, A.; SUSS, P.H.; MOUTINHO, J.A. SOTOMAIOR, V.S.; NAKAO, L.; BROFMAN, P.R.S. Transplantation of SNAP-treated adipose tissue-derived stem cells improves cardiac function and induces neovascularization after myocardium infarct in rats. **Exp Mol Pathol**. v. 90, n. 2, p. 149-156, 2011.

BOCCHI, E.A.; ISSA, V.S. Transplante celular para o tratamento de pacientes com insuficiência cardíaca. **Revista SOCESP**. v. 13, n. 4, p. 427-433, 2003.

BREHM, M.; STANSKE, B.; STRAUER, B.E. Therapeutic potential of stem cells in elderly patients with cardiovascular disease. **Exp Gerontol**. v. 43, ed. 11, p. 1024–1032, 2008.

BROFMAN, P.R.S.; CARVALHO, K.A.; GUARITA-SOUZA, L.C.; REBELATTO, C.L.K.; HANSEN, P.; SENEGAGLIA, A.C.; MIYAGUE, N.; FURUTA, M.; FRANCISCO, J.C.; OLANDOSKI, M. Transplante celular: análise funcional, imunocitoquímica e histopatológica em modelo experimental de miocardiopatia isquêmica utilizando diferentes células. **Rev Bras Cir Cardiovasc**. v. 19, n. 3, p. 261-266, 2004.

COBEA – COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. Princípios Éticos na Experimentação Animal. Edição 1991. Disponível em: <http://www.cobea.org.br/> 1991. Acesso em 04 de maio de 2011.

DAI, B.; HUANG, W.; XU, W.; MILLARD, R.W.; GAO, M.H.; HAMMOND, K.; MENICK, D.R.; ASHRAF, M.; WANG, Y. Reduced collagen deposition in infarcted myocardium facilitates induced pluripotent stem cell engraftment and angiomyogenesis for improvement of left ventricular function. **J Am Coll Cardiol**. v. 58, n. 20, p. 2118-2127, 2011.

DASKALOPOULOS, E.P.; JANSSEN, B.J.A.; BLANKESTEIJN, M. Myofibroblasts in the infarct area: concepts and challenges. **Microsc Microanal**. v. 18, p. 35-49, 2012.

DATASUS. Ministério da Saúde. **Sistema Único de Saúde**. Perfil da mortalidade do brasileiro. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br>. Acesso em 30 maio, 2013.

DAWN, B.; STEIN, A.B.; URBANEK, K.; ROTA, M.; WHANG, B.; RASTALDO, R.; TORELLA, D.; TANG, X.L.; REZAZADEH, A.; KAISTURA, J.; LERI, A.; HUNT, G.; VARMA, J.; PRABHU, S.D.; ANVERSA, P.; BOLLI, R. Cardiac stem cells delivered intravascularly traverse the vessel barrier, regenerate infarcted myocardium, and improve cardiac function. **Proc Nat Acad Sci U S A**. v. 102, n. 10, p. 3766-3771, 2005.

ETZION, S.; KEDES, L.H.; KLONER, R.A.; LEOR, J. Myocardial regeneration: present and future trends. **Am J Cardiovasc Drugs**. v. 1, n. , p. 233-244, 2001.

FAGUNDES, D.J.; TAHA, M.R. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 19, n. 1, p. 59-65, 2004.

FISHBEIN, M.C.; MACLEAN, D.; MAROKO, P.R. The histopathologic evolution of myocardial infarction. **Chest J**. v. 73, n. 6, p. 843-849, 1978.

FORMIGA, F.R.; PELACHO, B.; GARBAYO, E.; ABIZANDA, G.; GAVIRA, J.J.; SIMON-YARZA, T.; MAZO, M.; TAMAYO, E.; JAUQUICOA, C.; ORTIZ-DE-SOLORZANO, C.; PRÓSPER, F.; BLANCO-PRITO, M.J. Sustained release of VEGF through PLGA microparticles improves vasculogenesis and tissue remodeling in an acute myocardial ischemia-reperfusion model. **J Control Release**. v. 147, p. 30-37, 2010.

FOX, S.I. **Fisiologia Humana**. São Paulo, Manole, 2007.

GABALLA, M.A.; GOLDMAN, S. Ventricular Remodeling in Heart Failure. **J Card Fail**. v. 8, n. 6, p. 476-485, 2002.

GAO, J.; ZHONG, M.K.; FAN, Z.D.; YUAN, N.; ZHOU, Y.B.; ZHANG, F.; GAO, X.Y.; ZHU, G.Q. SOD1 overexpression in paraventricular nucleos improves post-infarct myocardial remodeling and ventricular function. **Pflugers Archiv**. v. 463, n. 2, p. 297-307, 2011.

GELAPE, C.L.; SANCHES, M.D.; TÔRRES, E.M.; COUTO, C.A.; PAIXÃO, P.C.; MORALES, K.; MELO, J.R.C. Echocardiographic analysis of the ventricular diastolic function after myocardial infarction in rats. **Rev Bras Cir Cardiovasc**. v. 20, n.1, p. 63-68, 2005.

GOVINDAN, S.; MCELLIGOTT, A.; MUTHUSAMY, S.; NAIR, N. BAREFIELD, D.; MARTIN, J.L.; GONGORA, E.; GREIS, K.D.; LUTHER, P.K.; WINEGRAD, S.; HENDERSON, K.K.; SADAYAPPAN, S. Cardiac myosin binding protein-C is a potential diagnostic biomarker for myocardial infarction. **J Mol Cel Cardiol**. v. 52, n. 1, p. 154-164, 2012.

GOWDAK, L.H.W.; SCHETTERT, I.T.; BECKER, C.; KRIEGER, J.E. Análise crítica da utilização de células tronco no tratamento da insuficiência cardíaca. **Revista SOCESP**. v. 14, n. 1, p. 179-185, 2004.

GOWDAK, L.H.W.; SCHETTERT, I.T. Uso de células-tronco na reparação cardíaca. **Hipertensão**. v. 8 n. 4, p. 151-157, 2005.

GUO, J.; LIN, G.S.; BAO, C.Y.; HU, Z.M.; HU, M.Y. Anti-inflammation role for mesenchymal stem cells transplantation in myocardial infarction. **Inflammation**. v. 30, n.3-4, 2007.

HARKNESS, J.E. **Biologia e clínica de coelhos e roedores**. São Paulo: Roca, 1993.

HOU, M.; YANG, K.M.; ZHANG, H.; ZHU, W.Q.; DUAN, F.J.; WANG, H.; SONG, Y.H.; WEI, Y.J.; HU, S.S. Transplantation of mesenchymal stem cells from human bone marrow improves damaged heart function in rats. **Int J Cardiol**. v. 115, n. 2, p. 220-228, 2007.

HWANGBO, S.; KIM, J.; HER, S.; CHO, H.; LEE, J. Therapeutic potential of human adipose stem cells in a rat myocardial infarction model. **Yonsei Med J**. v.51, n.1, p. 69-76, 2010.

JIANG, W.; MA, A.; WANG, T.; HAN, K.; LIU, Y.; ZHANG, Y.; ZHAO, X.; DONG, A.; DU, Y.; HUANG, X.; WANG, J.; LEI, X.; ZHENG, X. Intravenous transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac performance after acute myocardial ischemia in female rats. **Transplant International**. v. 19, n. 7, p. 570-580, 2006.

JIN, P.; WANG, E.; WANG, Y.; HUANG, W.; KUANG, W.; SUN, C.; HU, S. ZHANG, H. Central zone of myocardial: a neglected target area for heart cell therapy. **J Cell Mol Med**. v. 16, n. 3, p. 637-648, 2012.

KAJSTURA, J.; URBANEK, K.; ROTA, M.; BEARZI, C.; HOSODA, T.; BOLLI, R.; ANVERSA, P.; LERI, A. Cardiac stem cells and myocardial disease. **J Mol Cell Cardiol**. v. 45, n. 4, p. 505-513, 2008.

KOCHER, A.A.; SCHUSTER, M.D.; SZABOLCS, M.J.; TAKUMA, S.; BURKHOFF, D.; WANG, J.; HOMMA, S.; EDWARDS, N.M.; ITESCU, S. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. **Nat Med**. v. 7, n. 4, p. 430-436, 2001.

KRIEGER, J.E. **Bases Moleculares das Doenças Cardiovasculares – A integração entre a pesquisa e a prática clínica**. São Paulo: Atheneu, 2008.

LAPCHIK, V.B.V.; MATTARAIA, V.G.M.; KO, G.M. **Cuidados e manejo de animais de laboratório**. São Paulo: Atheneu, 2009.

LODISH, H.; BERK, A.; MATSUDAIRA, P.; KAISER, C.A.; KRIEGER, M.; SCOTT, M. P. **Biologia Celular e Molecular**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

LOPES, R.D.; BATISTA JÚNIOR, M.L.; ROSA, J.C.; LIRA, F.S.; MARTINS JR, E.; SHIMURA, A.Y.; BRUM, P.C.; LANCHÁ JR, A.H.; SEELAENDER, M.C.L. Changes in the production of IL-10 and TNF- $\alpha$  in skeletal muscle of rats with heart failure secondary to acute myocardial infarction. **Arq Bras Cardiol.** v. 94, n.3, p. 313-320, 2009.

LOUZADA, R.A.N.; OLIVEIRA, P.F.; CAVALCANTI-DE-ALBUQUERQUE, J.P.A.; CUNHA-CARVALHO, L.; BALDANZA, M.R.; KASAI-BRUNSWICK, T.H.; GOLDENBERG, R.C.S.; CAMPOS-DE-CARVALHO, A.C.; WERNECK-DE-CASTRO, J.P.S. Granulocyte-colony stimulating factor treatment of chronic myocardial infarction **Cardiovasc Drugs Ther.** v. 24, n. 2, p.121-130, 2010.

MANSUR, A.P.; FAVARATO, D. Mortalidade por doenças cardiovasculares no Brasil e na região metropolitana de São Paulo: Atualização 2011. **Arq Bras Cardiol.** v. 99, n. 2, p. 755-761, 2012.

MATSUBARA, B.B.; ZORNOFF, L.A. Interstitial collagen matrix and its relationship with expansion of acute myocardial infarction **Arq Bras Cardiol.** v. 64, n.6, p. 559-563, 1995.

MIN, J.Y.; YANG, Y.; CONVERSO, K.L.; LIU, L.; HUANG, Q.; MORGAN, J.P.; XIAO, Y.F. Transplantation of embryonic stem cells improves cardiac function in postinfarcted rats. **J Appl Physiol.** v. 92, n. 1, p. 288–296, 2002b.

MINICUCCI, M.F.; AZEVEDO, P.S.; DUARTE, D.R.; MATSUBARA, B.B.; MATSUBARA, L.S.; CAMPANA, A.O.; PAIVA, S.A.R.; ZORNOFF, L.A.M. Comparação de diferentes métodos para medida do tamanho do infarto experimental crônico em ratos. **Arq Bras Cardiol.** v. 89, n. 2, p. 83-87, 2007.

MINICUCCI, M.F.; AZEVEDO, P.S.; SANTOS, D.F.B.; POLEGATO, B.F.; SANTOS, P.P.; OKOSHI, K.; PAIVA, S.A.R.; ZORNOFF, L.A.M. Echocardiographic predictors of ventricular remodeling after acute myocardial infarction in rats. **Arq Bras Cardiol.** v. 97, n. 6, p. 502-506, 2011.

MOTA, A.C.A.; SOARES, M.B.P.; SANTOS, R.R. Uso de terapia regenerativa com células-tronco da medula óssea em doenças cardiovasculares – perspectiva do hematologista. **Rev Bras Hematol Hemot.** v. 27, n. 2, p. 126-132, 2005.

NOVOTNY, N.M.; RAY, R.; MARKEL, T.A.; CRISOSTOMO, P.R.; WANG, M.; WANG, Y.; MELDRUM, D.R. Stem cell therapy in myocardial repair and remodeling. **J Am Coll Surg.** v. 207, n. 3, p. 423-434, 2008.

OBRADOVIĆ, S.; BALINT, B.; ROMANOVIC, R.; TRIFUNOVIĆ, Z.; RUSOVIĆ, S.; BASKOT, B.; DOPUDJA, M.; TRIFUNOVIĆ, G.; RAFAJLOVSKI, S.; JUNG, R.; GLIGIĆ, B. Influence of intracoronary injections of bone-marrow-derived mononuclear cells on large myocardial infarction outcome: quantum of initial necrosis is the key. **Vojnosani Pregl.** v.66, n. 12, p. 998-1004, 2009.

OTTOBONI, G.S. Transplante de células progenitoras endoteliais purificadas e expandidas oriundas do sangue de cordão umbilical humano no miocárdio infartado de rato. Avaliação da função ventricular e histológica. **Dissertação de mestrado**, 2009.

ORTAK, J.; AKIN, I.; KISCHE, S.; NIENABER, C.A.; INCE, H.S. Stem cell use for cardiac diseases as of 2008. **Transfus Aph Sci**. v. 38, n. 3, p. 253–260, 2008.

PABIS, F.C.; MIYAGUE, N.I.; FRANCISCO, J.C.; WOITOWICZ, V.; CARVALHO, K.A.; FARIA-NETO, J.R.; MOISÉS, V.A.; GUARITA-SOUZA, L.C. Echocardiographic assessment of myocardial infarction evolution in young and adult rats. **Arq Bras Car**. v. 91, n. 5, p. 321-326, 2008.

PFEFFER, MA; BRAUNWALD, E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. **Circulation**. v.81, n.4, p. 1161-1172, 1990.

PIAO, h.; YOUN, T.J.; KWON, J.S.; KIM, Y.H.; BAE, J.W.; SOHN, B.; KIM, D.W.; CHO, M.C.; LEE, M.M.; PARK, Y.B. Effects of bone marrow derived mesenchymal stem cells transplantation in acutely infarcting myocardium. **Eur J Heart Fail**. v. 7, n. 5, p. 730-738, 2005.

PINHEIRO, L.M.; ACRA, L.A. Alternatives resources knowledge in laboratory animals research. **Est Biol**. v. 29, n.67, p. 157-163, 2007.

PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA . **Casa Civil**, subchefia para Assuntos Jurídicos Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm) Acesso em 04 abril de 2011.

PSALTIS, P.J.; ZANNETTINO, A.C.W.; WORTHLEY, S.G.; GRONTHOS, S. Concise Review: Mesenchymal stromal cells: potential for cardiovascular repair. **Stem Cells**. v. 26, n. 9, p. 2201-2210, 2008.

REBELATTO, C.L.K.; AGUIAR, A.M.; MORETÃO, M.P.; SENEGAGLIA, A.C.; HANSEN, P.; BARCHIKI, F.; OLIVEIRA, J. KULIGOVSKI, C.; MANSUR, F.; CHRISTOFIS, A.; AMARAL, V.F.; BROFMAN, P.R.S.; GOLDENBERG, S.; NAKAO, L.; CORREA, A. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood and adipose tissue. **Exp Biol Med**. v. 233, n. 7, p.901-913, 2008.

RODRIGUES, T.M.A; PALMEIRA, J.A.O.; MENDONÇA, J.T.; GOMES, O.M. Estudo evolutivo da anatomia das artérias coronárias em species de vertebrados com a técnica de moldagem em acetate de vinil (vinilite). **Rev Bras Cir Cardivasc**. v. 14, n. 4, p.331-339, 1999.

RUBIN E.; GORSTEIN, F.; RUBIN, R.; SCHWARTING, R.; STRAYER, D.  
**Patologia Bases Clinicopatológicas da Medicina.** Rio de Janeiro: Guanabara  
Koogan S.A., 2006.

RUFAlHAH, A.J.; HAIDER, H.K.; HENG, B.C.; YE, L.; TAN, R.S.; TOH, W.S.;  
SIM, E.K.; CAO, T. Therapeutic angiogenesis by transplantation of human  
embryonic stem cell-derived CD 133<sup>+</sup> endothelial progenitor cells for cardiac  
repair. **Reg Med.** v. 5, n. 2, p. 231-244, 2010.

SANTOS, L.; MELLO, A.F.; ANTONIO, E.L.; TUCCI, P.J. Determination of  
myocardial infarction size in rats by echocardiography and tetrazolium staining:  
correlation, agreements, and simplifications. **Braz J Med Biol Res.** v. 41, n. 3, p.  
199-201, 2008

SENEGAGLIA, A.C.; BARBOZA, L.A; DALLAGIOVANNA, B.; AITA, C.A.;  
HANSEN, P.; REBELATTO, C.L.; AGUIAR, A.M.; MIYAGUE, N.I.; SHIGUNOV,  
P.; BARCHIKI, F.; CORREA, A.; OLANDOSKI, M.; KRIEGER, M.A.; BROFMAN,  
P.R.S. Are purified or expanded cord blood-derived CD133+ cells better at  
improving cardiac function? **Exp Biol Med.** v. 235, n. 1, p. 119-129, 2010.

SEIDEL, A.C.; BAHLS, A.S.; MORESCHI, D.; MURARO, C.B. Toracotomia sem  
intubação orotraqueal. Modelo experimental em ratos. **Acta Cir Bras.** v. 12, p.  
135-136, 1997.

SIROIS, M. **Medicina de Animais de Laboratório Princípios e  
Procedimentos.** São Paulo: Roca, 2007.

SOUZA, J.A.M. Avaliação de dois métodos experimentais de indução de infarto  
agudo do miocárdio. **Dissertação de mestrado,** 2005.

STRAUER, E.E.; BRHEM, M.; SCHANNWELL, C.M. The therapeutic potential of  
stem cells in heart disease. **Cell Prol.** v. 41, sup. 01, p. 126-145, 2008.

TANG, Y.L.; ZHAO, Q.; QUIN, X.; SHEN, L.; CHENG, L.; GE, J.; PHILLIPS, M.I.  
Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell  
transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction.  
**Ann Thorac Sur.** v. 80, p. 229-237, 2005.

TOMITA, S.; LI, R.K.; WEISSEL, R.D.; MICKLE, D.A.G.; KIM, E.J.; SAKAI, T.;  
JIA, Z.Q. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged  
heart function. **Circulation.** v. 100, n. 19, p. 247-256, 1999.

TOUSOULIS, D.; BRIASOULIS, A.; ANTONIADES, C.; STEFANADI, E.;  
STEFANADIS, C. Heart regeneration: what cells to use and how? **Curr Opin  
Pharmacol.** v. 8, n. 2, p. 211-218, 2008.

TUCCI, .P.J. Pathophysiological characteristics of the post-myocardial infarction  
heart failure model in rats. **Arq Bras Cardiol.** v. 96, n. 5, p. 420-424, 2011.

VILAHUR, G.; JUAN-BABOT, O.; PEÑA, E.; OÑATE, B.; CASANÍ, L.; BADIMON, L. Molecular and cellular mechanisms involved in cardiac remodeling after acute myocardial infarction. **J Mol Cell Cardiol.** v.50, n.5, p. 522-533, 2011.

VRIJSEN, K.; CHAMULEAU, S.; NOORT, W.; DOEVENDANS, P.; SLUIJTER, J. Stem cell therapy for end-stage heart failure: indispensable role for the cell? **Curr Opin Organ Transplant.** v. 14, n. 5, p. 500-65, 2009.

WANG, Y.; WANG, M.; ZHANG, P.; SONG, J.; LI, Y.; HOU, S.; HUANG, G. Effect of transplanted mesenchymal stem cells from rats of different ages on the improvement of heart function after acute myocardial infarction. **Chin Med J.** v. 121, n. 22, p. 2290-2298, 2008.

WERNECK-DE-CASTRO, J.P.S.; COSTA-E-SOUSA, R.H.; OLIVEIRA, P.F.; PINHO-RIBEIRO, V.; MELLO, D.B.; PEÇANHA, R.; MATTOS, E.; OLIVARES, E.L.; MAIA, A.C.V.; MILL, J.G.; GOLDENBERG, R.C.S.; CAMPOS-DE-CARVALHO, A.C. G-CSF does not improve systolic function in a rat model of acute myocardial infarction. **Basic Res Cardiol.** v.101, n. 6, p. 494-501, 2006.

WU, G.; RANA, J.S.; WYKRZYKOWSKA, J.; DU, Z.; KE, Q.; KANG, P.; LI, J.; LAHAM, R.J. Exercise-induced expression of VEGF and salvation of myocardium in the early stage of myocardial infarction. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** v. 296, n. 2, p.H389-H395, 2008.

ZORNOFF, L.; SPADARO, J. Remodelação ventricular após o infarto agudo do miocárdio. Conceitos, Fisiopatologia e Abordagem Terapêutica. **Arq Bras Cardiol.** v. 68, n. 6, p. 453-460, 1997.

ZORNOFF, L.A.; PAIVA, S.A.; MINICUCCI, M.F.; SPADARO J. Experimental myocardium infarction in rats: analysis of the model. **Arq Bras Cardiol.** v. 93, n. 4, p. 426-440, 2009.

ZHU, H.; SONG, X.; JIN, P.; GUAN, R.; LIU, X.; LI, X.Q. Comparison of intra-coronary cell transplantation after myocardial infarction: autologous skeletal myoblasts versus bone marrow mesenchymal stem cells. **J Int Med Res.** v. 37, n. 2, p.298-307, 2009.

## 10 ANEXO

### 10.1 Parecer do Comitê de Ética em Uso de Animais da PUCPR 1ª Versão



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ  
NÚCLEO DE BIOÉTICA  
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

#### PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

Curitiba, 27 de maio de 2010.

**REGISTRO DO PROJETO NO CEUA:** 540 – 1ª versão

**TÍTULO DO PROJETO:**

Transplante de células progenitoras endoteliais e células tronco mesenquimais humanas tratadas com doador de óxido nítrico (DEA/NO) em ratos com infarto do miocárdio.

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:**

Fabiane Barchiki

**EQUIPE DA PESQUISA:**

Fabiane Barchiki, Paulo Roberto Slud Brofman, Carmem Lúcia Rebelatto.

**INSTITUIÇÃO:**

PUCPR

**CATEGORIA DO EXPERIMENTO – CATEGORIA D**


ESPÉCIE DE ANIMAL	SEXO	IDADE E/OU PESO	QUANTIDADE
Ratos Wistar ( <i>Rattus Novergicus</i> )	Macho	4 meses, 300-400 g	250

O colegiado do CEUA em reunião no dia 27/05/2010, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer: **COM PENDÊNCIA:**

- ✓ Justificar a perda de animais em percentuais, com relação ao número total;
- ✓ Verificar o veterinário responsável e equipe de pesquisa que efetivamente fará o experimento;
- ✓ Rever posologia e via de administração dos medicamentos;
- ✓ Rever anestesia (As informações referentes a anestesia contidas na Folha de Rosto, difere do projeto).

O pesquisador tem 60 dias, após a ciência do parecer com pendência para responder aos quesitos formulados pelo CEUA-PUCPR em seu parecer. Após este prazo o projeto será considerado "retirado". (RESOLUÇÃO N.º 23/2006 - CONSUN).

Atenciosamente,

  
Prof.ª Graçinda Maria D'Almeida e Oliveira  
Coordenadora  
Comitê de Ética no Uso de Animais - PUCPR





## 10.2 Parecer do Comitê de Ética em Uso de Animais da PUCPR 2ª Versão



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ  
NÚCLEO DE BIOÉTICA  
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

Curitiba, 5 de agosto de 2010.

**REGISTRO DO PROJETO NO CEUA:** 540 – 2ª versão

**TÍTULO DO PROJETO:**

Transplante de células progenitoras endoteliais e células tronco mesenquimais humanas tratadas com doador de óxido nítrico (DEA/NO) em ratos com infarto do miocárdio.

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:**

Fabiane Barchiki

**EQUIPE DA PESQUISA:**

Fabiane Barchiki, Paulo Roberto Slud Brofman, Carmem Lúcia Rebelatto.

**INSTITUIÇÃO:**

PUCPR

**CATEGORIA DO EXPERIMENTO – CATEGORIA D**

ESPÉCIE DE ANIMAL	SEXO	IDADE E/OU PESO	QUANTIDADE
Ratos Wistar ( <i>Rattus Novergicus</i> )	Macho	4 meses, 300-400 g	250

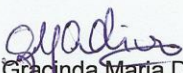
O colegiado do CEUA em reunião no dia 05/08/2010, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer: **APROVADO**.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEUA-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEUA em qualquer tempo.

Lembramos ao senhor pesquisador que é obrigatório encaminhar o relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEUA.

Atenciosamente,

  
Prof.ª Graçinda Maria D'Almeida e Oliveira  
Coordenadora  
Comitê de Ética no Uso de Animais - PUCPR



### 10.3 Parecer do Comitê de Ética em Uso de Animais da PUCPR 3ª Versão



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ  
NÚCLEO DE BIOÉTICA  
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

#### PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

Curitiba, 16 de setembro de 2010.

**REGISTRO DO PROJETO NO CEUA:** 540 – 3ª versão

**TÍTULO DO PROJETO:**

Transplante de células progenitoras endoteliais e células tronco mesenquimais humanas tratadas com doador de óxido nítrico (DEA/NO) em ratos com infarto do miocárdio.

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:**

Fabiane Barchiki

**EQUIPE DA PESQUISA:**

Fabiane Barchiki, Paulo Roberto Slud Brofman, Carmem Lúcia Rebelatto.

**INSTITUIÇÃO:**

PUCPR

**CATEGORIA DO EXPERIMENTO – CATEGORIA D**

ESPÉCIE DE ANIMAL	SEXO	IDADE E/OU PESO	QUANTIDADE
Ratos Wistar ( <i>Rattus Norvegicus</i> )	Macho	4 meses, 300-400 g	250

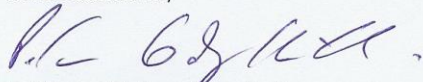
O colegiado do CEUA em reunião no dia 16/09/2010, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer: **APROVADO**.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEUA-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEUA em qualquer tempo.

Lembramos ao senhor pesquisador que é obrigatório encaminhar o relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEUA.

Atenciosamente,

  
Prof Peter Gaberz Kirschnik  
Coordenador  
Comitê de Ética no Uso de Animais - PUCPR





## 10.4 Parecer do Comitê de Ética em Uso de Animais da PUCPR 3ª Versão, Título do Projeto Atualizado



Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Núcleo de Bioética  
Comitê de Ética no Uso de Animais

Curitiba, 16 de fevereiro de 2011.

### PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

**REGISTRO DO PROJETO:** 540 – 3ª versão

**TÍTULO DO PROJETO:** "Análise funcional e histológica do modelo experimental de infarto para ensaios pré-clínicos em cardiologia"

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Fabiane Barchiki

**EQUIPE DE PESQUISA:**

Fabiane Barchiki

**INSTITUIÇÃO:**

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

**CENTRO / CURSO:**

PUCPR

ESPÉCIE DE ANIMAL	SEXO	IDADE / PESO	CATEGORIA	QUANTIDADE
Ratos Wistar ( <i>Rattus Norvegicus</i> )	Macho	4 meses / 300-400g	D	250

O colegiado do CEUA em reunião no dia 16/02/2012, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer: **APROVADO**.


Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEUA-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEUA em qualquer tempo.



Lembramos ao pesquisador que é obrigatório encaminhar o relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEUA.

Atenciosamente,

  
Prof<sup>ª</sup> Graçinda Maria D'Almeida e Oliveira  
Coordenadora Adjunta  
Comitê de Ética no Uso de Animais



ESPECIE DE ANIMAL	SEXO	IDADE / PESO	CATEGORIA	QUANTIDADE
Ratos Wistar (Rattus Norvegicus)	Masculino	4 meses / 300g	D	200
		400g		



## 10.5 Apresentação de resumo na Mostra de Pesquisa da Pós-Graduação PUCPR

### TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS TRATADAS COM DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO (DEA/NO) EM RATOS COM INFARTO DO MIOCÁRDIO

*Fabiane Barchiki*

*Paulo Roberto Slud Brofman - Orientador*

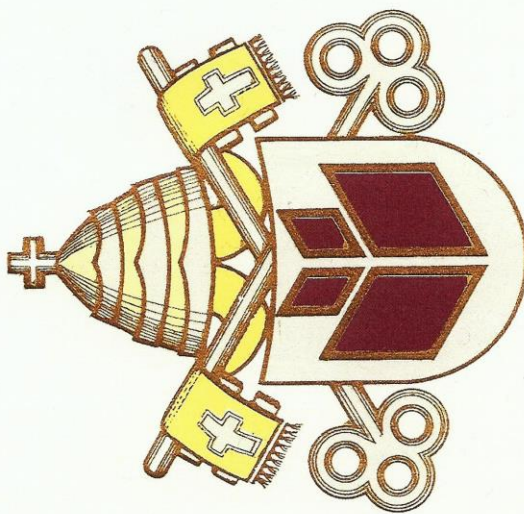
*Carmen Lúcia Kuniyoshi Rebelatto, Luiz Guilherme Capriglione, Nelson Miyague, Alexandra Cristina Senegaglia, Paula Hansen Suss - Colaboradores*

*Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - CCBS*

**Introdução:** O infarto agudo do miocárdio (IAM) está entre as principais causas de óbito no Brasil. O IAM causa a morte dos cardiomiócitos, que são substituídos por tecido fibrótico, ocasionando o aumento do ventrículo esquerdo e a diminuição da fração de ejeção (FE). Testes pré-clínicos utilizam o rato como modelo experimental por conta de sua similaridade no remodelamento cardíaco após o IAM. As células-tronco mesenquimais (CTM) provenientes da medula óssea (MO) e administradas por injeção intracoronária possuem potencial terapêutico, promovendo redução da área enfartada, melhora da perfusão e revascularização. O óxido nítrico (NO) possui várias funções fisiológicas, como a regulação da proliferação e a diferenciação de vários tipos celulares modulando a angiogênese. CTM tratadas com NO poderiam promover uma diferenciação destas a um fenótipo associado à angiogênese e ou cardiomiogênese. **Objetivos:** Avaliar os efeitos dos transplantes das CTM tratadas com doador de óxido nítrico (DEA/NO) em ratos Wistar infartados. **Método:** As CTM serão isoladas da MO de pacientes, com cardiomiopatia dilatada, cultivadas e tratadas com DEA/NO. O infarto por ligadura da artéria descendente anterior será realizado em 50 ratos Wistar machos, com peso entre 350 e 400 gramas. A análise ecocardiográfica avaliará a FE, a área sistólica (ASF) e diastólica final (ADF) e o volume sistólico (VSF) e diastólico final (VDF). Os animais com FE inferior a 40% caracterizam a disfunção do ventrículo esquerdo, sendo incluídos no estudo composto por seis grupos: animais saudáveis não submetidos ao infarto, cirurgia simulada, evolução natural do infarto, infartado com transplante de meio, infartado com transplante de CTM e infartado com transplante de CTM tratadas com DEA/NO. Um mês após o transplante será realizada nova análise ecocardiográfica, eutanásia e análise histológica do coração por coloração hematoxilina e eosina para contagem de vasos capilares. **Resultados:** Foi concluída a fase *in vivo* do grupo cirurgia simulada (n = 10) com média de FE de 62,2%, ASF 0,591 mm, VSF 0,226 mL, ADF 1,08 mm, VDF 0,590 mL; no grupo evolução natural n = 06 a média da FE foi de 26,5%, ASF 1,02 mm, VSF 0,551 mL, ADF 1,23 mm, VDF 0,746 mL. **Conclusão:** O primeiro resultado da análise ecocardiográfica demonstra a diferença entre animais não infartados em relação aos infartados.



# Pontifícia Universidade Católica do Paraná



O Diretor de Pesquisa e Pós-Graduação da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, no uso de suas atribuições, confere o presente CERTIFICADO a

*Fabiane Barchiki*

aluna do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, com o projeto de pesquisa intitulado Transplante de Células-Tronco Mesenquimais Humanas Tratadas com Doador de Óxido Nítrico (DEANO) em Ratos com Infarto de Miocárdio, sob orientação do Prof. Dr. Paulo Roberto Slud Brofman, classificado em **1º lugar** na Área de Ciências da Saúde, na XII Mostra de Pesquisa da Pós-Graduação, realizada nos dias 26 e 27 de outubro de 2010, nesta universidade.

Curitiba, 27 de outubro de 2010.



Waldemiro Gremski

Diretor de Pesquisa e Pós-Graduação

Paula Cristina Trevilatto

Coordenadora de Pesquisa

## 10.7 XIII Mostra de Pesquisa da Pós-graduação PUCPR

**XIX SEMIC**  
PESQUISAS QUE IRÃO  
INFLUENCIAR O MUNDO

25, 26 E 27  
DE OUTUBRO

PIBIC Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica.  
FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico de Pesquisa  
CNPq Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico  
PUCPR  
WWW.PUCPR.BR

### ANÁLISE ECOCARDIOGRÁFICA DO MODELO EXPERIMENTAL DE INFARTO DO MIOCÁRDIO

Fabiane Barchiki <sup>1</sup>

Paulo Roberto Slud Brofman <sup>2</sup>

Nelson Itiro Miyague <sup>3</sup>

Luiz Guilherme Achcar Capriglione <sup>4</sup>

Lye Miyague <sup>5</sup>

Paula Hansen Suss <sup>6</sup>

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - CCBS

#### RESUMO

**Introdução:** Os tratamentos terapêuticos com células-tronco para o infarto agudo do miocárdio (IAM) são estudados inicialmente em modelos experimentais que mimetizam a doença humana. O rato é um dos modelos mais utilizados. Há várias descrições de metodologias de indução (IND) ao IAM sendo a toracotomia lateral esquerda com oclusão da artéria coronária (AC) a mais eficaz. E para a mensuração da disfunção ventricular é realizada a ecocardiografia. **Objetivos:** Avaliar os parâmetros ecocardiográficos em grupos controles criando um banco de dados a ser utilizado em pesquisas futuras na terapia celular. **Método:** Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal da PUCPR (n° 540). Cento e quarenta e seis ratos Wistar machos com quatro meses de idade foram utilizados neste estudo. Sete dias após a IND ao IAM os animais foram submetidos a primeira avaliação ecocardiográfica (1ºECO) que mensurou a fração de ejeção (FE), área diastólica final (ADF) e área sistólica final (ASF). Dois dias após os animais receberam injeção de meio. Trinta dias após a injeção os animais foram submetidos a segunda avaliação ecocardiográfica (2ºECO). Os animais foram divididos em quatro grupos: Sadios (S) que não foram submetidos a procedimento cirúrgico; Cirurgia Simulada (CS) que foram submetidos a cirurgia de IND ao IAM sem oclusão da AC; Evolução Natural (EN), com oclusão da AC e FE <40%; Injeção de Meio (IM), com oclusão da AC e FE <40% que receberam injeção de 200 µL de meio IMDM no miocárdio. **Resultados:** Obteve-se 53,3% de sobrevivência a IND ao IAM, 45,4% apresentou FE <40%, o índice de sobrevivência a IM foi de 83,3%. O grupo S (n=11) apresentou na 1ºECO: FE de 56,2%, ASF 0,637 mm<sup>2</sup> e ADF 1,059 mm<sup>2</sup>; 2ºECO: FE de 53,0%, ASF 0,692mm<sup>2</sup> e ADF 1,123mm<sup>2</sup>. Grupo CS (n=14) apresentou na 1ºECO: FE de 61,6%, ASF 0,600mm<sup>2</sup> e ADF 1,09mm<sup>2</sup>; 2ºECO: FE de 54,9%, ASF 0,699mm<sup>2</sup> e ADF 1,14mm<sup>2</sup>. Grupo EN (n=11) apresentou na 1ºECO: FE de 27,9%, ASF 1,02mm<sup>2</sup> e ADF 1,255mm<sup>2</sup>; 2ºECO: FE de 28,8%, ASF 1,14mm<sup>2</sup> e ADF 1,40mm<sup>2</sup>. Grupo IM (n=15) apresentou na 1ºECO: FE de 27,9%, ASF 1,05mm<sup>2</sup> e ADF 1,28mm<sup>2</sup>; 2ºECO: FE de 27,7%, ASF 1,19mm<sup>2</sup> e ADF 1,45mm<sup>2</sup>. **Conclusão:** O grupo CS demonstrou que o procedimento cirúrgico não influencia os parâmetros ecocardiográficos em relação ao grupo S. A análise da IM em relação a EN demonstrou que a injeção de meio não promoveu alterações os parâmetros avaliados. Estes resultados permitiram a formação de um banco de dados para nossas pesquisas.

**Palavras-chave:** Modelo experimental. infarto do miocárdio. ecocardiografia. fração de ejeção.



## 10.8 Apresentação de resumo no 6º Congresso Brasileiro de Células-tronco e Terapia Celular



P185

### ECHOCARDIOGRAPHIC ANALYSIS OF THE EXPERIMENTAL MODEL OF INFARCTION

**AUTORES:** **FABIANE BARCHIKI**; LUIZ GUILHERME ACHCAR CAPRIGLIONE; NELSON ITIRO MIYAGUE; LYE MIYAGUE; PAULA HANSEN SUSS; PAULO ROBERTO SLUD BROFMAN;

**INSTITUIÇÃO:** Núcleo de Tecnologia Celular - Pontifícia Universidade Católica do Paraná

**Introduction and Objectives:** The therapeutic treatments with stem cells for acute myocardial infarction (AMI) were first studied in experimental models that mimic human disease. The rat is the most widely used animal model. There are several descriptions of methods of induction (IND) of AMI. The ventricular dysfunction is measured by echocardiography (ECHO). We evaluated the ECHO parameters in a set of control groups to create a database to be used in future pre-clinical studies on cell therapy. **Methods:** This study was approved by the Ethics Committee on Animal Use of PUCPR (No. 540). One hundred forty six male Wistar rats four months of age were used for this study. Seven days after IND of AMI the animals were submitted to the 1st ECHO to measure the ejection fraction (EF), end-diastolic area (EDA) and end-systolic area (ESA). Two days after the animals received an injection of medium. Thirty days after injection the animals were submitted to a 2nd ECHO. The animals were divided into four: healthy (H) did not undergo surgical procedures; sham (SH) underwent surgery IND of AMI without occlusion of the coronary artery (CA); natural evolution (NE), with occlusion of the CA and EF <40%; medium injection (MI), with occlusion of the CA and EF <40% which received 200 µL of IMDM. **Results:** 53.3% of the animals survived to IND of AMI and 45.4% presented EF <40%, the survival index of the MI was 83.3%. Echocardiographic parameters are described below: Groups ECHO Parameters H (n=11) SH (n=14) NE (n=11) MI (n=15) % EF 1 st 56,206±4,409 61,674±7,23 27,979±5,955 27,953±7,562 EF 2 nd 53,018±9,274 54,967±7,931 28,791±14,247 27,718±8,15 mm<sup>2</sup> EDA 1 st 1,059±0,109 1,092±0,083 1,255±0,095 1,280±0,058 EDA 2 nd 1,123±0,149 1,146±0,096 1,403±0,256 1,451±0,139 mm<sup>2</sup> ESA 1 st 0,637±0,089 0,600±0,085 1,023±0,102 1,050±0,101 ESA 2 nd 0,692±0,161 0,699±0,111 1,148±0,305 1,194±0,200 **Conclusion:** The SH group showed that the surgical procedure does not influence the ECHO parameters in relation to the group H. The analysis of MI compared to NE demonstrated that injection of medium does not change the parameters evaluated. These results allow to establish a database for our research. **Financial Support:** Fundação Araucária No 416/2009.



## 10.9 Submissão do Artigo: Comparison of two surgical techniques for creating an acute myocardial infarct in rats



### Submission Confirmation

Thank you for submitting your revised manuscript to *Laboratory Animals*.

Manuscript ID: LA-11-107.R2

Title: Comparison of two surgical techniques for creating an acute myocardial infarct in rats

Authors: Capriglione, Luiz  
Barchiki, Fabiane  
Miyague, Nelson  
Ottoboni, Gabriel  
Senegaglia, Alexandra  
Suss, Paula  
Rebelatto, Carmen  
Pimpão, Cláudia  
Brofman, Paulo

Date Submitted: 04-May-2012

Print Return to Dashboard

ScholarOne Manuscripts™ v4.8.1 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2012. All Rights Reserved.  
ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.

Follow ScholarOne on Twitter

[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)

## 10.10 Apresentação de resumo no 7º Congresso Brasileiro de Células-tronco e Terapia Celular



CONGRESSO BRASILEIRO DE CÉLULAS-TRONCO E TERAPIA CELULAR  
3 a 6 de outubro - São Paulo - Brasil

20902

### HISTOLOGICAL ANALYSIS OF MYOCARDIAL INFARCTION IN WISTAR RATS

**Barchiki F, Moura SAB, Capriglione LGA, Miyague NI, Miyague L, Suss PH, Brofman PRS**

**Introduction and Objectives:** The rat can be used as an experimental model to study of the acute myocardial infarction (AMI) by mimic the human disease. After the infarction, several histological alterations occurs in the heart, beginning with the inflammatory process evolving to the repair process. It is necessary to understand how is the morphology of the injured tissue to determine whether the application of stem cell therapy promotes benefices ischemic tissue. **Methods:** This study was approved by the Ethics Committee on Animal Use of PUCPR (No. 540). We used 51 male Wistar rats (4 months of age). The animals were separated into four groups: healthy (H) did not undergo surgical procedures; sham-operated (SH) underwent surgery induction of AMI with no occlusion of the coronary artery (CA); natural evolution (NE), with occlusion of the CA and ejection fraction (EF) <40%; medium injection (MI), with occlusion of the CA and EF<40% which received 200 µL of IMDM. EF was evaluated seven days after the induction. Two days after, the group MI received an injection of medium. Euthanasia was performed 32 days following the evaluation of EF. The hearts were removed, fixed, dehydrated and embedded in paraffin. Five micrometer sections were sliced and stained with hematoxylin/eosin (H&E) and Masson's trichrome (MT). **Results:** The EF was obtained: H 56,2%(±4,40) (n=11), SH 61,6%(±7,23) (n=14); NE 27,9%(±5,95) (n=11), MI 27,9%(±7,56) (n=15). The groups H and SH show similar results by staining with H&E appearance of normal heart muscle. The MT has marking for discrete regions of collagen fibers in the perimuscular connective tissue. The groups infarcted (NE and MI) stained with H&E showed areas of repair by replacement of the affected heart muscle by fibrous connective tissue. The staining for MT revealed areas of intense replacement of myocardium by connective tissue rich in collagen fibers. **Conclusion:** The morphological and functional evaluation of the group H allowed the understanding of the values and normal aspects. The SH group demonstrated that the surgical procedure did not cause morphological and functional changes. In groups NE and MI myocardial infarction proved a tissue remodeling with death of cardiomyocyte replacement by fibrous connective tissue with loss of contractile function of cardiac muscle. The injection medium did not cause any alteration, demonstrating that it can be used as vehicle in the administration of cell therapy.