

UFRRJ
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

TESE

**“CÉLULAS DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO: UMA
POSSIBILIDADE TERAPÊUTICA PARA O INFARTO DO MIOCÁRDIO”**

AMARILDO MIRANDA

2015

616.1237

M672c

T

Miranda, Amarildo, 1970-

"Células derivadas do tecido adiposo: uma possibilidade terapêutica para o infarto do miocárdio" / Amarildo Miranda. - 2015.

180 f.: il.

Orientador: Emerson Lopes Olivares.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2015.

Bibliografia: f. 163-180.

1. Infarto do miocárdio - Tratamento - Teses. 2. Terapia celular - Teses. 3. Células-tronco - Uso terapêutico - Teses. 4. Tecidos adiposos - Teses. 5. Rato como animal de laboratório - Teses. I. Olivares, Emerson Lopes, 1973- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS

AMARILDO MIRANDA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências Fisiológicas**, no Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, área de Concentração em Fisiologia.

TESE APROVADA EM 24/04/2015.

Prof. Emerson Lopes Olivares. Ph.D. UFRRJ
(Orientador)

Prof. Wellington da Silva Côrtes. Ph.D. UFRRJ

Prof(a). Luciane Cláudia Barcellos. Ph.D. UFRJ

Prof. Fabio S. Fortes. Ph.D. UEZO

Prof. Sílvio R. Marques. Ph.D. UNIGRANRIO

RESUMO

MIRANDA, Amarildo. **Células derivadas do tecido adiposo: uma possibilidade terapêutica para o infarto do miocárdio**. 2015. 180p Tese de Doutorado em Ciência Fisiológicas. Instituto de Biologia, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

Introdução: As doenças cardiovasculares estão entre as maiores causas de morte, tendo o infarto do miocárdio (IM) como a principal delas. Apesar dos avanços no tratamento e os recurso farmacológicos reduzirem a morbidade e a mortalidade das doenças cardíacas isquêmicas, existe a necessidade de desenvolver novas estratégias terapêuticas que previna ou reverta o remodelamento ventricular progressivo posterior ao IM que é a base do processo da insuficiência cardíaca congestiva. O desenvolvimento da terapia celular como estratégia para reparar ou regenerar o tecido lesado oferece uma grande possibilidade de terapia anti-remodelamento. Diversos tipos celulares, vindo de vários tecidos podem ser utilizados como terapia; dentre elas, células derivadas do tecido adiposo (CDTA) (Lotufo et al. 2012; Karantalis et al. 2012; Go et al. 2013). **Métodos:** Neste estudo, ratas foram submetidas a cirurgia para obtenção do IM pela ligadura da artéria coronária anterior e tratadas com CDTA, injetadas diretamente na borda do IM (Grupo T1); injetadas por via endovenosa na veia da cauda (grupo T2) ou com solução salina (grupo não tratado) com 24 horas após IM visando avaliar o uso de CDTA como terapia. Exames ecocardiográficos (ECO) e eletrocardiográficos (ECG) foram utilizadas antes do IM e nos dias 1, 7 e 28 após IM para acompanhamento. **Resultados:** A onda Q esteve presente em D1 em todos os animais depois IM no ECG. O índice que QRS (IQRS) foi de $1,342 \pm 0,186$ antes do IM e $0,838 \pm 0,15$ depois IM (N=28; $p < 0.01$). O IQRS aumentou no grupo T1 nos dias 7 e 28 após IM comparados com o dia 1 (N=6; $p < 0.001$) e com o grupo não tratado (N=6; $p < 0.05$). Não houve melhoras no IQRS no grupo T2 e no não tratado. O ângulo de despolarização ventricular médio (AQRS) foi de $+60,45 \pm 11,27$ graus antes do IM e de $+133,63 \pm 26,01$ graus depois do IM (N=28; $p < 0.001$). O AQRS diminuiu no grupo T1 nos dias 7 e 28 após IM, comparados com o dia 1 (N=6; $p < 0.01$) e quando comparado com o grupo não tratado (N=6; $p < 0.001$). Não houve melhora no AQRS no grupo T2 e no não tratado. A Fração de Ejeção no modo M (FEM) medido pelo ECO foi de $92,16 \pm 4,17$ % antes do IM e $53,24 \pm 10,85$ % depois IM (N=6; $p < 0.001$). A FEM no grupo T1 aumentou nos dias 7 e 28 após o IM em relação ao dia 1 (N=6; $p < 0.001$), tendo valores de antes do IM. A FEM no grupo não tratado não melhorou nos dias 7 e 28 após o IM. Não houve aumento do diâmetro diastólico final (DDF) no grupo T1 após o IM, enquanto DDF aumentou no grupo não tratado depois do IM. Fração de ejeção por Simpson (FES), fração de encurtamento (FE) e débito cardíaco (DC) melhoraram no grupo T1 e não nos grupos T2 e não tratado. **Conclusão:** CDTA injetada na borda do IM melhorou a função sistólica dos animais, enquanto as CDTA injetadas por via endovenosa não teve o mesmo efeito.

Palavras-chave: infarto do miocárdio, Tecido adiposo, Terapia celular.

ABSTRACT

MIRANDA, Amarildo. **Adipose-derived Cells: A therapeutic possibility in myocardial infarction.** 2015. 180p. Doctoral thesis in Physiological Sciences. Instituto de Biologia, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

Background: Cardiovascular diseases are among the leading causes of death and myocardial infarction (MI) as the main one. Although pharmacological and interventional advances have reduced the morbidity and mortality of ischemic heart disease, there is an ongoing need for novel therapeutic strategies that prevent or reverse progressive ventricular remodeling following myocardial infarction, the process that forms the substrate for ventricular failure. The development of cell-based therapy as a strategy to repair or regenerate injured tissue offers extraordinary promise for a powerful anti-remodeling therapy. Various cell types, coming from various tissues may be used as therapy; among them, adipose-derived cells (ADSCs).

Methods: In this study, female rats were subjected to surgery to obtain the MI by ligation of the anterior coronary artery and treated with ADSCs injected directly into the MI edge (Group T1) or injected intravenously into the tail vein (T2 group) or saline (untreated group) at 24 hours after MI to investigate the use of ADSCs as cell-based therapy. Echocardiography (ECO) and electrocardiography (ECG) were performed before the MI and on days 1, 7 and 28 after MI. **Results:** The Q wave was present in D1 in all animals after MI at ECG exams. The QRS index (IQRS) was 1.342 ± 0.186 before the MI and 0.838 ± 0.15 after MI ($N = 28$, $p < 0.01$). IQRS value increased in T1 group on days 7 and 28 after MI in contrast to day 1 ($n = 6$, $p < 0.001$) and untreated group ($n = 6$, $p < 0.05$). There were no improvements in IQRS at T2 group and untreated group. The average angle of the ventricular depolarization (AQRS) was 11.27 ± 60.45 degrees before MI and 26.01 ± 133.63 degrees after MI ($N = 28$; $p < 0.001$). AQRS decreased in Group T1 on days 7 and 28 after MI as compared to day 1 ($n = 6$, $p < 0.01$) and untreated group ($N = 6$, $p < 0.001$). There was no improvement in AQRS in the T2 group and untreated group. The ejection fraction in M mode (FEM) measured by ECO was $92.16 \pm 4.17\%$ before MI and $53.24 \pm 10.85\%$ after MI ($N = 6$, $p < 0.001$). The FEM in the T1 group increased on days 7 and 28 after MI compared to day 1 ($n = 6$, $p < 0.001$) with similar values to those of the prior MI. The FEM in the untreated group was not improved on days 7 and 28 after MI. There was no increase in left ventricular end-diastolic diameter (LVEDD) in T1 group after MI, while LVEDD was increased in the untreated group after MI. Ejection fraction by Simpson (FES), shortening fraction (FS) and cardiac output (CO) were improved in group T1 but not in T2 group and untreated group. **Conclusion:** ADSCs injected on the edge of MI improved systolic function of animals and ADSCs injected intravenously did not have the same effect.

Key words: myocardial infarction, Adipose tissue, cell-based therapy.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho, seja participando diretamente ou apoiando e incentivando nos momentos mais críticos ou necessários. Em especial, agradeço à:

Emerson Lopes Olivares, meu orientador.

Márcia, Felipe e Tais pelas participações em etapas importantes na realização deste trabalho, participando ativamente em algumas técnicas, sem as quais o trabalho não poderia ser concluído.

Tainara e minha família pela confiança e apoio nos momentos mais complicados.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Figura mostrando um esquema de geração de células-tronco pluripotentes induzidas (iPS). (1) As células doadoras são isoladas e cultivadas. (2) Transferem-se os genes das células-tronco associadas para as células doadoras por meio de vetores virais. As células vermelhas indicam as células que manifestam os genes exógenos. (3) As células cultivadas são colhidas de acordo com estratégias de cultivo de células-tronco, pela utilização de fibroblastos mitoticamente inativos (cor cinza claro). (4) Um pequeno subgrupo dessas células transfectadas tornam-se células-tronco pluripotentes induzidas e a partir desse momento produzem colônias de células-tronco. (Imagem modificada e obtida de <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:NoFonti.svg#/media/File:NoFonti.svg>, licenciada sob CC BY-SA2.5, disponível na internet em 30/03/2015).....34
- Figura 2: Figura mostrando um esquema de medula óssea. É possível observar que dois compartimentos se destacam: o hematopoiético, contendo as células-tronco hematopoiética que são capazes de gerar outras células-tronco hematopoiética e também toda a linhagem hematopoiética e o compartimento estromal que contém as células-tronco estromal, que também são capazes de gerar outras células mesenquimais e outras populações celulares; tais como, adipócitos e osteoclastos. Esquema modificado do original encontrado no endereço na internet:<http://www.medicinageriatrica.com.br/tag/medula-ossea/>, disponível em 02/05/2015).....35
- Figura 3: Esquema do processo de repopulação de coração de camundongo descelularizado com células-tronco induzíveis humanas. Fibroblastos humanos foram retirados e levados a produzir iPS direcionadas para a diferenciação cardíaca. Paralelo a isso, coração de camundongo foi processado para ser descelularizado para, posteriormente serem repopulados com as células iPS humanas. Figura modificada de (Lu et al. 2013).....40
- Figura 4: Esquema representando o modelo fisiológico e fisiopatológico do sistema renina-angiotensina no tecido adiposo. (AGT) angiotensinogênio; (ang I), angiotensina I; (Ang II), angiotensina II; (ECA), enzima conversora da angiotensina; (AT), receptor para angiotensina. O tecido adiposo marrom apresenta funções endócrinas importantes, com atuações tanto local quanto sistêmicas (Sanjuliani et al. 2011).....48
- Figura 5: Figura mostrando um esquema representativo da formação do tecido adiposo. Neste esquema, células mesenquimais indiferenciada dão origem ao lipoblastos e estes se diferenciam em células adiposas, tanto brancas quanto marrons. Porém alguns autores acreditam que as células adiposas marrons tenham uma origem não comum às células adiposas brancas (Timmons et al. 2007). Fonte: Junqueira & Carneiro, Sétima Edição.....50
- Figura 6: Em A) Desenho representativo do procedimento para a realização do infarto do miocárdio experimental em ratos. Em B) detalhes do procedimento: com um fio cirúrgico procura-se fazer uma ligadura no ramo descendente da artéria

coronária (DA), tomando-se o cuidado para não atingir o ramo circunflexo (CX). (Modificado de Terese Winslow & Lydia Kibiuk, NHI - Junho 2001).....	65
Figura 7: Figura exemplificando a correspondência entre as posições dos eletrodos no ECG, as derivações obtidas e usadas no cálculo do AQRS. A interseção das linhas equivale eletricamente ao posicionamento do coração. Uma vez obtido os valores em cada derivação, é possível calcular o valor do ângulo de despolarização ventricular médio com as fórmulas apresentadas no texto, além de possibilitar a determinação em que quadrante esse ângulo está posicionado.....	68
Figura 8: Diagrama esquemático do protocolo de separação das Células Derivadas do Tecido Adiposo (CDTA) utilizado nos experimentos. No final da última etapa, depois de passar pelo filtro de 25 µm, as células estão disponíveis para utilização. Geralmente, era feito uma lavagem em PBS por três vezes e então podiam ser levadas para semear em cultura ou contadas e preparadas para realização do tratamento dos animais infartados.....	75
Figura 9: Figura mostrando exemplo de Adipócito corados pela técnica de "Red Oil". Os adipócitos já diferenciados por apresentarem gotículas de gorduras em seu citoplasma, são corados em vermelho por essa técnica. Em A) aumento de 10 X enquanto em B) O aumento de 20 X.....	83
Figura 10: Figura mostrando o esquema de uma câmara de contagem de células tipo "Neubauer", usada para a contagem das células. A) B) C) e D) são os locais (quadrantes) onde as células podem ser visualizadas e contadas, desde que a câmara esteja cheia. De posse do número de células nestes quadrantes e sabendo-se o volume da câmara e da diluição usada na solução de células para encher a câmara, é possível calcular o número aproximado de células. Fonte: Documento 107.0, disponível em http://www.cascadebio.com em 10/01/2014.....	88
Figura 11: Micrografia mostrando uma cultura de CDTA de ratos em DMEM com 7 dias. Em A) é mostrado a grande densidade de células. Barra indicando 200 µm de tamanho. Em B) a mesma cultura visualizada em um aumento maior. Nela pode ser visualizado (setas brancas) uma CDTA, que se apresenta de forma estrelada. Barra indicando 30 µm de tamanho.....	101
Figura 12: Micrografia mostrando uma cultura de CDTA de ratos em DMEM com 15 dias. Em A) é mostrado a grande densidade de células. Barra indicando 200 µm de tamanho. Em B) a mesma cultura visualizada em um aumento maior. Algumas células apresentam áreas em seu citoplasma, onde se acumula gotículas de gordura, indicada na figura pela seta. Barra indicando 30 µm de tamanho.....	102
Figura 13: Gráfico mostrando o perfil imuno fenotípico em percentual das células isoladas pela citometria de fluxo. Como pode ser evidenciado no gráfico a maior parte das células isoladas foi CD29+ e CD90+, que são marcadores presentes em células mesenquimais enquanto um percentual bem menor de células tiveram marcadores para células hematopoiéticas (CD45 e CD11b). Valores expressos em média ± erro padrão da média.....	104
Figura 14: Gráfico demonstrando o percentual da população hematopoiética em relação a não hematopoiética nas amostras de CDTA de ratos, quando analisadas pela citometria de fluxo. O gráfico mostra que mais de 95,0 % das células isoladas apresentaram um perfil não hematopoiético (mesenquimal). Valores expressos em	

média ± erro padrão da média..... 104

Figura 15: Gráficos mostrando a citometria de fluxo realizada nas amostras de células derivadas do tecido adiposo após 48 horas em cultura. Os pontos azuis representam as células não hematopoiéticas positivas para a molécula estudada. Os pontos pretos representam as células não hematopoiéticas negativas para a molécula estudada, enquanto os pontos vermelhos mostram as células hematopoiéticas. A) Mostra a área de interesse (P1) selecionada para as análises seguintes, considerando o isotipo FITC. B) Mostra a análise considerando o marcador para CD90, que é um marcador para células mesenquimais. Como mostrado, na área de interesse é possível ver uma grande quantidade de células não hematopoiéticas (azuis) em relação a hematopoiéticas (vermelho). C) Mostra a análise considerando o marcador CD11b, que é um marcador para células hematopoiéticas. D) Mostra a análise considerando o marcador para CD29, que é um marcador para células mesenquimais. É possível observar muitos pontos azuis em relação aos vermelhos. E) Mostra a área de interesse (P1) selecionada para as análises seguintes, considerando o isotipo PE-Cy5. F) Mostra a análise considerando o marcador CD45, que é um marcador para células hematopoiéticas.

..... 105

Figura 16: Figura mostrando o gráfico do IQRS dos animais antes e após a cirurgia para produção do IM, mostrando uma queda desse parâmetro após o IM. N=28 animais. Realizado teste t de student. Todos os valores expressos como Média ± Desvio Padrão. *p < 0,05; **p < 0,01; *** p < 0,001..... 111

Figura 17: Figura mostrando o gráfico do Eixo de despolarização ventricular médio dos animais antes e após a cirurgia para produção do IM, mostrando um aumento desse parâmetro após o IM, fazendo com que o eixo se deslocasse do primeiro quadrante para o segundo. N=28 animais. Realizado teste t de student. Todos os valores expressos como Média ± Desvio Padrão. *p < 0,05; **p < 0,01; *** p < 0,001.

..... 111

Figura 18: Eletrocardiograma na derivação D1 de um rato normal e depois da cirurgia de IM. Antes da cirurgia, o ECG não apresentou onda Q em D1. Após a cirurgia, já foi possível observar a presença da Onda Q, geralmente no formato QS (setas na figura). Velocidade do papel de 50 mm/s e 20 mV/mm..... 113

Figura 19: Gráfico mostrando o Eixo de Despolarização Ventricular Médio nos grupos experimentais. Tempo zero corresponde ao exame dos animais antes do IM. Valores indicados com (*), significam que a comparação foi realizada intra grupo com os valores do dia 0 (controle); ou seja, com o próprio animal antes da cirurgia; *p < 0,05; **p < 0,01; *** p < 0,001. Δ também significa que a comparação foi realizada intra grupo; ou seja, com o próprio animal, mas com os valores encontrados no dia 1, que eram os valores no início do IM; Δ p < 0,05; ΔΔ p < 0,01; ΔΔΔ p < 0,001. † significa que a comparação foi realizada contra o grupo Não Tratado no mesmo tempo de observação; † p < 0,05; †† p < 0,01; ††† p < 0,001. O gráfico mostra que o AQRS aumentou em todos os grupos depois do IM; porém T1 apresentou redução desse valor com 7 e 28 dias quando comparado com o próprio grupo ou em contraste com o grupo sem tratamento. O grupo T2 apresentou redução deste valor com 28 dias, quando comparado com o valor que apresentava logo após o IM. Valores expressos em média ± desvio padrão..... 114

Figura 20: Gráfico mostrando a Fração de Ejeção medido com o ecocardiograma no modo M em % (FEM) do grupo sem tratamento, ao longo do tempo, Como pode ser observado, a FEM diminuiu no grupo sem tratamento ao longo do tempo. Análise realizada intra grupo, tendo como contraste o exame realizado no dia zero que é considerado antes da cirurgia de IM. N= 6 animais. Realizado ANOVA de uma via como teste estatístico. Todos os valores expressos como Média \pm Erro Padrão da Média. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. * representa significância em relação ao tempo zero (antes da cirurgia de IM)..... 120

Figura 21: Gráfico mostrando a Fração de Ejeção medido com o ecocardiograma no modo M do grupo que recebeu o tratamento com as células injetadas na borda da lesão (peri infarto) ao longo do tempo, Como pode ser observado, a FEM diminuiu com o IM (dia 1), mas se recuperou nos dias seguintes, após o tratamento. Análise realizada intra grupo, tendo como contraste o exame realizado no dia zero que é considerado sem qualquer tratamento. N= 6 animais. Realizado ANOVA de uma via como teste estatístico. Todos os valores expressos como Média \pm Erro Padrão da Média. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. * representa significância em relação ao tempo zero (antes da cirurgia de MI)..... 121

Figura 22: Gráfico mostrando a Fração de Ejeção medido com o ecocardiograma no modo M do grupo que recebeu o tratamento com as células injetadas na veia da cauda ao longo do tempo (grupo T2). Como pode ser observado, a FEM diminuiu com o IM (dia 1) e se manteve relativamente baixo após o tratamento. Análise realizada intra grupo, tendo como contraste o exame realizado no dia zero que é considerado antes da cirurgia de IM. N= 6 animais. Realizado ANOVA de uma via como teste estatístico. Todos os valores expressos como Média \pm Erro Padrão da Média. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (*) representa significância em relação ao tempo zero (antes da cirurgia de IM)..... 122

Figura 23: Gráfico mostrando a Fração de Ejeção em % medida no ecocardiograma no modo M de todos os grupos experimentais. Valores indicados com (*) significam que a comparação foi realizada intra grupo com os valores do dia 0 (controle); ou seja, com o próprio animal antes da cirurgia; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (Δ) significa que a comparação foi realizada intra grupo; ou seja, com o próprio animal, mas com os valores encontrados no dia 1, que eram os valores no início do IM; $\Delta p < 0,05$; $\Delta\Delta p < 0,01$; $\Delta\Delta\Delta p < 0,001$. (\dagger) significa que a comparação foi realizada contra o grupo Não Tratado no mesmo tempo de observação; $\dagger p < 0,05$; $\dagger\dagger p < 0,01$; $\dagger\dagger\dagger p < 0,001$. O gráfico mostra que o grupo não tratado apresentou valor FEM baixo depois do IM e permaneceu com esse valor reduzido até o fim da observação. O grupo T1 apresentou recuperação do valor da FEM nos dias 7 e 28, atingindo valores similares aos encontrados antes do IM. Com 7 e 28 dias, o grupo T1 também teve um valor de FEM maior do que o grupo não tratado nestes mesmos tempos. O grupo T2 só apresentou melhora com 28 dias, quando comparado com o mesmo tempo dos animais que não receberam nenhum tratamento. Todos os valores foram expressos como Média \pm Erro Padrão da Média. Foi usado ANOVA de duas vias e Tukey para análise estatística..... 123

Figura 24: Gráfico mostrando a Fração de Encurtamento (FE) em % medido no ecocardiograma no modo M do grupo sem tratamento ao longo do tempo. Como pode ser observado, a FE diminuiu no grupo sem tratamento ao longo do tempo. Análise realizada intra grupo, tendo como contraste o exame realizado no dia zero

que é considerado antes da cirurgia de IM. N= 6 animais. Realizado ANOVA de uma via como teste estatístico. Todos os valores expressos como Média ± Erro Padrão da Média. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. (*) representa significância em relação ao tempo zero (antes da cirurgia de IM)..... 124

Figura 25: Gráfico mostrando a Fração de Encurtamento em % medida no ecocardiograma no modo M do grupo que recebeu o tratamento com as células injetadas na borda da lesão (peri infarto) ao longo do tempo. Como pode ser observado, a FE diminuiu com o IM (dia 1), mas se recuperou nos dias seguintes, após o tratamento, quando comparada ao dia do IM, mas ainda diferente dos valores obtidos antes do IM. Análise realizada intra grupo, tendo como contraste o exame realizado no dia zero que é considerado sem qualquer tratamento (*). N= 6 animais. Realizado ANOVA de uma via como teste estatístico. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. (*) representa significância em relação ao tempo zero (antes da cirurgia de IM). (Δ) significa que a comparação foi realizada intra grupo; ou seja, com o próprio animal, mas com os valores encontrados no dia 1, que eram os valores no início do IM. Δ p < 0,05; ΔΔ p < 0,01; ΔΔΔ p < 0,001. Todos os valores expressos como Média ± Erro Padrão da Média..... 125

Figura 26: Gráfico mostrando a Fração de Encurtamento em % medido com o ecocardiograma no modo M do grupo que recebeu o tratamento com as células injetadas na veia da cauda (grupo T2). Como pode ser observado, a FE diminuiu com o IM (dia 1) e manteve-se baixa nos dias seguintes, após o tratamento. Análise realizada intra grupo, tendo como contraste o exame realizado no dia zero que é considerado sem qualquer tratamento (*). N= 6 animais. Realizado ANOVA de uma via como teste estatístico. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. (*) representa significância em relação ao tempo zero (antes da cirurgia de IM). Todos os valores expressos como Média ± Erro Padrão da Média..... 126

Figura 27: Gráfico mostrando a Fração de Encurtamento em % medido com o ecocardiograma no modo M de todos os grupos experimentais. Valores indicados com (*) significam que a comparação foi realizada intra grupo com os valores do dia 0 (controle); ou seja, com o próprio animal antes da cirurgia; *p < 0,05; **p < 0,01; *** p < 0,001. (Δ) significa que a comparação foi realizada intra grupo; ou seja, com o próprio animal, mas com os valores encontrados no dia 1, que eram os valores no início do IM; Δ p < 0,05; ΔΔ p < 0,01; ΔΔΔ p < 0,001. (†) significa que a comparação foi realizada contra o grupo Não Tratado no mesmo tempo de observação; † p < 0,05; †† p < 0,01; ††† p < 0,001. O gráfico mostra que o grupo não tratado apresentou valor FE baixo depois do IM e permaneceu com esse valor reduzido até o fim da observação. O grupo T1 apresentou recuperação do valor de FE nos dias 7 e 28, mas ainda ficando com valores inferiores aos encontrados antes do IM. Com 7 e 28 dias, o grupo T1 também apresentou um valor de FE maior do que o grupo não tratado nestes mesmos tempos. O grupo T2 não apresentou melhoras neste parâmetro depois do tratamento. Todos os valores expressos como Média ± Erro Padrão da Média. Foi usado ANOVA de duas vias e Tukey para análise estatística. 127

Figura 28: Gráfico mostrando a Fração de Ejeção medido pelo método de Simpson em % do grupo sem tratamento ao longo do tempo. Como pode ser observado, a FES diminui no grupo sem tratamento logo após o IM e permaneceu baixo ao longo do tempo. Análise realizada intra grupo, tendo como contraste o exame realizado no

dia zero que é considerado antes da cirurgia de IM. N= 6 animais. Realizado ANOVA de uma via como teste estatístico. Todos os valores expressos como Média ± Erro Padrão da Média. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. (*) representa significância em relação ao tempo zero (antes da cirurgia de IM)..... 128

Figura 29: Gráfico mostrando a Fração de Ejeção em % medido no ecocardiograma pelo método de Simpson do grupo que recebeu o tratamento com as células injetadas na borda da lesão (peri infarto) ao longo do tempo. Como pode ser observado, a FES diminuiu com o IM (dia 1), mas se recuperou nos dias seguintes, após o tratamento, quando comparada ao dia do IM, chegando a valores similares aos encontrados antes do IM. Análise realizada intra grupo, tendo como contraste o exame realizado no dia zero que é considerado sem qualquer tratamento ou em relação ao dia 1 (dia do IM). N= 6 animais. Realizado ANOVA de uma via como teste estatístico. (*) representa significância em relação ao tempo zero (antes da cirurgia de IM) * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; enquanto (Δ) significa que a comparação foi realizada intra grupo; ou seja, com o próprio animal, mas com os valores encontrados no dia 1, que eram os valores no início do IM; Δ p < 0,05; ΔΔ p < 0,01; ΔΔΔ p < 0,001. Todos os valores expressos como Média ± Erro Padrão da Média. 129

Figura 30: Gráfico mostrando a Fração de Ejeção em % medido no ecocardiograma pelo método de Simpson do grupo que recebeu o tratamento com as células injetadas na veia da cauda (grupo T2). Como pode ser observado, a FES diminuiu com o IM (dia 1) e manteve-se baixa nos dias seguintes, após o tratamento. Análise realizada intra grupo, tendo como contraste o exame realizado no dia zero que é considerado sem qualquer tratamento (*). N= 6 animais. Realizado ANOVA de uma via como teste estatístico. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. (*) representa significância em relação ao tempo zero (antes da cirurgia de IM). Não houve diferença estatística quando os valores de 7 e 28 dias foram comparados com dia 1 (IM). Todos os valores expressos como Média ± Erro Padrão da Média..... 130

Figura 31: Gráfico mostrando a Fração de Ejeção em % medido no ecocardiograma com o método de Simpson de todos os grupos experimentais. Valores indicados com (*) significam que a comparação foi realizada intra grupo com os valores do dia 0 (controle); ou seja, com o próprio animal antes da cirurgia; *p < 0,05; **p < 0,01; *** p < 0,001. (Δ) significa que a comparação foi realizada intra grupo; ou seja, com o próprio animal, mas com os valores encontrados no dia 1, que eram os valores no início do IM; Δ p < 0,05; ΔΔ p < 0,01; ΔΔΔ p < 0,001. (†) significa que a comparação foi realizada contra o grupo não tratado no mesmo tempo de observação; † p < 0,05; †† p < 0,01; ††† p < 0,001. O gráfico mostra que o grupo não tratado apresentou valor FES baixo depois do IM e permaneceu com o valor reduzido até o fim da observação. O grupo T1 apresentou recuperação do valor de FES nos dias 7 e 28 para valores que não diferiram estatisticamente dos encontrados antes do IM. Com 7 e 28 dias, o grupo T1 também apresentou um valor de FES maior do que o grupo não tratado nestes mesmos tempos. O grupo T2 não apresentou melhoras neste parâmetro depois do tratamento. Todos os valores expressos como Média ± Erro Padrão da Média. Foi usado ANOVA de duas vias e Tukey para análise estatística. 131

Figura 32: Gráfico mostrando o Débito Cardíaco (L/min) medido no ECO do grupo sem tratamento ao longo do tempo. Como pode ser observado, o DC diminuiu no grupo sem tratamento logo após o IM e permaneceu baixo ao longo do tempo.

Análise realizada intra grupo, tendo como contraste o exame realizado no dia zero que é considerado antes da cirurgia de IM. N= 6 animais. Realizado ANOVA de uma via como teste estatístico. Todos os valores expressos como Média ± Erro Padrão da Média. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. (*) representa significância em relação ao tempo zero (antes da cirurgia de IM)..... 132

Figura 33: Gráfico mostrando o Débito Cardíaco (L/min) medido no ECO do grupo que recebeu o tratamento com as células injetadas na borda da lesão (peri infarto) ao longo do tempo. Como pode ser observado, o DC diminuiu com o IM (dia 1), mas se recuperou nos dias seguintes, após o tratamento, quando comparada ao dia do IM, chegando a valores similares aos obtidos antes do IM. Análise realizada intra grupo, tendo como contraste o exame realizado no dia zero que é considerado sem qualquer tratamento ou em relação ao dia 1 (dia do IM). N= 6 animais. Realizado ANOVA de uma via como teste estatístico. (*) representa significância em relação ao tempo zero (antes da cirurgia de IM) * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; enquanto (Δ) significa que a comparação foi realizada intra grupo; ou seja, com o próprio animal, mas com os valores encontrados no dia 1, que eram os valores no início do IM; Δ p < 0,05; ΔΔ p < 0,01; ΔΔΔ p < 0,001. Todos os valores expressos como Média ± Erro Padrão da Média..... 133

Figura 34: Gráfico mostrando o Débito Cardíaco (L/min) medido no ECO do grupo que recebeu o tratamento com as células injetadas na veia da cauda (grupo T2). Como pode ser observado, o DC diminuiu com o IM (dia 1) e manteve-se baixo nos dias seguintes, após o tratamento. Análise realizada intra grupo, tendo como contraste o exame realizado no dia zero que é considerado sem qualquer tratamento (*). N= 6 animais. Realizado ANOVA de uma via como teste estatístico. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. (*) representa significância em relação ao tempo zero (antes da cirurgia de IM). Não houve diferença estatísticas quando os valores de 7 e 28 dias foram comparados com dia 1 (IM). Todos os valores expressos como Média ± Erro Padrão da Média..... 134

Figura 35: Gráfico mostrando o Débito Cardíaco (L/min) medido no ECO de todos os grupos experimentais. Valores indicados com (*) significam que a comparação foi realizada intra grupo com os valores do dia 0 (controle); ou seja, com o próprio animal antes da cirurgia; *p < 0,05; **p < 0,01; *** p < 0,001. (Δ) significa que a comparação foi realizada intra grupo; ou seja, com o próprio animal, mas com os valores encontrados no dia 1, que eram os valores no início do IM; Δ p < 0,05; ΔΔ p < 0,01; ΔΔΔ p < 0,001. (†) significa que a comparação foi realizada contra o grupo sem tratamento no mesmo tempo de observação; † p < 0,05; †† p < 0,01; ††† p < 0,001. O gráfico mostra que o grupo não tratado apresentou valor DC baixo depois do IM e permaneceu com o valor reduzido até o fim da observação. O grupo T1 apresentou recuperação do valor de DC, nos dias 7 e 28 para valores que não diferiram estatisticamente dos encontrados antes do IM. Com 7 e 28 dias, o grupo T1, também teve um valor de DC maior do que o grupo não tratado nestes mesmos tempos. O grupo T2 não apresentou melhoras neste parâmetro depois do tratamento. Todos os valores expressos como Média ± Erro Padrão da Média. Foi usado ANOVA de duas vias e Tukey para análise estatística..... 135

Figura 36: Gráfico mostrando o Diâmetro Diastólico Final (em mm) medido no ECO do grupo sem tratamento ao longo do tempo. Como pode ser observado, o DDF aumentou no grupo sem tratamento e continuou aumentando ao longo do tempo. N=

6 animais. Realizado ANOVA de uma via como teste estatístico. Todos os valores expressos como Média ± Erro Padrão da Média. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. (*) representa significância em relação ao tempo zero (antes da cirurgia de IM). (Δ) significa que a comparação foi realizada intra grupo; ou seja, com o próprio animal, mas com os valores encontrados no dia 1, que eram os valores no início do IM; Δ p < 0,05; ΔΔ p < 0,01; ΔΔΔ p < 0,001..... 136

Figura 37: Gráfico mostrando o Diâmetro Diastólico Final (em mm) medido no ECO do grupo T1, ao longo do tempo. Como pode ser observado, o DDF aumentou no grupo T1 após o infarto, mas não aumentou ao longo do tempo com o tratamento com as células. N= 6 animais. Realizado ANOVA de uma via como teste estatístico. Todos os valores expressos como Média ± Erro Padrão da Média. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. (*) representa significância em relação ao tempo zero (antes da cirurgia de IM). (Δ) significa que a comparação foi realizada intra grupo; ou seja, com o próprio animal, mas com os valores encontrados no dia 1, que eram os valores no início do IM; Δ p < 0,05; ΔΔ p < 0,01; ΔΔΔ p < 0,001..... 137

Figura 38: Gráfico mostrando o Diâmetro Diastólico Final (em mm) medido no ECO do grupo T2 ao longo do tempo. Como pode ser observado, o DDF aumentou no grupo T2 após o infarto, mas não aumentou ao longo do tempo. N= 6 animais. Realizado ANOVA de uma via como teste estatístico. Todos os valores expressos como Média ± Erro Padrão da Média. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. (*) representa significância em relação ao tempo zero (antes da cirurgia de IM). (Δ) significa que a comparação foi realizada intra grupo; ou seja, com o próprio animal, mas com os valores encontrados no dia 1, que eram os valores no início do IM; Δ p < 0,05; ΔΔ p < 0,01; ΔΔΔ p < 0,001..... 138

Figura 39: Gráfico mostrando o DDF (mm) medido no ECO de todos os grupos experimentais. Valores indicados com (*) significam que a comparação foi realizada intra grupo com os valores do dia 0 (controle); ou seja, com o próprio animal antes da cirurgia; *p < 0,05; **p < 0,01; *** p < 0,001. (Δ) significa que a comparação foi realizada intra grupo; ou seja, com o próprio animal, mas com os valores encontrados no dia 1, que eram os valores no início do IM; Δ p < 0,05; ΔΔ p < 0,01; ΔΔΔ p < 0,001. (†) significa que a comparação foi realizada contra o grupo sem tratamento no mesmo tempo de observação; † p < 0,05; †† p < 0,01; ††† p < 0,001. O gráfico mostra que todos os grupos apresentaram valores de DDF baixos depois do IM. Analisando estatisticamente todos os grupos juntos não houve diferenças entre os grupos. Todos os valores expressos como Média ± Erro Padrão da Média. Foi usado ANOVA de duas vias e Tukey para análise estatística..... 139

Figura 40: Imagem demonstrando a coloração de Picrosirius utilizada para medir o tamanho dos infartos. Em A) é demonstrado um coração normal (não infartado). Em B) é mostrado um coração infartado após 28 dias. É possível notar o afinamento da parede infartada, ressaltada pela indicação da seta e a grande deposição de colágeno que pode ser evidenciado nessa coloração pelo forte coloração avermelhada. VE significa ventrículo esquerdo; enquanto VD significa ventrículo direito..... 142

Figura 41: Gráficos mostrando o tamanho do infarto em % nos grupos experimentais ao final do experimento (28 dias). O grupo de animais cujo tratamento foi realizado com injeção de células na borda infartada (T1) apresentou um tamanho de infarto

menor do que o grupo não tratado e do que o grupo que recebeu as células por via endovenosa (grupo T2) pela injeção na veia da cauda. O grupo T2 apresentou tamanho de infarto com tamanho similar ao grupo não tratado. Análise realizada inter grupo, utilizando ANOVA de uma via. Todos os valores expressos como Média \pm Erro Padrão da Média. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$144

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros eletrocardiográficos dos animais antes e após a cirurgia para obtenção do infarto do miocárdio.....	109
Tabela 2: Parâmetros Eletrocardiográficos dos Grupos Experimentais.....	116
Tabela 3: Parâmetros Ecocardiográficos antes e após a cirurgia para produção de infarto.....	117
Tabela 4: Percentuais de água no pulmão e fígado e Índice de coração nos grupos experimentais no final dos experimentos.....	141
Tabela 5: Tabela com os valores do tamanho dos infartos dos animais em cada fatia e o valor total calculado (N=18 animais).....	143

UNIDADES DE MEDIDAS

mM	Milimolar
μ M	Micromolar
μ L	Microlitro
mL	Mililitros
μ g	Micrograma
ng	Nanograma
μ m	Micrômetro

LISTA DE ABREVIATURAS

α -MEM	“Alpha-modified Eagle’s medium”.
ADP	Difosfato de adenosina.
Ae	Dimensão do átrio esquerdo (milímetro) medido no modo M.
AGT	Angiotensinogênio.
Ang I	angiotensina I.
Ang II	Angiotensina II.
Ao	Dimensão da aorta (milímetro) medido no Modo M.
AQRS	Eixo de despolarização Ventricular Médio no Plano Frontal.
ASE	Sociedade Americana de Ecocardiografia.
AT	Receptor para angiotensina.
ATP	Trifosfato de Adenosina.
bmp-2	“Bone morphogenic protein-2”
C/EBP α	“CCAAT-enhancer-binding protein α ”.
cbfa-1	“core-binding factor alpha 1”
CDTA	Células derivadas do tecido adiposo.
CFU-F	Unidade formadora de colônia
CTH	Células Troncos Hematopoiéticas.
CTM	Células Troncos Mesenquimais.
CX	Ramo circunflexo da artéria coronária.
DA	Ramo descendente da artéria coronária.
DC	Débito Cardíaco.
DCI	Doenças cardíacas isquêmicas.
DDF	Diâmetro do Ventrículo esquerdo em milímetro, medido pelo Modo M no final da diástole. Também referenciado como Diâmetro Diastólico Final.
DMEM	“Dulbecco's modified Eagle’s medium”.
DP	Desvio padrão.
DSF	Diâmetro do Ventrículo esquerdo em milímetro, medido no Modo M no final da sístole. Também referenciado como Diâmetro Sistólico Final.
ECA	Enzima conversora da angiotensina.
ECG	Eletrocardiograma.
ECO	Ecocardiograma.
EUA	Estados Unidos da América.
FA	Fosfatase alcalina.
FC	Frequência cardíaca.
FE	Fração de encurtamento em percentual medida no Modo M.
FEM	Fração de ejeção em percentual medida no Modo M.
FES	Fração de ejeção em percentual medida pelo método de Simpson.
FITC	Isotiocianato de fluoresceína, usado como conjugado em anticorpos.
FL	Intensidade da fluorescência.
FSC	“Forward Scatter Cell” ou dispersão frontal da luz.

GR	Gramas.
HE	Coloração de hematoxilina e eosina.
IAM	Infarto agudo do miocárdio.
Ibmx	isobutila-metilxantina
ICC	Insuficiência cardíaca congestiva.
ICM	Infarto cicatrizado do miocárdio.
IM	Infarto do miocárdio.
IP	Intraperitoneal.
iPS	Células-tronco induzidas.
IQRS	Índice de QRS total.
MCI	Massa celular interna.
MHz	Unidade de frequência. Equivalente a um milhão de ciclos por segundos (mega-hertz).
MMP	Matriz de Metaloprotease.
OC	Osteocalcina.
ON	Osteonectina 4.
PAD	Espessura da parede anterior do Ventrículo esquerdo em diástole (milímetro) medida no Modo M.
PAS	Espessura da parede anterior do Ventrículo esquerdo em sístole (milímetro) medida no Modo M.
PBS	Solução salina tampão.
PDFVE	Pressão diastólica final do ventrículo esquerdo.
PE-Cy5	Corante indotricarbociana associado a ficoeritrina, usado como conjugado em anticorpos.
PPAR γ	“Peroxisome proliferator-activated receptor γ ”.
PPD	Espessura da parede posterior do Ventrículo esquerdo em diástole (milímetro) medida no Modo M.
PPS	Espessura da parede posterior do Ventrículo esquerdo em sístole (milímetro) medida no Modo M.
PSVE	Pressão sistólica do ventrículo esquerdo.
PTHR	Receptor para o hormônio paratormônio.
SSC	“Side Scatter Cell” ou dispersão lateral da luz.
TAB	Tecido adiposo branco.
TAM	Tecido adiposo marrom.
VD	Ventrículo direito.
VE	Ventrículo esquerdo.
VEGF	Fator estimulador de crescimento de endotélio e vasos.

SUMÁRIO

1.Introdução.....	24
1.1 Infarto do Miocárdio: Importância e Aspectos Epidemiológicos.....	24
1.2 Infarto do Miocárdio: Aspectos Fisiopatológicos.....	27
1.3 Células-Tronco: Algumas Definições.....	30
1.4 Medula Óssea: Alguns Aspectos.....	34
1.5 Terapias Celulares.....	37
1.6 Tecido Adiposo: Principais Características.....	41
Tecido Adiposo Branco.....	43
Tecido Adiposo Marrom.....	45
Formação do Tecido Adiposo.....	48
Tecido Adiposo como fonte de estudo para o desenvolvimento de terapias celulares.....	53
2.Objetivos.....	59
2.1 Objetivo Geral.....	59
2.2 Objetivos Específicos.....	59
3.Materiais e Métodos.....	61
3.1 Animais.....	61
3.2 Grupos Experimentais.....	62
3.3 Realização dos Infartos.....	63
3.4 Registro do Eletrocardiograma.....	66
3.5 Exames Ecocardiográficos.....	69
Avaliação da Função Sistólica do Ventrículo Esquerdo.....	71
Avaliação da Função Diastólica do Ventrículo Esquerdo.....	73
3.6 Obtenção das Células Derivadas do Tecido Adiposo.....	74
3.7 Cultura de Células Derivadas do Tecido Adiposo.....	81
3.8 Caracterização das Células.....	82
Caracterização Morfológica pela Coloração de “Red-Oil O”.....	82
Caracterização pela Citometria de Fluxo.....	84
3.9 Contagem e Preparo das Células para Tratamento dos Animais.....	87
3.10 Tratamento dos Animais.....	89
Injeção das Células na Borda da Lesão do Infarto (Grupo T1).....	89
Injeção das Células na Circulação Periférica (Grupo T2).....	90
3.11 Avaliação da Insuficiência Cardíaca.....	92
3.12 Análises Histopatológicas e Medição do Tamanho do Infarto.....	93
Coloração de Hematoxilina e Eosina.....	94
Coloração de “Picrosirius”.....	95
3.13 Medição do Tamanho do Infarto.....	96
3.14 Análises Estatísticas.....	97
4.Resultados.....	100
4.1 Rendimento do processo de obtenção e cultura das células.....	100
4.2 Caracterização das Células.....	103
4.3 Grupos Experimentais: Visão Clínica e Comparativo da Taxa de Mortalidade dos Animais.....	106

4.4 Eletrocardiograma.....	109
Eletrocardiograma dos animais antes e depois da cirurgia para obtenção do infarto do miocárdio.....	109
Parâmetros Eletrocardiográficos quando se considera os Grupos Experimentais.....	113
4.5 Ecocardiograma.....	117
Ecocardiografia dos animais antes e depois da cirurgia para produção do infarto do miocárdio.....	117
Ecocardiografia dos grupos experimentais.....	119
Fração de Ejeção no Modo M.....	119
Fração de Encurtamento no Modo M.....	124
Fração de Ejeção pelo Método de Simpson.....	128
Mensuração do Débito Cardíaco.....	132
Diâmetro do Ventrículo Esquerdo Medido pelo Ecocardiograma.....	136
4.6 Avaliação da Insuficiência Cardíaca.....	140
4.7 Análises Histológicas e Medição do Tamanho dos Infartos.....	142
5. Discussão.....	147
5.1 Obtenção e caracterização das células derivadas do tecido adiposo.....	147
5.2 Grupos experimentais, considerações.....	149
6. Conclusões.....	162
7. Referências Bibliográficas.....	163

Introdução

1. Introdução

1.1 Infarto do Miocárdio: Importância e Aspectos Epidemiológicos

As doenças cardiovasculares, em especial as doenças cardíacas isquêmicas (DCI), estão entre as principais causas de morte e/ou afastamento do trabalho; consistindo, portanto, em um grande problema de saúde pública (Bristow 1994; Laurenti, Buchalla, e Caratin 2000; Bocchi et al. 2009; Lotufo et al. 2012; Go et al. 2013).

Nos Estados Unidos (EUA) estima-se que 6,0 milhões de pessoas têm insuficiência cardíaca congestiva (ICC) (Rosenzweig 2012). A maioria dos casos são de origem pós-isquêmica, o que já representou quase 1,0 % da população deste país (Smith 1985; Paul et al. 1994). Além dos aspectos relativos à qualidade de vida e aos prejuízos causados pela incapacidade para o trabalho e aposentadorias precoces, os tratamentos da ICC têm impactos econômicos importantes para os órgãos de saúde pública dos países (Julian 1989; Morris 1990; Hristov et al. 2006; Takemura e Fujiwara 2006).

Conforme mencionado, os custos para tratamento destes pacientes são relativamente onerosos para os cofres públicos. Esse custo, nos EUA, por exemplo, é considerado um dos mais elevados dentre os programas de saúde pública, chegando-se a gastar cerca de 6,5 % do total de recursos destinados aos programas de saúde para os tratamentos dos pacientes de ICC; o que significou, em valores

numéricos, ao equivalente à 34,4 bilhões de dólares de gastos com o tratamento desses pacientes (Rosenzweig 2012).

Uma revisão dos dados relacionados às causas de morte nos países da América do Sul, mostra uma situação não muito diferente da demonstrada acima (Bocchi et al. 2009). Este estudo mostra que, baseado nos dados referentes a 50 % da população da América do Sul, as doenças do aparelho circulatório ainda figuram como uma das principais causas de morte, destacando a DCI como a segunda maior causa de morte. Além disso, os quadros de insuficiência cardíaca são a principal causa de hospitalização, representando um sério problema de saúde pública (Bocchi et al. 2009).

No Brasil a situação não é muito diferente. Um estudo a partir de dados coletados do Sistema Único de Saúde (SUS) relacionando as hospitalizações realizadas no Brasil no período de 1993 a 1997, mostrou que as doenças cardíacas isquêmicas (DCI) representaram cerca de 1,0 % do total das hospitalizações no país. “*Angina pectoris*” foi a patologia mais frequente, ocorrendo em 53,3 % dos casos, vindo logo em seguida o infarto agudo do miocárdio (IAM) com 26,6 % dos casos. A pesquisa também mostrou que o IAM foi mais frequente no sexo masculino, enquanto a “*angina pectoris*” foi a ocorrência predominante nas mulheres. A maioria dos pacientes com DCI permaneceu hospitalizada entre 5 a 8 dias, fazendo com que o impacto econômico causado pela DCI também seja importante no Brasil; elevando os gastos em hospitais para tratamento dessas doenças à cerca de 0,01 % do produto interno bruto (PIB). No período estudado, embora as doenças isquêmicas tenham sido responsáveis por apenas 1,0 % das hospitalizações, esse valor

representou cerca de 3,3 % do total dos valores gastos do SUS (Laurenti, Buchalla, e Caratin 2000).

Como visto, a doença afeta tanto países desenvolvidos, quanto aqueles em desenvolvimento. No Estado de São Paulo, por exemplo, apesar dos dados recentes indicarem uma ligeira queda de incidência de DCI nos últimos anos e atingir valores percentuais ligeiramente diferentes de acordo com a classe social em que o indivíduo se encontra, as doenças isquêmicas ainda são de longe as que mais afetam a população, tendo incidência equivalente à de outras doenças como o câncer, por exemplo (Lotufo et al. 2012).

Apesar dos grandes avanços alcançados no tratamento de doenças cardiovasculares agudas, como por exemplo, os ataques cardíacos; a maioria dos pacientes poderá evoluir tardiamente para sequelas danosas desses episódios, desenvolvendo quadros de ICC e/ou arritmias cardíacas graves (Minicucci et al. 2011; Rosenzweig 2012; Go et al. 2013).

No homem, quadros de ICC podem advir de várias causas sendo a principal delas o IM, sobretudo o infarto cicatrizado do miocárdio (ICM) ou infarto crônico, como também é conhecido (Minicucci et al. 2011). Do ponto de vista clínico, pacientes com ICM estão sujeitos a uma maior incidência de arritmias ventriculares, “*angina pectoris*” e quadros de ICC; em especial, naqueles pacientes com infartos de grande extensão ou repetitivos (Julian 1989; Morris 1990; Takemura e Fujiwara 2006; Hristov et al. 2006; Minicucci et al. 2011).

1.2 Infarto do Miocárdio: Aspectos Fisiopatológicos

Por definição o IM é uma cardiopatia isquêmica, causada por obstrução de vasos da circulação coronariana, o que resulta na redução da perfusão local com consequente morte de cardiomiócitos (Factor 1990). A isquemia leva a hipóxia e/ou anóxia local, causando alterações diretas nas mitocôndrias, diminuição da fosforilação oxidativa e, conseqüentemente, dos níveis de trifosfato de adenosina (ATP). Até aqui, os danos celulares ainda podem ser reversíveis (Case RB 1989).

Com a persistência da isquemia, ocorre vacuolização das mitocôndrias, que já pode ser detectada 30 (trinta) a 40 (quarenta) minutos após a isquemia. Nesse estágio, instauram-se eventos de lesão celular irreversível, atuando principalmente nas membranas celulares. Há uma perda contínua de proteínas, enzimas e ácidos ribonucleicos (RNAs) essenciais para a célula. Membranas lisossômicas são rompidas, levando ao extravasamento das enzimas lisossomiais para o citoplasma. Essas enzimas provocam a digestão enzimática dos componentes celulares, ocasionando a morte da célula por autólise (Case RB 1989).

O IM também se caracteriza pela apresentação de uma fase de cicatrização, que se inicia logo após essa fase aguda, onde o tecido necrosado é gradativamente substituído por tecido conjuntivo fibroso. Após algum tempo (que pode variar de semanas ou meses, dependendo da espécie), quando o processo cicatricial se completa; tem início uma terceira fase (considerada crônica), com característica histológica estável, denominada de “infarto cicatrizado” ou “infarto antigo”. No homem, a fase crônica inicia-se entre a 6^a e a 12^a semana após a lesão miocárdica,

sendo caracterizada estruturalmente pela presença de uma cicatriz fibrosa, neovascularizada, transmural ou subendocárdica, com tamanho variável, constituída de fibroblastos e pela deposição de colágeno (Fishbein, Maclean, e Maroko 1978a; Fishbein, Maclean, e Maroko 1978b; Factor 1990).

Apesar dos distúrbios metabólicos ocorridos durante a isquemia serem dramáticos, evidências clínicas e experimentais demonstram que os principais eventos que realmente promovem disfunções celular e tecidual, relacionam-se com a subsequente reperfusão (Evora et al. 1996). Após a necrose dos cardiomiócitos, inicia-se rapidamente uma série de respostas celulares através da sinalização célula/célula; que regula o reparo tecidual, contribuindo para a reconstrução do miocárdio infartado e a manutenção da integridade do ventrículo (Tholpady et al. 2006). Este processo é caracterizado, inicialmente, pela atração e invasão de células inflamatórias no sítio da lesão, pela ativação e síntese de peptídeos, pela formação de novos vasos sanguíneos e pelo surgimento dos fibroblastos. Esta fase inflamatória inicial de cicatrização, com a resultante formação de tecido de granulação, é seguida por uma fase fibrogênica que resulta no tecido cicatricial (Fishbein, Maclean, e Maroko 1978b; Mill et al. 1990; Pfeffer e Braunwald 1990; Litwin et al. 1994; Evora et al. 1996; Ribeiro et al. 2006; Miranda et al. 2007).

A matriz então formada é composta por mio fibroblastos que em condições normais não são encontrados no tecido cardíaco, exceto nos folhetos valvares (Sun e Weber 2000). Estes, são originados a partir dos fibroblastos por influência de uma citocina, chamada “Transforming Growth Factor” (TGF-1), que é sintetizada por macrófagos ativados (Desmoulière et al. 1993).

O balanço entre a síntese e a degradação de colágeno é considerado o determinante primário da fibrose tecidual. A degradação do colágeno envolve enzimas proteolíticas conhecidas como matriz metaloproteases (MMPs). Uma delas, a colagenase (MMP-1), tem sua atividade aumentada na fase inicial de reparo no IM em ratos e sua atividade proteolítica aumenta a degradação de fibrilas de colágeno (Sun e Weber 2000). Nas primeiras semanas de infarto também são encontrados em grande quantidade, os chamados inibidores da atividade colagenolítica, levando ao acúmulo gradativo de colágeno na lesão, contribuindo para a formação do tecido fibroso e o remodelamento estrutural das regiões não infartadas (Ausma et al. 1995; J. P. Cleutjens et al. 1995; Jack P. Cleutjens et al. 1995; Sun e Weber 2000).

Estas transformações agudas e crônicas que ocorrem tanto na área infartada e necrótica, quanto nas não necróticas; bem como na região peri infarto, geram uma cascata de alterações estruturais e geométricas progressivas nos ventrículos conhecida como remodelamento cardíaco (Pfeffer e Braunwald 1990; Litwin et al. 1994). Inicialmente, o ventrículo submetido ao estresse exibe uma função adequada, tem a forma normal e a relação massa/volume do ventrículo pode, inclusive, estar acima do normal. Entretanto, com o passar do tempo a capacidade compensatória do coração se torna ineficiente; o tecido ventricular não infartado pode apresentar remodelamento de sua arquitetura, caracterizado por hipertrofia, aumento do volume das cavidades ventriculares e, até mesmo, em casos mais extremos, ocorrer a formação de aneurisma na parede ventricular e depósito de cálcio na lesão (Fishbein, Maclean, e Maroko 1978b; Mill et al. 1990; Pfeffer e Braunwald 1990; Litwin et al. 1994; Jack P. Cleutjens et al. 1995; J. P. Cleutjens et al. 1995; Sun e

Weber 2000; Ribeiro et al. 2006; E. L. Olivares et al. 2007). Esses achados estão bem relacionados à extensão do infarto, à evolução do processo cicatricial e com a sobrecarga hemodinâmica que pode se instalar já precocemente na fase aguda do processo (Ellis, Doumanian, e Plun 1962) apud (Factor 1990; Pfeffer e Braunwald 1990; Santos e Masuda 1991; Bäcklund et al. 2003).

Considerando que 44,0 % dos pacientes com ICC são candidatos ao transplante cardíaco, uma vez que as opções terapêuticas existentes atualmente (farmacológicas e cirúrgicas) são limitadas e, muitas vezes, incapazes de interromper a progressão da doença (Hosenpud et al. 2000; Minicucci et al. 2011) se torna necessário investigar formas alternativas de terapias, assim como o melhor momento de aplicá-las. Um exemplo de terapia pode ser as terapias celulares.

1.3 Células-Tronco: Algumas Definições

As células-tronco são caracterizadas como células indiferenciadas (sem especialização funcional e sem marcadores de diferenciação que sejam específicos para determinados tecidos), com capacidade de proliferação, autorrenovação e de plasticidade¹. além disso, elas podem ser encontradas em vários tecidos e ainda em medula óssea e sangue de cordão umbilical (Filip et al. 2008; Mizuno, Tobita, e Uysal 2012).

A taxa de proliferação das células-tronco é considerada baixa (Alison 2002; Alison et al. 2002) e elas podem seguir dois diferentes modelos de divisão celular: o

¹ **Plasticidade** pode ser definido como a capacidade que determinadas células possuem de se diferenciarem em tecidos distintos (Loeffler et al. 1997; Filip et al. 2008).

chamado *determinístico*, no qual sua divisão gera sempre uma célula-tronco idêntica e já comprometida com alguma linhagem específica; ou o dito *modelo aleatório*, onde algumas células-tronco geram somente novas células-tronco, enquanto outras geram apenas células progenitoras, que já sejam comprometidas com uma determinada linhagem (Loeffler et al. 1997).

As células-tronco consideradas mais primitiva são o oócito fertilizado (zigoto) e aquelas células que sejam descendentes das duas primeiras divisões mitóticas. Estas células são consideradas *totipotentes*, pois são capazes de gerar o embrião e também o trofoblasto da placenta (Alison 2002; Alison et al. 2002; Dawn e Bolli 2005; Filip et al. 2008; Duncan, Dorrell, e Grompe 2009).

Após quatro dias, estas células totipotentes começam a se especializar, formando uma massa de células esféricas, que são chamadas de blastocistos, que por sua vez contêm a massa celular interna (MCI), de onde o embrião se desenvolve. A MCI do blastocisto é formada por Células-Tronco Embrionárias (ES) que podem se diferenciar em células dos três folhetos embrionários (endoderma, mesoderma e ectoderma) (Filip et al. 2008).

As ES aparentemente não são capazes de originar a placenta e os tecidos que sustentam a gestação e são chamadas de *pluripotentes*. A maioria dos tecidos parece conter células-tronco multipotentes, capazes de produzir uma limitada variedade de linhagens celulares diferenciadas de acordo com a sua localização (Alison 2002; Alison et al. 2002; Herzog, Chai, e Krause 2003). Podemos citar como exemplo, as células-tronco encontradas no Sistema Nervoso Central (SNC) que são

capazes de gerar neurônios, oligodendrócitos e astrócitos, sendo consideradas multipotentes pelo fato de poderem gerar diferentes tipos celulares relacionados somente a sua localização (D. L. Clarke et al. 2000; Momma, Johansson, e Frisén 2000).

Ainda temos as células-tronco chamadas de células *unipotentes*, cujas progenitoras já estão comprometidas e são capazes de originar um único tipo celular específico (Lovell e Mathur 2004). Estas progenitoras comprometidas originam células com capacidade de autorrenovação limitada; além de, geralmente, possuírem uma rápida taxa de proliferação. É interessante ressaltar, que essas células podem se dividir e originar células diferenciadas, que perdem ou diminuem a sua capacidade de proliferação (Alison 2002; Alison et al. 2002; Young e Schäfer 2014).

Como já comentado anteriormente, as ES num primeiro momento, até poderiam parecer mais adequadas para a terapia celular, visto que o seu potencial em originar os diversos tipos celulares seria bastante vasto. Na prática, isso ainda não é possível, colocando tais células no meio de grandes debates políticos e filosóficos em quase todos os países que se dispõem a estudá-las como terapia (Lenoir 2000; Ben-David e Benvenisty 2011; Mizuno, Tobita, e Uysal 2012). Do ponto de vista científico, além dos problemas éticos, o seu emprego esbarra em fatores complicadores como o seu grande potencial teratogênico, além da possibilidade de aumento da necessidade de se administrar drogas imunossupressores nos pacientes tratados com elas. Na prática, esses problemas acabam por limitar o emprego terapêutico das ES no momento atual do desenvolvimento tecnológico

(Leri, Kajstura, e Anversa 2005; Ben-David e Benvenisty 2011; Boyd et al. 2012; Mizuno, Tobita, e Uysal 2012).

Levando em conta os debates envolvendo as ES e as suas limitações técnicas para uso na terapia celular; faz das células-tronco oriundas de tecidos adultos, uma fonte alternativa de células para emprego nas terapias celulares. Como visto, essas células estão presentes em muitos tecidos; sendo já descritas em: medula óssea, pele, músculos, tecido adiposo, coração, dentre outros (Mizuno, Tobita, e Uysal 2012). De todas elas, certamente as mais estudadas e empregadas em terapias celulares são aquelas encontradas na medula óssea (Dawn e Bolli 2005).

Outro tipo de célula-tronco com potencial para aplicações práticas é a chamada célula-tronco pluripotente induzida (iPS), que são as células-tronco derivadas de células já diferenciadas; tais como, fibroblastos da pele e “reprogramadas” para se comportarem como células-tronco e parecem ter o mesmo potencial e propriedades da ES; mas com a vantagem de sua produção não ser dependente de uma fonte de embriões. Geralmente são produzidas inserindo-se nela 4 (quatro) genes (oct-4, sox-2, Klf-4 e c-Myc) através de um vetor viral. Estes genes se inserem no DNA da célula adulta (ex.: pele) e reprogramam o seu código genético. Como este novo programa, as células voltam ao estágio de uma célula-tronco embrionária e possuindo características de autorrenovação e a capacidade de se diferenciarem em qualquer tecido (Takahashi et al. 2007; Boyd et al. 2012; Okano e Yamanaka 2014). Um exemplo de produção de iPS pode ser visualizado na figura 1.

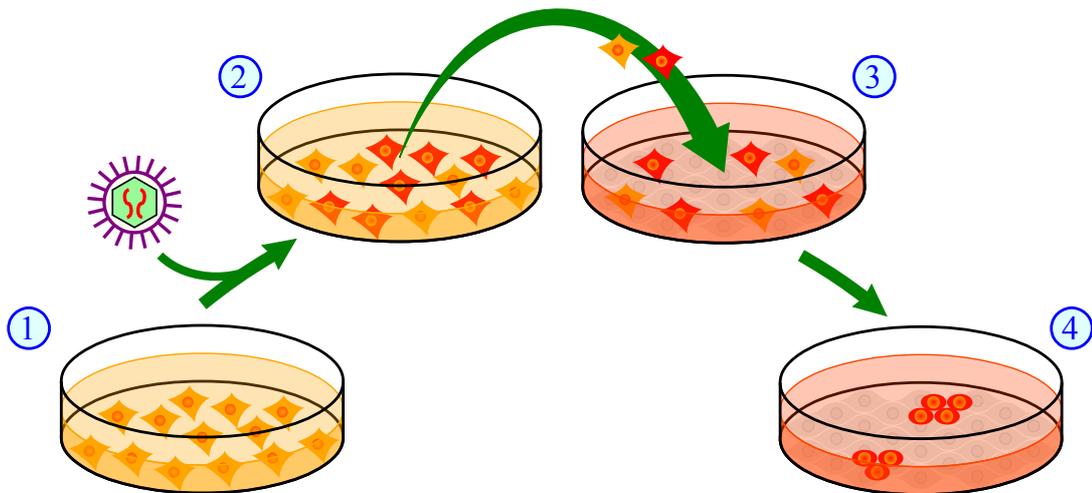


Figura 1: Figura mostrando um esquema de geração de células-tronco pluripotentes induzidas (iPS). (1) As células doadoras são isoladas e cultivadas. (2) Transferem-se os genes das células-tronco associadas para as células doadoras por meio de vetores virais. As células vermelhas indicam as células que manifestam os genes exógenos. (3) As células cultivadas são colhidas de acordo com estratégias de cultivo de células-tronco, pela utilização de fibroblastos mitoticamente inativos (cor cinza claro). (4) Um pequeno subgrupo dessas células transfectadas tornam-se células-tronco pluripotentes induzidas e a partir desse momento produzem colônias de células-tronco. (Imagem modificada e obtida de <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:NoFonti.svg#/media/File:NoFonti.svg>, licenciada sob CC BY-SA2.5, disponível na internet em 30/03/2015).

1.4 Medula Óssea: Alguns Aspectos

Como mencionado anteriormente a medula óssea é uma grande fonte de células-tronco e é um tecido líquido gelatinoso que ocupa o interior dos ossos. Na medula óssea são produzidos os componentes do sangue: as hemácias, os leucócitos e as plaquetas. Ela pode ser vista como um tecido organizado em dois compartimentos distintos: o **hematopoiético**, capaz de fornecer células maduras de todas as linhagens sanguíneas; e o **estroma**, que se constitui de um microambiente com características diversas, que é capaz de promover a autorrenovação e a diferenciação das células-tronco (Hüttmann, Li, e Dührsen 2003).

Um esquema representativo de uma medula óssea pode ser visto na figura 2.

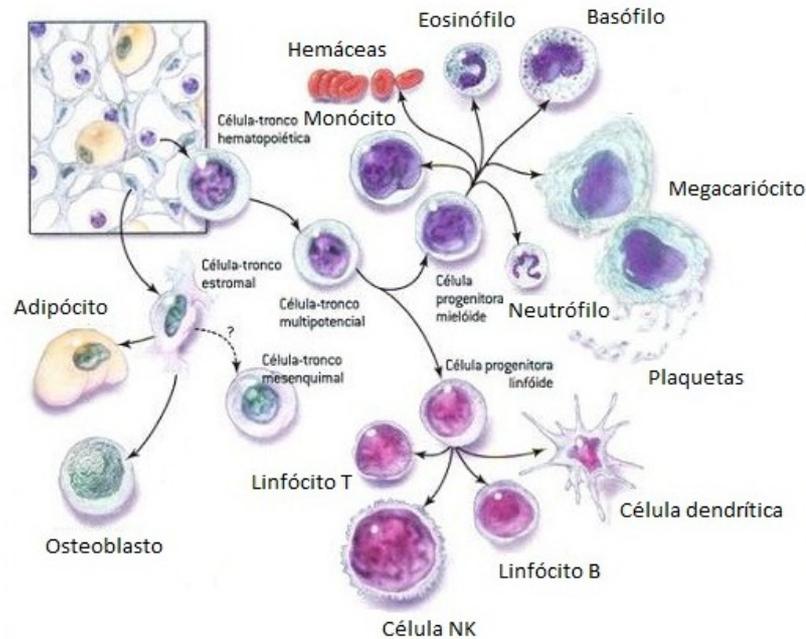


Figura 2: Figura mostrando um esquema de medula óssea. É possível observar que dois compartimentos se destacam: o hematopoiético, contendo as células-tronco hematopoiética que são capazes de gerar outras células-tronco hematopoiética e também toda a linhagem hematopoiética e o compartimento estromal que contém as células-tronco estromal, que também são capazes de gerar outras células mesenquimais e outras populações celulares; tais como, adipócitos e osteoclastos. Esquema modificado do original encontrado no endereço na internet: <http://www.medicinageriatrica.com.br/tag/medula-ossea/>, disponível em 02/05/2015).

As *Células-tronco Hematopoiéticas* (CTH) são caracterizadas como células multipotentes, com alta capacidade de proliferação, de autorrenovação e de diferenciação em uma variedade de células das linhagens mielóide e linfóide especializadas (Goodell et al. 1996; Osawa et al. 1996). Elas têm a capacidade de reconstituir e manter todas as linhagens sanguíneas (Lovell e Mathur 2004) e podem ser mobilizadas para fora da medula óssea, atingindo a circulação sanguínea

conforme a necessidade (Bonnet 2002; Bonnet 2003). Fenotipicamente, elas podem expressar os marcadores hematopoiéticos “**CD45 +**”, “**CD34 +**”, “**CD133 +**” e “**CD117 +**” (“c-kit”), mas são ausentes dos marcadores “**lin -**” (Dawn e Bolli 2005).

O estroma da cavidade medular é constituído basicamente por células endoteliais, osteoblastos, células adventícias e células reticulares. Além disso, também estão presentes neste compartimento as *Células-Tronco Mesenquimais* (CTM) que têm demonstrado possuir um grande potencial de se diferenciar nos mais diversos tecidos (Bianco e Gehron Robey 2000).

As CTMs foram isoladas e inicialmente descritas na década de 70, baseado na sua capacidade de aderência à superfície da placa de cultivo e no seu grande potencial de diferenciação (Friedenstein et al. 1974; Caplan 1991; B. R. Clarke e Keating 1995; Pittenger et al. 1999; Qayyum et al. 2012; L. Chen et al. 2014). Elas podem se diferenciar *In Vitro* em diversas linhagens celulares: osteoblastos, condrócitos, adipócitos (Caplan 1991; Pittenger et al. 1999), músculo esquelético (Ferrari et al. 1998), músculo cardíaco (Hakuno et al. 2002); além de células endoteliais, hepatócitos, neurônios, oligodendrócitos e astrócitos (Jiang et al. 2002; Young e Schäfer 2014).

As CTMs, pela sua capacidade de diferenciação, têm sido o tipo celular de escolha para uso nos estudos de tratamentos de doenças cardíacas em ratos (Orlic 2002; E. Olivares et al. 2004; E. L. Olivares et al. 2007; Young e Schäfer 2014) e mesmo em humanos (Perin et al. 2004). A coleta de medula óssea para fins de tratamento, apesar de ser considerado um procedimento já bem estabelecido, ainda

pode ser considerado invasivo e dependendo do estado clínico em que o paciente se encontra, a quantidade de material coletado pode ser insuficiente para realização de mais de um tratamento. Baseado nestes fatos, outros tecidos também têm sido alvo de pesquisa para fins de utilização em terapia celular, sendo o tecido adiposo (TA) um deles (L. Chen et al. 2014).

1.5 Terapias Celulares

Um certo número de condições patológicas, tais como falência de órgãos, podem ser tratadas através de procedimentos clínicos atuais e estratégias cirúrgicas, incluindo transplantes de órgãos, transferência de tecido autólogo e mesmo a utilização de materiais artificiais; no entanto, estes tratamentos têm limitações potenciais, que incluem desde a falta de órgãos para os transplantes, potenciais danos em partes saudáveis do corpo durante os tratamentos mais invasivos, reações alérgicas e de rejeição pelo sistema imunológico do receptor quando os tratamentos não envolvem materiais biológicos autólogos (Mizuno, Tobita, e Uysal 2012).

Como já mencionado anteriormente, os quadros decorrentes do IM tendem a se agravar e atualmente os tratamentos disponíveis são insuficientes para a reversão dessa grave situação; servindo, tão somente, como paliativo na tentativa de retardar a progressão do processo. Tradicionalmente, sempre se acreditou que o coração adulto não tem capacidade de cardiomiogênese para compensar as perdas dos cardiomiócitos ocorridas durante o quadro de insuficiência cardíaca (Olivetti et al. 1997) apud (Rosenzweig 2012). Estudos posteriores, no entanto, mostraram que

pode haver alguma regeneração, inclusive em corações humanos (Kajstura et al. 2010) apud (Rosenzweig 2012), sendo que em algumas espécies a regeneração pode ser ainda mais eficiente (Kikuchi e Poss 2012).

A busca por tratamentos que possam suplantar as limitações dos tratamentos atuais tem sido o alvo de estudo por diversos pesquisadores e as terapias celulares abrem a possibilidade de serem empregadas no tratamento dos quadros de ICC ou mesmo no IAM (Mizuno, Tobita, e Uysal 2012; L. Chen et al. 2014).

De uma maneira geral, a terapia ideal para ser empregada no tratamento do IM deveria minimizar as perdas de cardiomiócitos pela redução da morte celular; restabelecer a função normal do miocárdio hibernante²; estimular a revascularização da região isquêmica através do aumento da angiogênese e, se possível, “produzir” cardiomiócitos viáveis para substituição daqueles perdidos durante a isquemia inicial, tentando preservar a função contrátil e reduzindo a formação de cicatriz; ou seja, interferindo no remodelamento cardíaco (Fraser et al. 2004). A ideia principal deste tipo de terapia é usar células que poderiam ser obtidas do próprio paciente em busca de alguns dos efeitos citados (Mizuno, Tobita, e Uysal 2012).

Os recentes desenvolvimentos no campo da ciência de células-tronco, no conhecimento dos fatores de crescimento celulares e avanços na medicina regenerativa pode permitir o uso de células-tronco para reparar os danos nos tecidos e, eventualmente, até mesmo para substituir órgãos completamente (Minicucci et al. 2011; Mizuno, Tobita, e Uysal 2012).

² **Miocárdio Hibernante** é aquele que embora esteja vivo, não está realmente funcional. Ou seja, não está contraindo (Fraser et al. 2004).

Diversos tipos celulares estão sendo estudados para essa finalidade. Boa parte desses estudos envolve as células-tronco derivadas da medula óssea, mas outros tipos celulares também podem e estão sendo avaliadas como candidatas a serem empregadas nas terapias celulares, não só na cardiologia mas também na terapêutica de doenças que acometem outros órgãos. Possíveis células candidatas para terapia celular incluem as ES, Células-tronco Pluripotentes Induzidas (iPS) e as células-tronco adultas de origem pós-natal, encontradas em vários órgãos (Ben-David e Benvenisty 2011; Boyd et al. 2012; Mizuno, Tobita, e Uysal 2012).

As ES são capazes de autorrenovação e têm o potencial para se diferenciar em qualquer tipo de tecido somático, como já mencionado. Essas características fazem das ES promissoras para uso na medicina regenerativa no futuro (Ben-David e Benvenisty 2011; Boyd et al. 2012; Mizuno, Tobita, e Uysal 2012).

Embora o potencial terapêutico das ES e iPS seja enorme, devido à sua autoreprodutibilidade e pluripotencialidade, ainda existem algumas limitações à sua utilização de forma prática: como, por exemplo, as dificuldades existentes em se controlar a regulação celular durante o processo de diferenciação, com notório potencial de formação de teratomas (Ben-David e Benvenisty 2011). Considerações éticas de sua utilização, preocupações relativas com as respostas imunes das ES, além das dificuldades ainda existentes, na manipulação das vias genéticas para utilização eficiente das iPS, também são impeditivos para utilização prática dessas células em terapias celulares. Em contraste, as células-tronco adultas pós-natais são, por sua natureza, imunocompatíveis e não passam por preocupações éticas relacionadas com a sua utilização (Boyd et al. 2012; Mizuno, Tobita, e Uysal 2012).

Outras possibilidades de terapia celular é a utilização de células-tronco para produção de órgãos para posterior transplante no paciente. Pesquisadores têm trabalhado com essa linha de pesquisa e embora ainda esteja em fase inicial de desenvolvimento é uma possibilidade viável no futuro. Alguns estudos foram conduzidos com as iPS, na tentativa de formação de coração em laboratório (Lu et al. 2013). Um exemplo do processo pode ser visualizado na figura 3.

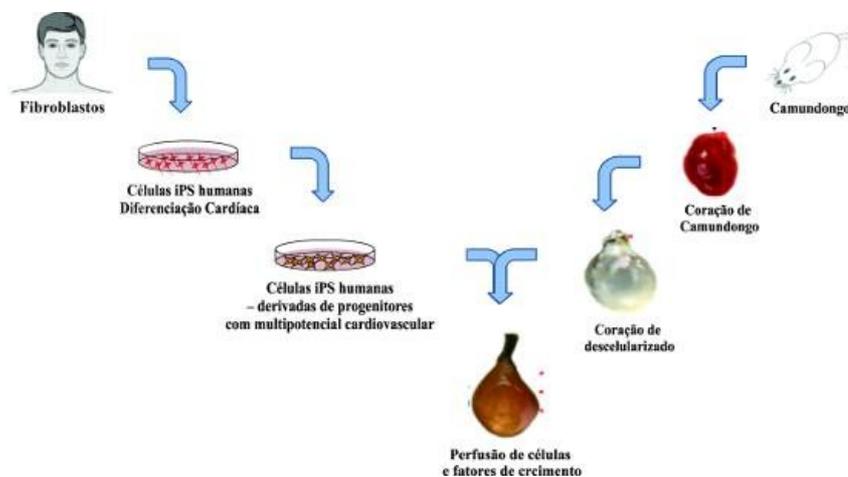


Figura 3: Esquema do processo de repopulação de coração de camundongo descclularizado com células-tronco induzíveis humanas. Fibroblastos humanos foram retirados e levados a produzir iPS direcionadas para a diferenciação cardíaca. Paralelo a isso, coração de camundongo foi processado para ser descclularizado para, posteriormente serem repopulados com as células iPS humanas. Figura modificada de (Lu et al. 2013).

As CTMs multipotentes são células não hematopoiéticas de origem mesodérmica que estão presentes, além da medula óssea, numa série de órgãos pós-natal e tecidos conjuntivos. O termo CTMs foi primeiramente utilizado na década de 90 (Caplan 1991). CTMs, com características semelhantes às encontradas na medula óssea, foram isolados a partir de diferentes fontes de tecido, incluindo osso

trabecular (Song et al. 2005), periósteo (Choi et al. 2008), membrana sinovial (De Bari et al. 2001), músculo esquelético (Dodson et al. 2010), pele (Belicchi et al. 2004), pericitos (Feng, Mantesso, e Sharpe 2010), sangue periférico (Shi et al. 2009), dentes decíduos (Miura et al. 2003), ligamento periodontal (Seo et al. 2004) e do cordão umbilical (Musina, Bekchanova, e Sukhikh 2005; Baksh, Yao, e Tuan 2007).

Embora a população de células-tronco derivadas a partir destes tecidos sejam fontes valiosas de células para a terapia celular, os problemas comuns incluem o baixo número ou quantidade limitada de células ou tecidos colhidos. Por conseguinte, quase todas as células-tronco e/ou progenitoras derivadas de adulto exigem pelo menos algum grau de expansão “ex vivo” ou manipulação adicional antes de serem utilizadas clinicamente ou pré clinicamente para satisfazer os requisitos de segurança e eficácia (Mizuno, Tobita, e Uysal 2012).

1.6 Tecido Adiposo: Principais Características

O tecido adiposo (TA) tem sido estudado por muito tempo pela sua importância nos riscos inerentes à obesidade, seja pelo aumento dos riscos de doenças circulatórias ou pela predisposição à diabetes que os pacientes obesos estão sujeitos (Billon, Monteiro, e Dani 2008; Algire, Medrikova, e Herzig 2012; L. Chen et al. 2014; Yan et al. 2014; Young e Schäfer 2014).

O TA é considerado um tipo de tecido conjuntivo e é constituído principalmente por células denominadas adipócitos, separadas entre si por pequena

quantidade de matriz extracelular que é constituída, em grande parte, por uma rede de delgadas fibras reticulares formadas principalmente por colágeno tipo III e pouco observáveis ao microscópio de luz com colorações rotineiras. Além dos adipócitos, são encontradas quantidades menores de outras células residentes e transientes do tecido conjuntivo. O TA se localiza, principalmente, em baixo da pele, ou seja, na região subcutânea. Também podemos encontrar o tecido adiposo envolvendo alguns órgãos como, por exemplo, o coração e os rins. O TA é importante como reserva de energia. Além da reserva de energia, o tecido adiposo localizado logo abaixo da pele também apresenta um papel estrutural significativo, influenciando nas formas e contornos do corpo e atua ainda como um verdadeiro amortecedor de impacto, como nas plantas dos pés e nas palmas das mãos. Como as gorduras não são boas condutoras de calor, o TA também exerce função como isolante térmico do organismo. Além disso, se torna cada vez relevante a função endócrina do TA, fazendo dele um importante órgão na produção de hormônios e citocinas (Astori et al. 2007; Vázquez-Vela, Torres, e Tovar 2008; Algire, Medrikova, e Herzig 2012; Mizuno, Tobita, e Uysal 2012; L. Chen et al. 2014; Restelli et al. 2015; Nosavanh et al. 2015; Minteer, Marra, e Rubin 2015).

Os adipócitos se caracterizam por acumular lipídios em seu citoplasma, sob forma de pequenas gotas suspensas no citosol. Estas gotas não são revestidas por membranas e são, portanto, consideradas inclusões. Estes lipídios são em sua maior parte triglicerídios, também chamados gorduras neutras, formados por moléculas de glicerol unidas por ligações éster às cadeias de ácidos graxos. O número e tamanho das gotas de lipídios nos adipócitos pode variar

consideravelmente. Quando os adipócitos se desenvolvem, acumulam lipídios e há numerosas pequenas gotas deste material no citoplasma (Astori et al. 2007; Vázquez-Vela, Torres, e Tovar 2008; Algire, Medrikova, e Herzig 2012; Mizuno, Tobita, e Uysal 2012; L. Chen et al. 2014; Restelli et al. 2015; Minter, Marra, e Rubin 2015).

O TA pode ser classificado nos seres vivos em **Tecido Adiposo Branco** (TAB) e em **Tecido Adiposo Marrom** (TAM), conforme descrito abaixo (Farmer 2006; Farmer 2008; Cristancho e Lazar 2011; Algire, Medrikova, e Herzig 2012).

Tecido Adiposo Branco

O tecido adiposo branco também é conhecido como **unilocular**, pois suas células apresentam forma de esfera, tendo em seu interior uma grande quantidade de lipídios, distribuído em uma única “gota”, fazendo com que o núcleo se apresente achatado e, como o citoplasma, deslocado do centro. Ou seja, as organelas ficam concentradas no citoplasma perinuclear. Apresenta um pequeno aparelho de Golgi, alguns ribossomos, retículo endoplasmático rugoso e filamentos intermediários e também podem ser visualizadas mitocôndrias compridas (Farmer 2006; Farmer 2008; Cristancho e Lazar 2011; Algire, Medrikova, e Herzig 2012).

As principais funções do TAB são servirem de reserva energética, de isolante térmico e de proteção contra choques dos órgãos vitais. Ele forma o pânículo adiposo, que é uma camada isolante que se localiza abaixo da derme da pele e pode ser ainda mais espesso em indivíduos que vivem em climas árticos. O TAB

também se localiza em maior quantidade sob a pele do abdome (em maior quantidade no omento, mesentério e no espaço retroperitoneal), nádegas, axilas, coxas e nas mamas. Ele também é encontrado na medula óssea e entre outros tecidos, preenchendo os espaços vazios. Podemos ainda encontrá-lo na planta dos pés, nas palmas das mãos, sob o pericárdio visceral e envolvendo os globos oculares (nesses locais ele tem função amortecedora de impactos). Esse tecido começa a se desenvolver no embrião por volta da metade da vida uterina. Os adipócitos uniloculares são grandes e com a gotícula de lipídio sem membrana em sua volta (Farmer 2006; Farmer 2008; Cristancho e Lazar 2011; Algire, Medrikova, e Herzig 2012).

Esse tecido é bastante irrigado por vasos sanguíneos, apesar de ter um menor número de vasos sanguíneos quando é comparado com o TAM. Além disso, os depósitos de TAB ficam aumentados em tamanho durante a obesidade, tornando-os ainda menos vascularizado nesta situação (Goossens 2008). Em torno das células está uma vasta rede de fibras reticulares, que dão sustentação à massa gordurosa (Farmer 2006; Farmer 2008; Cristancho e Lazar 2011; Algire, Medrikova, e Herzig 2012).

O nome de tecido adiposo branco vem da coloração, que está entre o branco e o amarelo-escuro, que pode variar dependendo da alimentação do indivíduo. O TAB é predominante na maioria das espécies e tem como principal função o armazenamento de energia na forma de triglicérido e de secretar hormônios e citocinas (adipocinas), cuja função principal é atuar na regulação do balanço energético; afetando diversos tecidos, especialmente o cérebro, os músculos e o

fígado (Farmer 2006; Farmer 2008; Cristancho e Lazar 2011; Algire, Medrikova, e Herzig 2012).

Tecido Adiposo Marrom

As células desse tecido são menores que as do TAB, pois em vez de uma grande “gota” de gordura, é constituída por diversas gotículas (vacúolos) de lipídios, que se espalham por todo o citoplasma e por conta disso, também são conhecidas como **multiloculares**. São ricas em mitocôndrias, organelas que produzem energia e conseqüentemente calor. Estas células têm núcleos de perfil circular e ocupam diferentes locais da célula, às vezes excêntrico (fora do centro), às vezes central. Como já mencionado, no seu citoplasma pode ser encontrado muitas “vesículas” claras, de perfil circular e de tamanhos variados contendo gotas de gordura de tamanho variado (Cannon e Nedergaard 2004; Cinti 2006; Farmer 2006; Farmer 2008; Mattson 2010; Cristancho e Lazar 2011; Algire, Medrikova, e Herzig 2012).

Os animais hibernantes têm bastante desse tipo de tecido, pois o calor produzido nele manterá a temperatura do corpo em períodos longos de frio. Nesses animais, durante a hibernação, o sangue que fica na rede de vasos sanguíneos dentro desse tecido se aquece, sendo enviado para outras partes do corpo na hora do despertar para o verão, fazendo o organismo voltar a funcionar completamente (Nelson, Otis, e Carey 2009; Weitten et al. 2013).

A principal função de TAM é a geração de calor (termogênese). Isso é particularmente importante em recém-nascidos para protegê-los no nascimento,

diante de uma possível exposição a um ambiente frio nas primeiras horas de vida. É um tecido que só é formado enquanto o bebê está no ventre, não sendo mais produzido na vida pós-natal. Os depósitos corporais de TAM diminuem significativamente em tamanho com o desenvolver da maturidade nos humanos, existindo nos adultos somente em pequenas quantidades distribuídas pelo corpo e, às vezes, em pequenas porções distribuídas em meio aos depósitos de TAB (Friedenstein et al. 1974; Cannon e Nedergaard 2004; Farmer 2008; Cristancho e Lazar 2011; Nosavanh et al. 2015; Restelli et al. 2015).

O TAM está distribuído nos pequenos mamíferos em localizações distintas e é inervado pelo Sistema Nervoso Simpático (SNS) e possui um sistema circulatório bem desenvolvido, constituído por uma densa rede de microvasculatura (Cannon e Nedergaard 2004). Essa característica é particularmente importante, fazendo com que em condições de exposição ao frio, a produção de calor seja facilitada pela estimulação do SNS, que atua promovendo a liberação de catecolaminas que, por sua vez, ativa a termogênese (Farmer 2008; Nosavanh et al. 2015; Restelli et al. 2015).

Adipócitos marrons também produzem outras proteínas que são produzidas apenas modestamente por células de TAB, incluindo proteínas mitocondriais envolvidas na oxidação de lipídios e no transporte de elétrons (Engeli, Negrel, e Sharma 2000; Cannon e Nedergaard 2004; Cristancho e Lazar 2011; Algire, Medrikova, e Herzig 2012).

A distribuição do calor gerado também é facilitada pela presença dessa grande quantidade de vasos no TAM. O calor é gerado através da oxidação dos lipídeos que estão estocados no interior dos adipócitos marrons, cujo processo é facilitado pela presença de um grande número de mitocôndrias nestes adipócitos. Adicionalmente, esses adipócitos expressam proteína de desacoplamento-1 (UCP-1, termogenina), que atua como transportador de prótons, desacoplando o transporte de elétrons na produção de Trifosfato de Adenosina (ATP), permitindo que a energia seja dissipada na forma de calor. A proteína UCP-1 é expressa exclusivamente nos adipócitos marrons e quando encontrada em baixos níveis em TAB, pode ser atribuída à presença de adipócitos marrons misturados em meio aos depósitos de TAB (Farmer 2008; Cristancho e Lazar 2011; Nosavanh et al. 2015; Restelli et al. 2015).

Por outro lado, o TAM produz uma quantidade bem menor de certos hormônios e citocinas que são largamente produzidas por células do TAB. Estes incluem proteínas que estão associadas às patologias relacionadas com a obesidade; como por exemplo, a resistina, que contribui clinicamente para a síndrome de resistência à insulina e alteração do eixo renina-angiotensina-aldosterona (figura 4) que pode contribuir para quadros de hipertensão arterial, inclusive por ação parácrina dessas células, o que mostra o caráter endócrino do TAM (Engeli, Negrel, e Sharma 2000; Stepan et al. 2001; Sanjuliani et al. 2011; Rao, Pandya, e Whaley-Connell 2015).

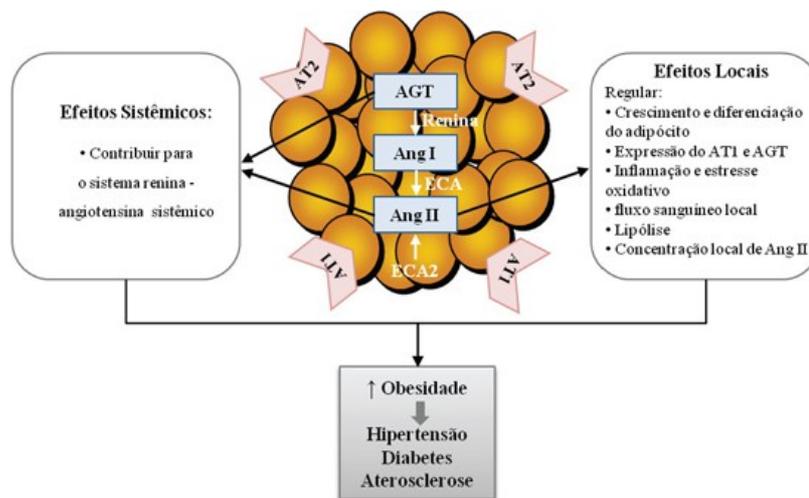


Figura 4: Esquema representando o modelo fisiológico e fisiopatológico do sistema renina-angiotensina no tecido adiposo. (AGT) angiotensinogênio; (ang I), angiotensina I; (Ang II), angiotensina II; (ECA), enzima conversora da angiotensina; (AT), receptor para angiotensina. O tecido adiposo marrom apresenta funções endócrinas importantes, com atuações tanto local quanto sistêmicas (Sanjuliani et al. 2011).

Conforme mencionado anteriormente, o TAM é altamente vascularizado e contém uma grande quantidade de pequenos capilares que permeiam o tecido para atingir individualmente os adipócitos marrons. É possível que o denso leito capilar presente no TAM seja o resultado de uma grande produção de fatores angiogênicos encontrados nesse tecido (Farmer 2008; Cristancho e Lazar 2011).

Formação do Tecido Adiposo

O tecido adiposo é considerado ser de origem mesoderma, como também são da mesma origem: o músculo, a cartilagem e os ossos. É assumido que o mesênquima produz uma população de progenitores comuns que se desenvolve em adipócito branco ou marrom em resposta a efetores tecidos específicos. No entanto, o estudo do desenvolvimento do TAM e do TAB sugere que eles são tecidos bem

distintos entre si, além de, possivelmente, serem também de origem diferente. Cronologicamente, o TAM evoluiu mais tardiamente que o TAB e possivelmente essa evolução aconteceu em paralelo com a evolução da termogênese e do desenvolvimento do sistema de autorregulação da temperatura em pássaros e mamíferos; embora seja sabido que a gordura também pode ser estocada na forma de TAB em peixes e anfíbios, nos quais se admite serem ausentes de TAM (Gesta, Tseng, e Kahn 2007; Cristancho e Lazar 2011; Nosavanh et al. 2015; Restelli et al. 2015).

Apesar de TAM e TAB diferirem-se consideravelmente em função e em morfologia, mesmo compartilhando um progenitor comum (ambos os TAs originam-se das CTMs), acredita-se que o TAM, diferentemente de TAB, seja derivado de uma linhagem miogênica, que pode ser caracterizada pela expressão de Fator Miogênico 5 (Myf5)³ (Timmons et al. 2007; Cristancho e Lazar 2011; Algire, Medrikova, e Herzig 2012).

A figura 5 mostra um esquema de formação de TA.

³ Myf5 é uma proteína pertencente a família de proteínas responsáveis pela regulação da miogênese (Sabourin e Rudnicki 2000).

Formação do tecido adiposo

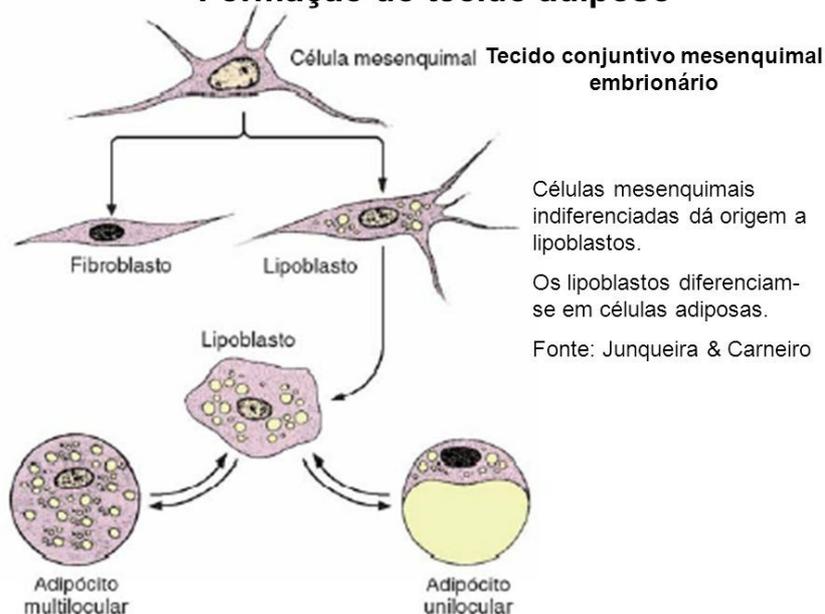


Figura 5: Figura mostrando um esquema representativo da formação do tecido adiposo. Neste esquema, células mesenquimais indiferenciadas dão origem a lipoblastos e estes se diferenciam em células adiposas, tanto brancas quanto marrons. Porém alguns autores acreditam que as células adiposas marrons tenham uma origem não comum às células adiposas brancas (Timmons et al. 2007). Fonte: Junqueira & Carneiro, Sétima Edição.

O TAB é encontrado em vários depósitos distribuídos pelo corpo e sua localização varia bastante entre as espécies. Em mamíferos e aves, a maior concentração de TAB está na região intra-abdominal e subcutânea, mas também pode ser encontrado em outras áreas do corpo: como na face, nas extremidades e dentro de ossos que contenham a medula óssea, como já foi discutido (Rosen e MacDougald 2006; Gesta, Tseng, e Kahn 2007; Billon, Monteiro, e Dani 2008; Vázquez-Vela, Torres, e Tovar 2008).

Cabe ressaltar que os diferentes depósitos podem não ser necessariamente equivalentes do ponto de vista metabólico. Por exemplo, o TA presente nos seios (mamas) e nas coxas das fêmeas responde aos hormônios sexuais, enquanto os

depósitos encontrados no pescoço e na parte superior das costas são mais sensíveis aos glicocorticoides (Rosen e MacDougald 2006; Gesta, Tseng, e Kahn 2007; Billon, Monteiro, e Dani 2008).

Da mesma forma que o TA presente em diferentes órgãos pode se comportar de forma, também difere a expressão gênica nesses tecidos por estar em locais distintos (Gesta, Tseng, e Kahn 2007; Billon, Monteiro, e Dani 2008). Estas distintas propriedades moleculares e fisiológicas podem explicar parcialmente o porquê de que as variações na distribuição de TAB pelo corpo podem estar associadas com alguns distúrbios metabólicos (Billon, Monteiro, e Dani 2008; Algire, Medrikova, e Herzig 2012). Por exemplo, alguns estudos afirmam que esse fato explica o porquê de encontrarmos uma maior incidência de riscos de doenças cardiovasculares em pacientes que apresentam uma maior proporção de TAB visceral em relação a subcutânea (Billon, Monteiro, e Dani 2008).

O TAM surge durante o desenvolvimento fetal significativamente antes do TAB, atingindo o máximo do tamanho na ocasião do nascimento, enquanto o desenvolvimento do TAB inicia-se somente na metade da gestação (em humanos) ou até mesmo, brevemente após o nascimento (em roedores) e gradualmente vai aumentando em tamanho ao longo da vida (Cristancho e Lazar 2011; Restelli et al. 2015). De fato, alguns investigadores consideram a possibilidade de que adipócitos marrons se originam de uma separada e diferente população de progenitores das que originam os adipócitos brancos. Conforme já mencionado anteriormente, foi reportado que as células de TAM possuem uma “assinatura miogênica”, sugerindo que elas compartilham uma origem mesenquimal comum às células musculares;

tecido este, que também tem a capacidade de degradar lipídios para a produção de energia (Timmons et al. 2007; Algire, Medrikova, e Herzig 2012).

A diferenciação de pré adipócitos em adipócitos adultos (tanto os marrons, quanto os brancos) parece seguir vias comuns de transcrição gênica, compartilhando alguns processos, que independem do tipo de TA adulto que se formará. Processos como a lipogênese e o transporte de glucose dependente de insulina são exemplos desse fato, com alguns estudos identificando uma cascada de fatores adipogênicos que regulam a lipogênese em ambos os tipos de adipócitos (Farmer 2006; Rosen e MacDougald 2006; Gesta, Tseng, e Kahn 2007; Cristancho e Lazar 2011). Os mais notáveis desses fatores são a “*Peroxisome proliferator-activated receptor γ* ” (PPAR γ) e o “*CCAAT-enhancer-binding protein α* ” (C/EBP α) que são geralmente considerados reguladores mestres do processo de diferenciação, apontando PPAR γ como indispensável para a formação de adipócitos brancos e marrons. A ausência de C/EBP α em camundongos impede o desenvolvimento de TAB, mas tem um efeito bem limitado no desenvolvimento de TAM. A função de PPAR γ é induzir a expressão de vários genes envolvidos no metabolismo de lipídios e glucose, incluindo biogêneses mitocondriais e secreção de adipocinas. A função de C/EBP α é manter a produção de PPAR γ e regular um grupo de genes nos adipócitos que controlam alguns processos importantes como a secreção de adiponectina e a entrada de glucose dependente de insulina (Farmer 2006; Rosen e MacDougald 2006; Gesta, Tseng, e Kahn 2007; Cristancho e Lazar 2011).

Tecido Adiposo como fonte de estudo para o desenvolvimento de terapias celulares

Recentes estudos apontam que as células derivadas do tecido adiposo (CDTA) podem ter importância, quando utilizadas em terapias celulares, por se apresentarem abundantemente distribuídas pelo corpo (Strem et al. 2005; Mizuno, Tobita, e Uysal 2012; Yan et al. 2014; Young e Schäfer 2014; L. Chen et al. 2014).

Foi demonstrado em ensaios que avaliam a quantidade de Unidade Formadora de Colonia (CFU-F)⁴ que as CDTAs produzem números bem maiores de colônias, quando comparadas com os encontrados com as CTMs. Nesse tipo de ensaio, as CDTAs foram capazes de produzirem 5000 (cinco mil) CFU-F por grama de TA, enquanto as CTMs foram capazes de modestos 100 à 1000 CFU-F por mililitros de medula óssea (Strem et al. 2005).

No entanto, não é somente pela possibilidade de se obter grandes quantidades de células que torna o TA um promissor fornecedor de células para o emprego em terapias celulares. Aliado a essa característica, outras se somam como a possibilidade de se diferenciarem em diversos tecidos diferentes, grande rapidez em expandirem em cultura e ainda o grande poder de angiogênese que tais células possuem, conforme será brevemente descrito nos parágrafos seguintes (L. Chen et al. 2014; Young e Schäfer 2014; Sousa et al. 2014). De fato, As CDTAs possuem uma plasticidade considerável, conforme já mencionado ao longo desse trabalho. Alguns

⁴ Neste tipo de ensaio as células são plaqueadas em meio de cultura na quantidade de aproximadamente 1000 células por centímetro quadrado (células/cm²). São deixadas em cultura por duas ou três semanas. No final desse tempo, aquelas colônias que sejam compostas por 50 ou mais células são contadas e consideradas para o cálculo (Strem et al. 2005).

trabalhos vêm demonstrando essa importante propriedade tanto “in vitro” quanto “in vivo”, conforme será discutido mais adiante.

Adipogênese: As CDTAs não se diferenciam em TA adiposo espontaneamente quando em meio de cultura. Por outro lado, quando colocadas em meio adipogênico, elas se diferenciam em adipócitos facilmente, exibindo marcadores clássicos para esta linhagem; tais como: Lipase, “*Peroxisome proliferator-activated receptor γ* ” (PPAR γ), Leptina, GLUT4 (do inglês, “*Glucose transporter type 4*”) e desenvolvem vacúolos intracelulares contendo lipídios, que podem ser facilmente evidenciados pela coloração de “Red Oil O” (Strem et al. 2005).

A diferenciação em adipócitos “in vitro” pode ser conseguido de forma relativamente fácil usando meios de cultura constituído de: DMEM enriquecido com 10,0 % de soro fetal bovino (FBS), 0,5 mM (meio Milimolar) de isobutila-metilxantina (IBMX), 1,0 μ M (um Micromolar) de dexametasona, 10,0 μ M (dez) de insulina, 200,0 μ M (duzentos) de indometacina e 1,0 % (um) de antibiótico e antimicótico (Patricia A Zuk et al. 2002).

Cardiogênese: Recentemente foi evidenciado a possibilidade de diferenciação das CDTAs em células cardíacas “in vitro” com o uso de bmp-4 (“Bone morphogenic protein-4”). Porém, a indução por bmp-4 não resultou em células cardíacas completamente estruturadas (Khaleghi et al. 2014).

A diferenciação de CDTA em cardiomiócito “in vivo” foi relatado em alguns trabalhos. Foi evidenciado melhoras na função cardíaca no IAM e encontrado células diferenciadas em cardiomiócitos depois de injetadas na borda da lesão. O resultado foi demonstrado tanto com a utilização de células a fresco, quanto com células em cultura. Foi evidenciado também a melhora da função cardíaca pelo de criação de novos vasos com esse tratamento. As células injetadas permaneceram no local da lesão por mais de quatro meses (Sánchez et al. 2010).

Osteogênese: A diferenciação em osteócitos também pode ser conseguido utilizando-se de meios de cultura específicos, como os formados por DMEM enriquecido com 10,0 % de FBS, adicionados com 0,01 μM de 1,25-Vitamina D⁵, 50,0 μM de Vitamina C (ácido ascórbico), 10,0 mM de β -glicerofosfato e 1,0 % de antibióticos/antimicóticos. Neste tipo de meio, é possível verificar a mineralização com três semanas de cultura. A osteogênese pode ser confirmada pela expressão de uma série de genes, tais como: OC (osteocalcina), CBFA-1 (“*core-binding factor alpha 1*”), FA (fosfatase alcalina), ON (osteonectina) e “*bone morphogenic protein-2*” (BMP-2); além de receptores que estão intimamente ligados a osteogênese, como é o caso do Receptor para o Hormônio Paratormônio (PTHrP). A Expressão de CBFA-1, um fator de transcrição que se liga aos promotores de vários genes osteogênicos, foi observada em todo o processo de diferenciação (Patricia A Zuk et al. 2002) e Experimentalmente, também foi demonstrado formação de ossos “in vivo”, utilizando as CDTA (Peterson et al. 2014) .

5 Neste caso, A vitamina D também pode ser substituída por 0,1 μM de dexametasona para obtenção do mesmo resultado.

Condrogênese: As CDTAs podem ser cultivadas em meio de cultura composto por DMEM, enriquecido com 1,0 % de FBS, 6,25 µg/mL (micrograma por mililitro) de insulina, 10,0 ng/mL (nanograma por mililitro) de TGFβ-1 (“*Transforming Growth Factor Beta 1*”), 50,0 nM de ácido ascórbico e 1,0 % de antibiótico/antimicótico produzindo condrócitos “in vitro” (Patricia A Zuk et al. 2002). Experimentalmente também foi possível a produção de cartilagem “in vivo” (Murata et al. 2015).

Neurogênese: Também foi verificado que é possível induzir a neurogênese a partir das CDTAs, cultivando-as em um meio de cultura composto de DMEM, adicionado com cerca de 5,0 mM a 10,0 mM de β-Mercaptoetanol (Patricia A Zuk et al. 2002). Trabalhos recentes também têm atribuídos ao Ácido Valproico a capacidade de induzir neurogênese em CDTAs de cão “in vitro” (Kurihara et al. 2013) e a adição de ocitocina em culturas de CDTAs de camundongos também promove a indução de neurogêneses nessas células (Jafarzadeh et al. 2014). Alguns estudos em camundongos sugerem que transplantes de CDTAs podem ser benéficas no tratamento da doença de Alzheimer num futuro próximo (Yan et al. 2014).

Considerando as características que essas células possuem, ou seja, grande poder de expansão, fácil manipulação, plasticidade, poder de neovascularização, possibilidade de efeitos parácrinos e, ainda, pela possibilidade de ser uma terapia com transplante de células autólogas, o que não provocaria rejeição e nem obrigaria o transplantado a receber drogas imunossupressoras pelo resto da vida, poder ser uma alternativa para terapia celular e isso que avaliamos nesse trabalho.

Objetivos

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar as possíveis vias e a janela terapêutico na utilização das células derivadas do tecido adiposo no infarto agudo do miocárdio em ratos.

2.2 Objetivos Específicos

- Observar duas vias de administração das células no tratamento do infarto agudo experimental do miocárdio em ratos: injeção direta na periferia da área infartada e a injeção das CDTAs diretamente na circulação venosa periférica.
- Investigar o perfil eletrocardiográfico dos grupos experimentais ao longo do tempo.
- Comparar as alterações estruturais e funcionais dos grupos experimentais por ecocardiografia.

Materials & Métodos

3. Materiais e Métodos

3.1 Animais

Durante os experimentos foram utilizados ratos Wistar, fêmeas, de uma linhagem consanguínea, oriundas e mantidas pela reprodução de matrizes no próprio biotério do laboratório e pesando na ocasião das cirurgias $200,0 \pm 27,0$ gramas de peso vivo. Antes e durante todo o tempo dos experimentos, os animais ficaram no biotério do Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular da UFRJ, onde foram hospedados em estantes microisoladoras (Alesco®), com temperatura controlada entre 19 a 23 ° C, com umidade relativa do ar de 55% +- 15% e com períodos alternados e regulares de luz e escuridão (12 horas dia/noite), alojados em caixas adequadas com no máximo três animais por caixa e tendo água e alimento disponível à vontade. Toda manipulação destes animais foi realizada em cabine de fluxo laminar.

Todos os experimentos foram realizados em conformidade com a Comissão de Ética com Animais em Experimentação Científica (Centro de Ciências em Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro) intitulado **“Terapia Celular em Modelos Murinos em Infarto do Miocárdio”**, aprovado sobre o número de referência **IBCCF 026**.

3.2 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em grupos experimentais de acordo com a via de administração utilizada e os tipos celulares administrados. Assim, foi criado um grupo com animais que recebeu o tratamento com células nas 24 (vinte e quatro) horas seguintes à cirurgia para produção de infarto do miocárdio (na fase aguda do infarto) por injeção de aproximadamente $1,0 \times 10^{07}$ de células na borda da região infartada (Grupo T1), um grupo que recebeu a mesma quantidade de células por via endovenosa, através de injeção na veia da cauda (Grupo T2). Foi criado também um grupo que recebeu solução salina por essas vias, em vez de células. Além desses animais que não receberam nenhum tratamento (salina), os próprios animais serviram de controle, pois foram avaliados antes da realização dos procedimentos.

Em todos os grupos, os animais foram submetidos aos exames eletrocardiográficos (ECG) nos tempos 1 (um), 7 (sete) e 28 (vinte e oito) dias pós-infarto e também minutos antes da cirurgia de realização dos infartos. Todos os animais também foram submetidos aos exames ecocardiográficos (ECO) nos mesmos tempos citados, nos permitindo acompanhar evolutiva e sequencialmente toda a progressão do quadro clínico dos animais.

Todos os exames foram realizados com o emprego do mesmo protocolo anestésico utilizado nas cirurgias (Descrito no Capítulo 3.3). E todas as escolhas dos animais, distribuição entre os grupos e exames foram realizadas de forma duplo cego.

Após o término dos experimentos os animais foram eutanasiados. Os seus pulmões, o fígado e o coração foram pesados; sendo este último, colocado e conservado em uma solução de paraformaldeído a 10,0 % para posterior exame histopatológico. Um grupo adicional, com animais normais foi criado para que os órgão citados fossem pesados e serviu de controle para os demais grupos.

3.3 Realização dos Infartos

O protocolo anestésico utilizado em todos os procedimentos foi uma combinação das drogas Cloridrato de Xilazina (Rompum®) na dose de 5,0 mg/kg e Cloridrato de Quetamina (Dopalen®) na dose de 50,0 mg/kg, ambas misturadas na mesma seringa e aplicadas por via intraperitoneal (IP). O mesmo protocolo anestésico foi empregado em todas as ocasiões onde foi necessária a contenção dos animais e também na realização de todos os exames; garantindo, desta forma, a uniformidade nas avaliações.

A técnica cirúrgica utilizada foi descrita primeiramente na década de 50 e, posteriormente, modificada e atualizada (Johns e Olson 1954; Selye et al. 1960; Ellis, Doumanian, e Plun 1962; Fishbein, Maclean, e Maroko 1978a; Mill et al. 1990). Desta maneira, uma vez que os animais entravam em plano anestésico, eram fixados em uma mesa cirúrgica em decúbito dorsal e então era realizada a tricotomia e a assepsia do hemitórax esquerdo com uma solução de álcool iodado. Era realizada então uma incisão para esternal esquerda de aproximadamente 1,0 (um) centímetro de comprimento, localizada à 1,0 (um) centímetro da linha esternal média, na junção dos terços inferior e médio da distância entre a clavícula e o

rebordo costal. Prosseguiu-se com a dissecação da pele e dos músculos grande e pequeno peitoral para facilitação do acesso e visualização da caixa torácica. A partir deste momento, era iniciada uma ventilação artificial forçada através de um pequeno ambu de fabricação artesanal, que era mantida até a pronta recuperação do animal (respiração espontânea). Procurava-se, então, o melhor local para a abertura do tórax através da visualização do choque entre o coração e a parede torácica (geralmente no 4º ou 5º espaço intercostal). Neste ponto do procedimento, o tórax era aberto e, uma vez perfurado, procurava-se expor o coração através de uma compressão manual do abdome e do hemitórax direito. Procedia-se, então, a localização da artéria coronária descendente anterior (geralmente encontrada sob a aurícula esquerda) e realizava-se a sua ligadura permanente através de um fio de sutura de Seda ou Nylon 6-0 (com nó duplo), o mais próximo possível de sua origem na aorta. Em seguida, o coração era reconduzido à sua posição anatômica apropriada e o tórax era fechado em um único plano, englobando os músculos e a pele do local com uma sutura em bolsa, utilizando fios de Nylon 3-0 ou 4-0. Antes que fosse dado o aperto final do nó, selando a cavidade torácica, forçava-se a expansão pulmonar através da utilização do ambu, garantindo-se com este simples procedimento, um melhor e mais rápido restabelecimento da pressão negativa intratorácica, melhorando significativamente o índice de sobrevivência dos animais no pós-cirúrgico. A **Figura 6** mostra uma gravura do procedimento.

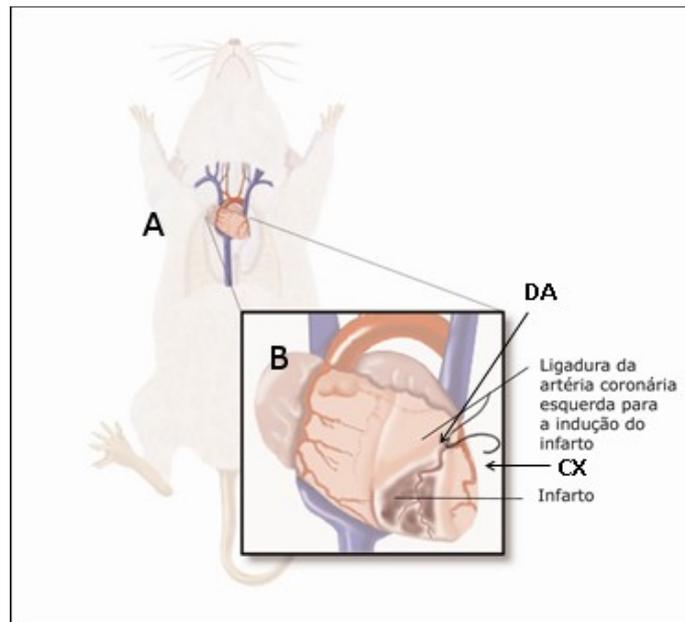


Figura 6: Em **A)** Desenho representativo do procedimento para a realização do infarto do miocárdio experimental em ratos. Em **B)** detalhes do procedimento: com um fio cirúrgico procura-se fazer uma ligadura no ramo descendente da artéria coronária (DA), tomando-se o cuidado para não atingir o ramo circunflexo (CX). (Modificado de Terese Winsiow & Lydia Kibiuk, NHI - Junho 2001).

Após a cirurgia os animais foram submetidos ao eletrocardiograma (ECG) e ao ecocardiograma (ECO) para constatação do infarto; avaliação da progressão do infarto e/ou evolução dos tratamentos administrados de acordo com critérios já estabelecidos na literatura (Miranda et al. 2007; Saraiva et al. 2007).

Quando os animais começavam a se recuperar da anestesia eram reconduzidos às suas caixas, onde eram mantidos com água e dieta normal *ad libitum*. O processo de cicatrização era acompanhado regularmente, sendo o mesmo geralmente rápido e sem intercorrências.

3.4 Registro do Eletrocardiograma

O registro eletrocardiográfico foi realizado com um eletrocardiógrafo convencional (Cardimax FX-2111 – Fukuda Denshi), sendo os eletrodos conectados a fios desencapados adaptados, cuja outra extremidade era soldada nas agulhas de aço inoxidável que eram inseridas subcutaneamente no animal. Com este artifício se conseguia contatos elétricos perfeitos, resultando em registros eletrocardiográficos limpos e livres de interferências.

Foram obtidas as derivações clássicas no plano frontal (D_1 , D_2 e D_3) e unipolares aumentadas (A_{VR} , A_{VL} , A_{VF}) a partir de potenciais captados nas ante patas direita e esquerda e também na coxa esquerda. O eletrodo “terra” era conectado à coxa direita do animal e o aparelho estava convenientemente “aterrado”, através de instalação elétrica adequada.

Os registros foram realizados na velocidade de 50,0 mm/s, que foi considerada a velocidade padrão para os registros eletrocardiográficos dos animais neste estudo. A calibração de voltagem para os registros foi de 20,0 mm = 1,0 mV.

Os animais foram submetidos ao protocolo anestésico citado na seção referente ao procedimento cirúrgico (página 63) e tão logo entravam em plano cirúrgico adequado eram fixados a uma pequena mesa de madeira na posição supina e conectados aos eletrodos. Esse procedimento sempre precedeu o exame ecocardiográfico e procurou-se sempre a colocação dos eletrodos nas mesmas posições; assim como, o mesmo posicionamento dos animais, visando garantir a

uniformidade dos registros durante todos os experimentos. Como já comentado, os ECGs eram realizados no tempo imediatamente anterior ao procedimento cirúrgico (tempo zero) e também nos tempos 1 (um), 7 (sete) e 28 (vinte e oito) dias após a cirurgia.

Procurou-se medir todos os aspectos importantes de um eletrocardiograma, ou seja: a amplitude e duração da “Onda P”, a duração do “Intervalo PR”, duração do “Complexo QRS”, a amplitude e duração da “Onda T” e a duração do “Intervalo QT”. As medidas eram feitas, sempre que possível, na derivação D₂. As amplitudes das “Ondas Q”, “R” e “S” eram realizadas nas derivações D₁, D₂ e D₃ e a partir delas, puderam ser calculados o Índice *do* “QRS” de cada uma dessas derivações e o Índice *de* “QRS” *Total* (IQRS).

Entende-se como índice de “QRS” da derivação; a soma em módulo das amplitudes das Ondas “Q”, “R” e “S” na referida derivação. Enquanto o IQRS correspondeu à soma algébrica dos Índices de “QRS” obtidos nas derivações D₁, D₂ e D₃.

Com o eletrocardiograma também foi possível medir o Eixo de Despolarização Ventricular Médio no Plano Frontal (AQRS) que pode ser calculado a partir das relações trigonométricas, utilizando-se das derivações D₁ e A_{VF}. Para tanto, foram utilizadas as seguintes fórmulas:

- Para ângulos compreendidos entre 0 e 90 Graus:

$$\text{AQRS (Graus)} = \arctan \frac{\text{AVF}}{\text{DI}}$$

- Para ângulos compreendidos entre 90 e 180 Graus:

$$\text{AQRS (Graus)} = \arctan \frac{\text{DI}}{\text{AVF}}$$

Na **Figura 7** observa-se a correspondência entre a posição dos eletrodos, as derivações no ECG e o correspondente ângulo, utilizados nos cálculos.

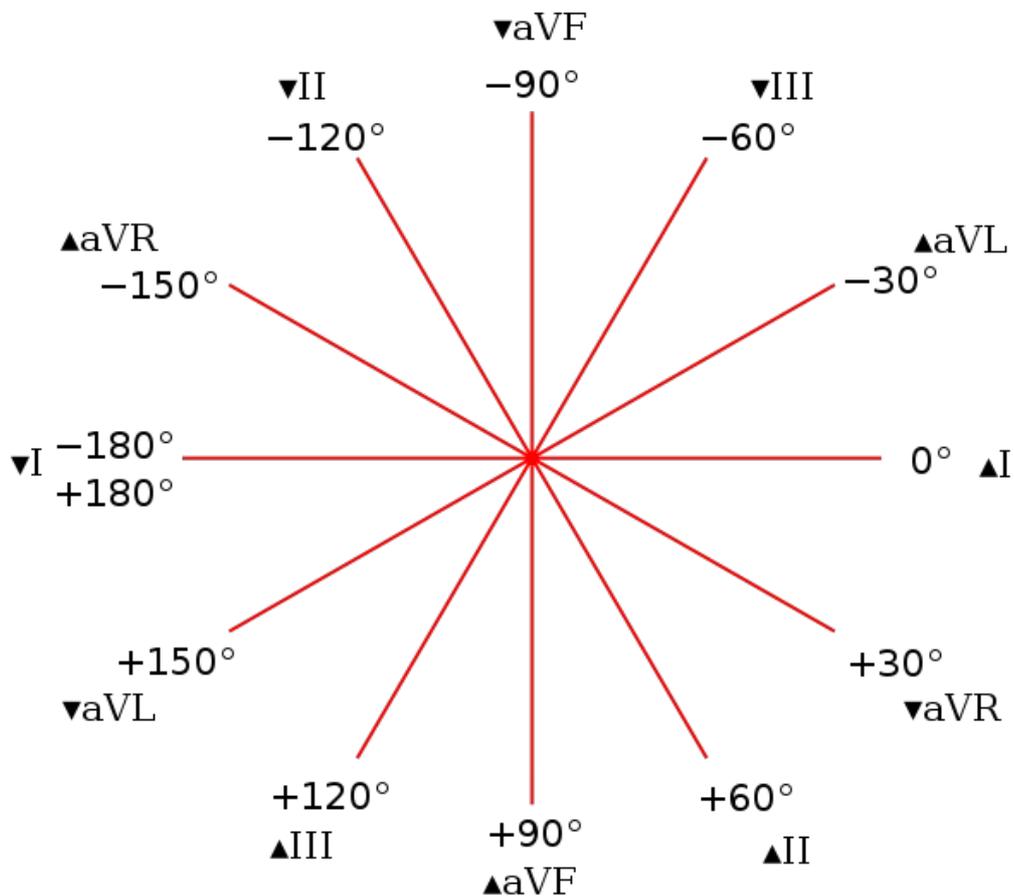


Figura 7: Figura exemplificando a correspondência entre as posições dos eletrodos no ECG, as derivações obtidas e usadas no cálculo do AQRS. A interseção das linhas equivale eletricamente ao posicionamento do coração. Uma vez obtido os valores em cada derivação, é possível calcular o valor do ângulo de despolarização ventricular médio com as fórmulas apresentadas no texto, além de possibilitar a determinação em que quadrante esse ângulo está posicionado.

3.5 Exames Ecocardiográficos

A ecocardiografia como ferramenta diagnóstica tem sido utilizada em ratos e se mostrado bastante útil em experimentos envolvendo animais submetidos a cirurgia experimental de IM (de Simone et al. 1990). Trabalhos posteriores, associado aos já citados, constituem referências no estudo da progressão do infarto do miocárdio e na avaliação de possíveis respostas aos tratamentos efetuados nestes animais (Litwin et al. 1994; Litwin et al. 1996; E. Olivares et al. 2004; Werneck-de-Castro et al. 2006; Miranda et al. 2007; E. L. Olivares et al. 2007).

Os animais previamente identificados foram entregues ao responsável pela realização do ECO, sem que o mesmo soubesse a que grupo eles pertenciam, se receberiam ou não tratamento ou em que fase do infarto se encontravam. Assim, todos os exames foram realizados pelo mesmo e experiente profissional nas diversas etapas do trabalho de forma completamente cega. Em todos os animais, os exames foram realizados antes da cirurgia e nos tempos 1 (um), 7 (sete) e 28 (vinte e oito) dias após a cirurgia realizada para produção dos IM.

Inicialmente, era realizada a anestesia com o protocolo anestésico já descrito na página 61, seguido pela tricotomia da região torácica. Os animais eram então colocados em decúbito lateral esquerdo ou em decúbito dorsal.

Os exames foram realizados em um equipamento comercialmente disponível (Caris—Esaote®) que permite a obtenção de imagens nos modos uni e

bidimensional, análise das velocidades de fluxo pelas técnicas de *Doppler*, além do mapeamento de fluxo em cores. Os transdutores utilizados nos exames foram do tipo eletrônico e setorial de 10,0 MHz (dez Mega-hertz).

Os cortes ecocardiográficos foram obtidos seguindo a nomenclatura descrita pela Sociedade Americana de Ecocardiografia (ASE). O animal era colocado em decúbito dorsal ou lateral esquerdo e as imagens longitudinais, transversais e apicais foram sequencialmente obtidas e gravadas em mídias digitais. Posteriormente, foram realizadas as análises e a digitalização das imagens e dos vídeos representativos dos exames de cada animal.

Como citado anteriormente, a análise ecocardiográfica foi realizada por um único observador experiente na técnica. As medidas realizadas no Modo M e orientadas pelo modo bidimensional incluíram os seguintes parâmetros: geometria cardíaca e as medidas das funções sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo. Como já citado, todos os valores foram obtidos de acordo com o padrão da ASE.

Para a análise da anatomia cardíaca foram selecionados os seguintes parâmetros:

- Dimensão do átrio esquerdo (AE) em milímetros.
- Dimensão da aorta (AO) em milímetros.

- Relação entre o AE e AO: que pode ser obtida, dividindo-se o valor obtido do AE pelo valor da AO.
- Espessura da parede anterior do VE em diástole (PAD) e em sístole (PAS). Ambas as medidas em milímetros.
- Espessura da parede posterior do VE em diástole (PPD) e em sístole (PPS), também em milímetros.
- Espessura relativa da parede posterior (ERP): obtida pela seguinte fórmula:

$$ERP = \frac{2 \times PPD}{DDF}$$

Avaliação da Função Sistólica do Ventrículo Esquerdo

Para a análise da função sistólica dos animais foram determinados a Fração de Encurtamento do ventrículo esquerdo (FE) e a Fração de Ejeção do ventrículo esquerdo (FEM), ambas as medidas obtidas no Modo M. Também foi mensurada a Fração de Ejeção do ventrículo esquerdo pelo Método de Simpson (FES). Os cálculos desses parâmetros foram realizados automaticamente pelo aparelho, empregando as fórmulas mostradas abaixo:

- **Fração de Encurtamento:** A FE é calculada utilizando-se dos valores do Diâmetro Diastólico Final⁶ (DDF) e do Diâmetro Sistólico Final (DSF) medidas no VE, através da fórmula:

$$FE (\%) = \frac{DDF - DSF}{DDF} \times 100$$

- **Fração de Ejeção no Modo M:** Este foi outro parâmetro utilizado para avaliar a função sistólica nos experimentos. Esse parâmetro foi calculado automaticamente pelo aparelho, utilizando-se da fórmula abaixo (fórmula cúbica):

$$FEM(\%) = \frac{DDF^{03} - DSF^{03}}{DDF^{03}} \times 100$$

- **Fração de Ejeção (Pelo Método de Simpson):** Também foi medida a Fração de Ejeção pelo Método de Simpson que utiliza essencialmente os volumes planimetrados da cavidade em diástole e em sístole, mostrando-se mais adequado nos casos em que a geometria ventricular não é uniforme. Situação que é frequentemente encontrada nos animais infartados.

⁶ Para a realização das medidas, é escolhido o MAIOR diâmetro do ventrículo esquerdo ao final da diástole e o MENOR diâmetro do ventrículo esquerdo medido ao final da sístole.

Avaliação da Função Diastólica do Ventrículo Esquerdo

Para a avaliação da Função Diastólica foram utilizados os índices derivados da velocidade de Fluxo Diastólico Mitral obtidos pela técnica de *Doppler* pulsátil. Tais índices compreenderam:

- **Onda E:** Que consiste na medida do maior valor da velocidade de fluxo inicial do enchimento ventricular (cm/s).
- **Onda A:** Que consiste na medida do maior valor da velocidade de fluxo telediastólico mitral (cm/s).
- **Relação E/A:** Consiste na relação entre a velocidade máxima da “Onda E” e a velocidade máxima da “Onda A”.
- **Tempo de Desaceleração da “Onda E” (TDE):** É o tempo medido em milissegundos (ms) entre o pico da “Onda E” e o ponto em que a rampa de desaceleração intercepta a linha de base da curva de velocidade do fluxo diastólico mitral.
- **Intervalo de Relaxamento Isovolumétrico (TRIV):** É o tempo medido em milissegundos entre o valor final do fluxo sistólico na via de saída do VE e o início do fluxo diastólico mitral.

3.6 Obtenção das Células Derivadas do Tecido Adiposo

A técnica utilizada para extração, separação e cultura das células derivadas do tecido adiposo (CDTA) foi descrita em 1978; nesta ocasião, com o intuito de estudar os mecanismos da obesidade (Björntorp et al. 1978) e sofreu várias adaptações e aperfeiçoamentos ao longo do tempo por diversos pesquisadores (P A Zuk et al. 2001; Patricia A Zuk et al. 2002; Planat-Bénard, Menard, et al. 2004; Planat-Bénard, Silvestre, et al. 2004; Astori et al. 2007; Bunnell et al. 2008; Cheng et al. 2011; Ren et al. 2012). Neste trabalho foi realizada a compilação dos vários métodos descritos, proporcionando a possibilidade de criação de um protocolo, que permitiu obter as células de maneira adequada, eficiente e a baixo custo. O protocolo usado pode ser visto esquematicamente na **Figura 8** e descrito a seguir.

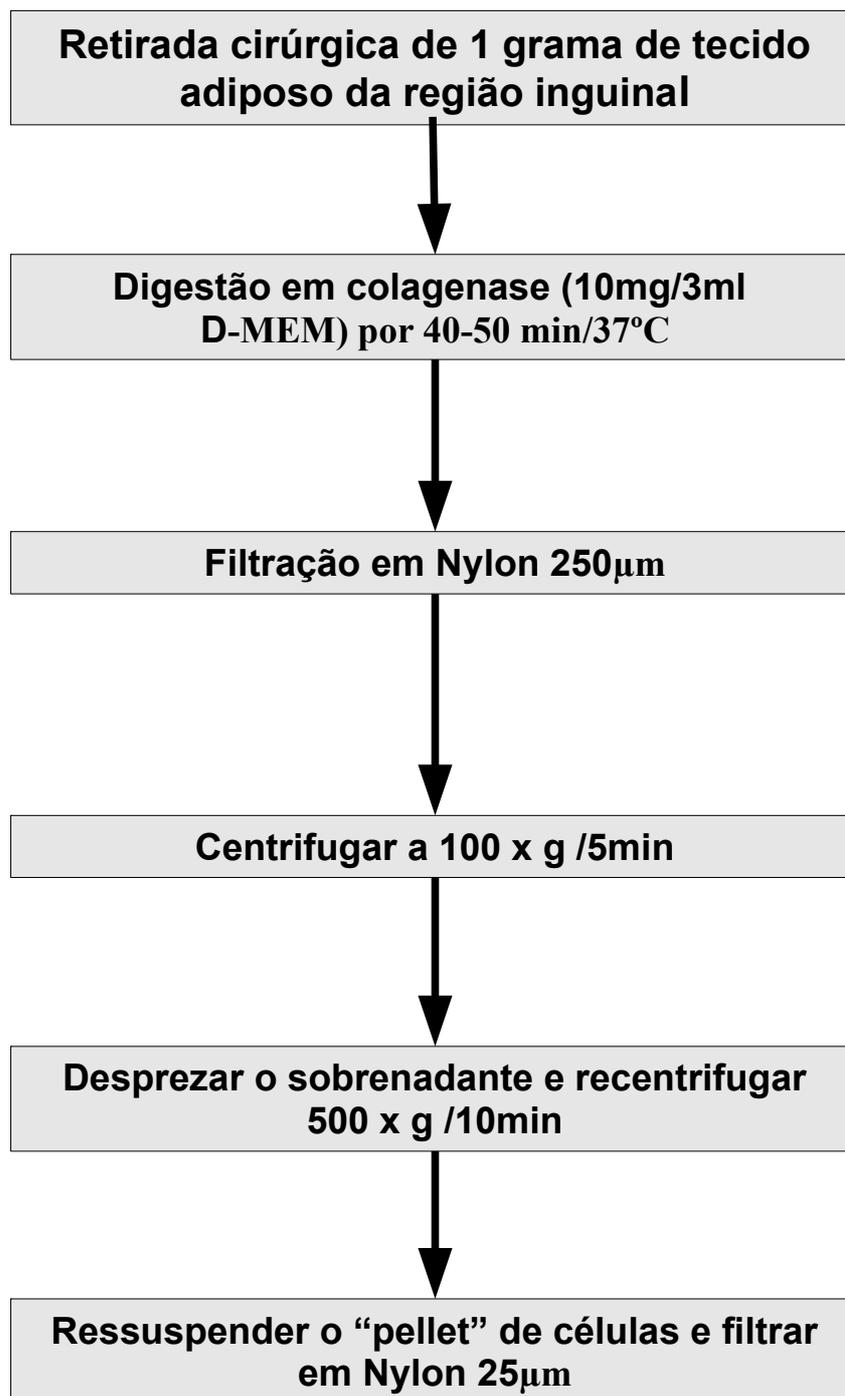


Figura 8: Diagrama esquemático do protocolo de separação das Células Derivadas do Tecido Adiposo (CDTA) utilizado nos experimentos. No final da última etapa, depois de passar pelo filtro de 25 µm, as células estão disponíveis para utilização. Geralmente, era feito uma lavagem em PBS por três vezes e então podiam ser levadas para semear em cultura ou contadas e preparadas para realização do tratamento dos animais infartados.

As células foram obtidas de ratos machos que serviram como doadores, por esses serem maiores e apresentarem maior quantidade de tecido adiposo do que as fêmeas, as quais foram usadas nos experimentos apenas como receptoras. Assim, ratos machos saudáveis, pesando entre 250,0 a 350,0 gramas de peso vivo foram anestesiados com o protocolo anestésico descrito na página 61 e quando entravam em plano anestésico eram submetidos à eutanásia em câmara de CO₂. Todo o processo para obtenção das células e manipulação dos animais ocorreu em cabine de fluxo laminar para garantir a qualidade do material obtido e evitar a contaminação.

Depois de submetidos à eutanásia, os animais doadores foram “mergulhados” em uma solução de álcool iodado numa concentração de 20,0 % de iodo em álcool para se garantir uma boa assepsia da área incisada e então colocados em decúbito esternal. Além do procedimento citado também foi realizado a tricotomia desta região e posteriormente foi realizada a incisão na pele para retirada do TA.

O tecido adiposo foi obtido da região inguinal desses animais. Para tanto, uma incisão com bisturi foi realizada na pele da região inguinal, no sentido transversal e um pouco acima da bolsa escrotal. Rebatendo a pele da região, foi possível visualizar uma grande quantidade de TA que se encontrava entre essa e a camada muscular do abdômen. O TA foi cirurgicamente e de forma cuidadosa dissecado, tomando-se o cuidado para que nenhum outro tecido fosse retirado junto com mesmo. Isso foi particularmente importante para que vasos sanguíneos presentes no local não fossem levados com o TA retirado para o restante do processamento.

Uma vez retirado, o TA foi lavado abundantemente com solução de salina tampão (PBS) para se certificar que todo sangue ou qualquer contaminante tenha sido removido. Após a lavagem, o tecido foi colocado em uma *Placa de Petri* contendo uma leve camada de PBS e cuidadosamente observado; Iniciando-se um minucioso trabalho de retirada de qualquer microvaso, músculo ou qualquer outro tipo de tecido que por ventura estivesse presente no material retirado e que tenha passado despercebido.

Constatada que a amostra estivesse livre de tecidos diferentes do adiposo; ela foi cortada e fragmentada em porções menores com auxílio de uma tesoura cirúrgica. Esse processo fez com que a amostra fosse reduzida a fragmentos bem pequenos, que além de proporcionarem uma melhor eficiência na etapa de digestão enzimática realizada pela colagenase, também ajudou a evitar que os filtros utilizados no processo de filtração entupissem, em decorrência da presença de grumos ou fragmentos maiores de tecido.

Desse material, já bem fragmentado, foi pesado e retirado 1,0 (uma) grama e colocado em uma solução de 3,0 mL (três mililitros) de PBS, contendo 10,0 (dez) gramas de colagenase do tipo II (código CLS-2, Worthington Biochemical). Uma vez homogenizada, a solução formada foi mantida na temperatura de 37,0° C (trinta e sete graus centígrados), dando início ao processo de digestão enzimática.

O processo de digestão enzimática é crítico para o sucesso na obtenção das (CDTAs). Ele teve que ser cuidadosamente acompanhado e teve duração entre 45 (quarenta e cinco) minutos à cerca de 1 (uma) hora. Durante esse tempo foi

promovido uma leve agitação (de aproximadamente um minuto de duração) para homogeneização da solução a cada 10 (dez) minutos, garantindo maior uniformidade no processo de digestão. Na prática, o tempo total de digestão foi muito variável e sofreu a influência de vários fatores; tais como, a “potência” da colagenase e até mesmo da consistência do tecido adiposo que pode variar bastante entre os animais. Portanto, a melhor forma de proceder foi através da observação constante e cuidadosa de todo o processo de digestão. Se deixarmos que a digestão ocorra por tempo superior ao necessário, a viabilidade das células é bastante prejudicada e por um tempo menor, diminui-se bastante o número de células obtidas ao final do processo.

Quando o processo de digestão terminou, foi realizada a primeira filtração do material. Antes, porém, foi adicionado DMEM em volume equivalente ao volume do material obtido com o objetivo de interromper o processo de digestão pela colagenase.

A primeira filtração consistiu na passagem do material por um filtro de 250 μ m (duzentos e cinquenta micrômetros) que tinha a finalidade de remover qualquer resquício de material não digerido pelo processo de digestão enzimática. Nesta etapa, não foi incomum o entupimento do filtro que, nestas situações, se fazia necessário a trocar a membrana filtrante ou a utilização de um novo filtro. Com esse procedimento boa parte dos grumos de gorduras fica retido pelo filtro e pode ser retirado mais facilmente.

Existem filtros comerciais disponíveis prontos para realização das etapas de filtração. Durante os experimentos, optamos em comprar somente o material filtrante da empresa Sefar®. A empresa disponibiliza o material filtrante “em metros” ou cortado “a laser” no formato e na dimensão desejada. Com isso, foi possível a montagem do filtro no próprio laboratório, usando um suporte com encaixe adequado para ser usado em conjunto com uma seringa descartável de 10,0 mL (dez mililitros), resultando em flexibilidade e economia ao processo.

O material depois de filtrado foi colocado em um tubo de centrifuga para ser submetido a primeira centrifugação. A centrifugação foi realizada na velocidade de 100 x g (cem) por 5 (cinco) minutos (centrífuga FANEM, modelo Excelsa II) e tinha como finalidade principal separar os adipócitos adultos do restante do material.

No final dessa primeira centrifugação foi claramente visível um anel branco na parte superior da solução. Esse “anel branco” era constituído principalmente por adipócitos adultos, que por serem mais leves (apresentarem menor densidade) tendem a “flutuar” para constituir o sobrenadante.

O anel de gordura (sobrenadante) foi cuidadosamente removido com o auxílio de uma pipeta e desprezado. O restante do material foi, então, submetido a uma segunda centrifugação; porém, na velocidade de 500 x g (quinhentos) por 10 (dez) minutos, usando a mesma centrífuga. No final deste processo, um sedimento (“*pellet*”) foi formado no fundo do tubo e é nele que estavam as células que desejávamos obter.

O restante da solução foi então descartado, aproveitando-se somente o sedimento. Esse sedimento foi então suspenso novamente em 3,0 mL (três) de meio de cultura (DMEM)⁷ e depois de cuidadosamente homogenizado, a solução foi novamente filtrada. Essa filtração foi realizada através de um filtro de 25,0 µm (vinte e cinco micrômetros). O procedimento de filtração, assim como os equipamentos e materiais descritos e usados na primeira filtração, foi o mesmo, exceto pela membrana filtrante, que era de trama menor. Depois dessa filtração, o material obtido era constituído em sua maior parte por CDTA, podendo ser processado (contagem de células, coloração, etc.) e usado tanto para injeção “a fresco”, quanto semeado em meio de cultura para expansão.

7 Foi utilizado o meio “Dulbecco's Modified Eagle's medium” (DMEM), product# [D_5546](#), Sigma®.

3.7 Cultura de Células Derivadas do Tecido Adiposo

As CDTAs obtidas conforme descrito na página 74 puderam ser semeadas em meio de cultura, expandidas e mantidas por um período relativamente longo.

O precipitado foi transferido para um tubo cônico de 15 (quinze) mL e suspenso novamente em 20 (vinte) mL de meio de cultura (DMEM) obtido da Sigma Chemical Company, St Louis, MO, EUA, suplementado com 10 (dez)% soro fetal bovino (SFB), 100 (cem) UI /mL de penicilina e 100 (cem) µg/mL de estreptomicina. A seguir o volume foi dividido em duas garrafas de 75 (setenta e cinco) cm² as quais foram mantidas em incubadora úmida a 37° (trinta e sete) C e 5% (cinco) de CO₂. Após 24 (vinte e quatro) horas do isolamento o meio foi aspirado, a garrafa de cultivo foi lavada com solução tampão fisiológica (PBS) obtido da Sigma Chemical Company, St Louis, MO, EUA, e acrescentado 10 (dez) mL de DMEM, suplementado com 10% (dez) de SFB, 100 (cem) UI/mL de penicilina e 100 (cem) µg/mL de estreptomicina. Para a manutenção das células foi renovado o meio de cultura a cada 2 dias.

3.8 Caracterização das Células

Procurou-se caracterizar as CDTAs utilizadas nos tratamentos pela coloração de “Red Oil O” e pela citometria de fluxo.

Caracterização Morfológica pela Coloração de “Red-Oil O”

Este protocolo foi usado para evidenciar o acúmulo (presença) de gordura no citoplasma das células. As células mais diferenciadas (ou adipócitos adultos) que possuem maior quantidade de lipídios em seu citoplasma, deverão apresentar uma coloração rósea mais forte com esse método de coloração. Foi usada uma solução estoque contendo 0,5 (meia) gramas de corante “Oil Red O” (Sigma, catálogo # 0-0625) em 100,0 (cem) mL de isopropanol.

As placas foram lavadas com PBS e as células fixadas, cobrindo-as com PBS adicionado de solução de formaldeído a 10,0 % (dez) ou se utilizando um produto comercialmente pronto (Formalina Tamponada, Sigma, catálogo # HT50-1-640). As placas eram deixadas em repouso por pelo menos 15 (quinze) minutos ou descansando durante a noite em temperatura ambiente. Uma nova solução de trabalho de “Red Oil O” foi preparada para cada processo de coloração (uma vez que essa solução de trabalho era muito instável) pela adição de 6,0 mL (seis mililitros) da solução estoque em 4,0 mL (quatro mililitros) de água bidestilada que eram então misturadas e filtradas com um papel de filtro. Foi retirado o agente fixador e adicionado o corante (“Oil Red O”) em quantidade suficiente para cobrir a lâmina. Depois disso foi deixado em repouso por cerca de 1 (uma) hora em

temperatura ambiente. A seguir as lâminas foram lavadas abundantemente e com cuidado com água destilada para remover o excesso de corante e qualquer precipitado que se tenha formado e deixadas secar em temperatura ambiente. Foi então possível observar as lâminas que apresentaram intensidade da coloração avermelhada de acordo com a quantidade de gordura presente no citoplasma celular.

A **figura 9** mostra um exemplo de como as células apareceriam caso estivessem diferenciadas com gotícula de gordura no citoplasma, exibindo uma coloração rósea para vermelho na coloração de “Red oil”.

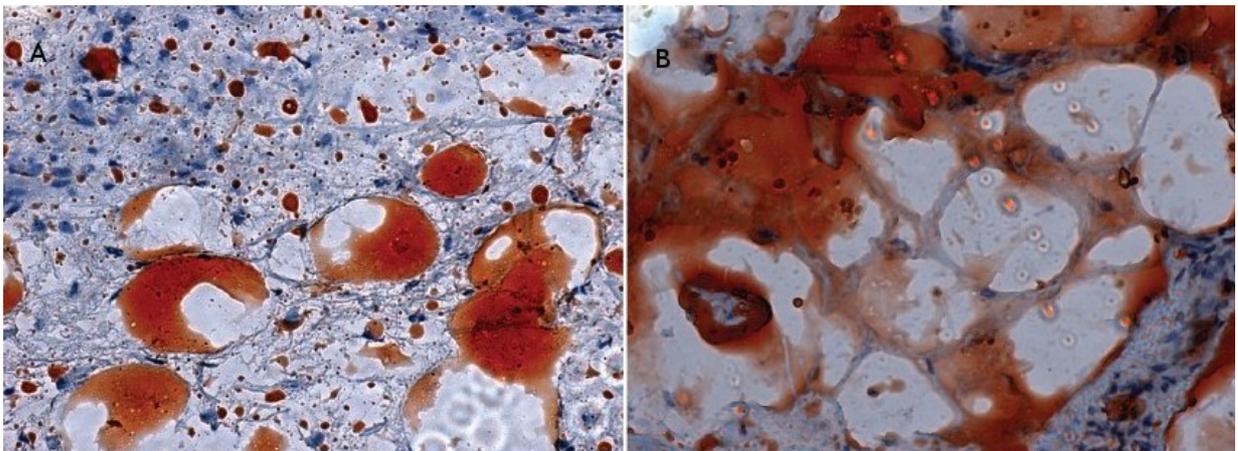


Figura 9: Figura mostrando exemplo de Adipócito corados pela técnica de “Red Oil”. Os adipócitos já diferenciados por apresentarem gotículas de gorduras em seu citoplasma, são coradas em vermelho por essa técnica. Em A) aumento de 10 X enquanto em B) O aumento de 20 X.

Caracterização pela Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo foi utilizada para caracterização das células isoladas. As células obtidas por digestão do TA após processamento com colagenase foram mantidas a 37,0° C (trinta e sete) em atmosfera úmida com 5,0 % (cinco) de CO₂ em meio de cultura contendo DMEM (obtido da Sigma Chemical Company, St Louis, MO, EUA) durante 48 (quarenta e oito) horas para recuperação de possíveis epítomos de superfície clivados pela ação enzimática.

Após 48 (quarenta e oito) horas, poucas células se encontravam aderidas ao frasco de cultura. Dessa forma, para se caracterizar toda a população celular obtida no processo de isolamento foi necessário juntar as células não aderidas com aquelas que se encontravam aderidas ao frasco de cultura antes de realizar a citometria de fluxo.

Porém, antes de se juntar as duas frações celulares foi necessário desprender a fração celular aderida ao frasco de cultura e esse processo foi realizado pelo uso de solução de dissociação não enzimática.

Uma vez juntada as duas frações celulares, as células foram lavadas em PBS por três vezes, centrifugadas em 400 x g (quatrocentos) por 5 minutos (centrífuga FANEM, modelo Excelsa II) e depois da última lavagem, elas foram contadas, filtradas com um filtro de 100,0 µm (cem micrômetros) (Sefar®) e finalmente separadas para o procedimento de citometria.

As células foram divididas em 9 (nove) tubos de citometria. Em cada tubo tínhamos cerca de $5,0 \times 10^{05}$ células ressuspendidas em 100,0 μ L (cem microlitros) de PBS com 5,0 % (cinco) de Soro Fetal Bovino (SFB) e armazenadas a 4,0° C (quatro) por 15 (quinze) minutos. O SFB foi utilizado para bloquear possíveis ligações inespecíficas.

Após o bloqueio, as células foram incubadas com os seguintes anticorpos monoclonais: CD29-FITC⁸ (Biogens®, Catalogue Number:11312-50), CD90-FITC (Biogens®, Catalogue Number: 03012-50), CD11b-FITC (Biogens®, Catalogue Number: 03221-50), CD45-PE-Cy5⁹ (Biogens®, Catalogue Number: 07131-65) e os isotipos IgM-FITC (StemCell Technology, Catalogue Number: 10211), IgG2a-FITC (SouthernBiotech, Catalogue Number: 0117-02), de acordo com as especificações dos fabricantes durante 20 (vinte) minutos a 4,0° C (quatro). Após este período de incubação, as células foram lavadas com PBS, centrifugadas a 400 (quatrocentos) x g por 5 (cinco) minutos e suspendidas novamente em 300,0 (trezentos) μ L de PBS para aquisição dos dados.

Células não marcadas foram utilizadas para o ajuste das voltagens dos parâmetros: “Forward Scatter Cell” ou dispersão frontal da luz (FSC), “Side Scatter Cell” ou dispersão lateral da luz (SSC), intensidade da fluorescência (FL)-1, FL-2, FL-3 e “*threshold*” do citômetro de fluxo (BD FACS Array®). FSC avalia o tamanho

8 Os anticorpos podem estar conjugados com substâncias fluorescentes, fazendo-os emitir uma fluorescência com comprimento de onda determinado pela substância associada. FITC significa isotiocianato de fluoresceína e é um dos conjugados usados com anticorpos.

9 Os anticorpos podem estar conjugados com substâncias fluorescentes, fazendo-os emitir uma fluorescência com comprimento de onda determinado pela substância associada. PE-Cy5 significa o corante indotricarbociana associado com ficoeritrina e é um dos conjugados usados com os anticorpos.

relativo da célula; SSC avalia a granulação ou complexidade relativa da célula; e no caso deste citômetro: FL-1 é o canal vermelho; FL-2, o canal azul e o FL-3, o canal violeta. As compensações de sinais, necessárias em virtude da sobreposição de canais de fluorescência, foram realizadas a partir de marcações simples (único anticorpo). Os isotipos foram utilizados para confirmação de especificidade das reações do anticorpo monoclonal com os epítomos analisados. Foram adquiridos um mínimo de 30.000 eventos por tubo de aquisição.

3.9 Contagem e Preparo das Células para Tratamento dos Animais

As CDTAs obtidas conforme descrito na página 74 foram contadas e preparadas para injeção. O procedimento de contagem foi realizado com o auxílio de uma câmara do tipo “Neubauer”. Para tanto, procurou-se usar uma câmara limpa em conjunto com uma lamínula recomendada pelo fabricante. Para melhor acurácia na contagem uma alíquota homogênea de células era usada no processo.

O procedimento de preparação das células para contagem foi dependente de onde elas estavam. Se foram originadas do processo anterior (Página 74); ou seja, células frescas, presentes depois da última etapa de filtração, uma pequena amostra (alíquota) da solução contendo as células era suficiente. Por outro lado, caso as células a serem contadas estivessem em meios de cultura, procedia-se com a dissociação dessas células do meio antes que a contagem pudesse ser realizada.

O processo de contagem de células seguiu um protocolo já bem estabelecido e amplamente empregado para contagem de vários tipos celulares, conforme brevemente explicado abaixo¹⁰. Para ilustrar, uma representação de parte de uma câmara do tipo “Neubauer” pode ser visualizado na **figura 10**.

Aproximadamente um volume de 20,0 µL (vinte microlitros) da suspensão contendo as células foi necessário para preencher completamente a câmara. Em um

¹⁰ O procedimento de contagem de célula pode ser encontrado detalhadamente em livros e na internet. Uma boa fonte de consulta de protocolos empregados em biologia celular pode ser encontrado no sítio eletrônico da empresa *Cascade Biologics*[™] (<http://www.cascadebio.com>). O protocolo descrito, por exemplo pode ser encontrado no documento 107.0 da referida empresa.

microtubo contendo 15,0 μL (quinze) de suspensão das células foi adicionada outros 15,0 μL (quinze) de uma solução de “Azul de Tripán” (Sigma-Aldrich cat. # T8154). O corante foi necessário para estimativa da viabilidade das células. Depois disso, se homogenizou cuidadosamente a solução formada.

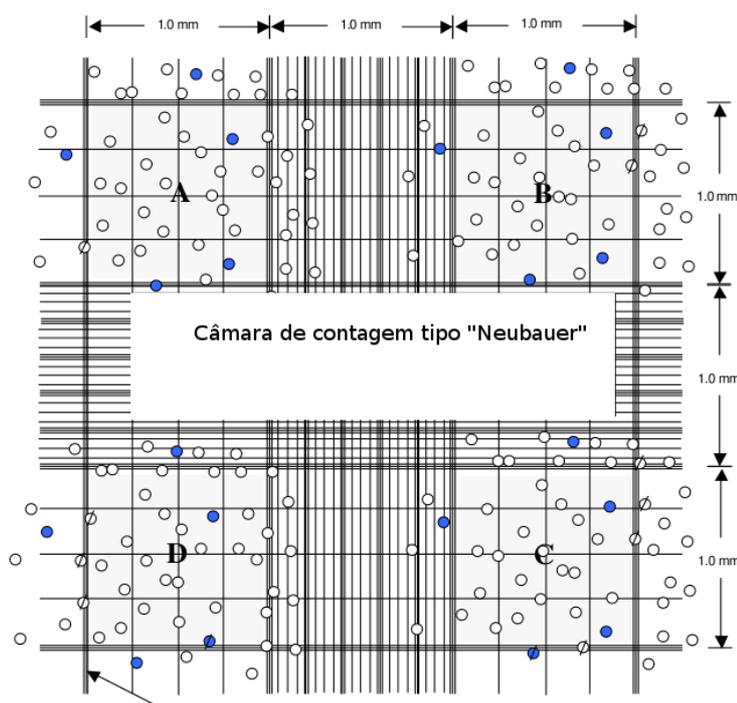


Figura 10: Figura mostrando o esquema de uma câmara de contagem de células tipo "Neubauer", usada para a contagem das células. A) B) C) e D) são os locais (quadrantes) onde as células podem ser visualizadas e contadas, desde que a câmara esteja cheia. De posse do número de células nestes quadrantes e sabendo-se o volume da câmara e da diluição usada na solução de células para encher a câmara, é possível calcular o número aproximado de células. Fonte: Documento 107.0, disponível em <http://www.cascadebio.com> em 10/01/2014.

Uma lamínula limpa foi colocada sobre a câmara e com auxílio de uma pipeta carregou-se a câmara com cerca de 10,0 μL (dez) da mistura célula/corante de cada lado da câmara. O processo de carregamento da câmara foi feito cuidadosamente, permitindo que o fenômeno de capilaridade realizasse o trabalho. A câmara preenchida foi levada ao microscópio e as células foram contadas com a objetiva de 100X.

3.10 Tratamento dos Animais

Injeção das Células na Borda da Lesão do Infarto (Grupo T1)

Os animais que foram submetidos à cirurgia para produção do IM realizada no dia anterior foram anestesiados com o protocolo descrito na página 61 e quando se encontravam em plano anestésico adequado, que nesse trabalho significou perda consciência e do reflexo interdigital, foram levados ao profissional para realização dos exames eco e eletrocardiográficos, conforme descrito na página 66 e seguintes. Constatada a situação de infartados, segundo os critérios já descritos na literatura (Miranda et al. 2007), os animais foram, então, levados até o cirurgião para a realização da cirurgia de injeção de células (Grupo T1) ou de solução salina (animais não tratados), de acordo com o grupo experimental, ao qual pertenciam.

O procedimento cirúrgico para abertura do tórax e exposição do coração para injeção das células foi bem semelhante ao realizado anteriormente para produção do infarto. Neste caso, como a cirurgia anterior era recente (ocorrera apenas 24 horas antes), o acesso à cavidade torácica foi realizado pela retirada das suturas que foram usadas para o fechamento do tórax na cirurgia para produção do IM. Uma vez conseguido o acesso à cavidade torácica, o coração foi exposto e com isso, a lesão miocárdica podia ser facilmente visualizada.

O cirurgião recebeu 25,0 µL (vinte e cinco microlitros) da solução previamente preparada, podendo conter aproximadamente $1,0 \times 10^{07}$ células ou apenas o

veículo (solução salina) sem que o mesmo soubesse do fato. Além disso, o cirurgião no momento da cirurgia também não tinha conhecimento dos exames realizados anteriormente; não sabendo, portanto, as prévias condições clínicas dos animais ou a possível estimativa da extensão dos infartos deles. O volume recebido foi dividido em três injeções que foram injetadas na borda da lesão, tomando o cuidado para não se atravessar a parede do miocárdio e acidentalmente injetar as células diretamente na câmara cardíaca.

Terminado o processo de injeção, o coração foi reconduzido para sua posição anatômica habitual e a parede torácica foi novamente fechada por suturas em bloco (englobando a pele) e todos os procedimentos já descritos para o perfeito restabelecimento do animal foi providenciado.

Injeção das Células na Circulação Periférica (Grupo T2)

Como descrito anteriormente, os animais que foram submetidos à cirurgia para produção do IM realizada nas 24 (vinte e quatro) horas anteriores foram anestesiados com o protocolo anestésico já descrito (Página 61) e levados ao profissional para a realização dos exames eco e eletrocardiográficos. Uma vez confirmado que os mesmos estavam infartados, foram encaminhados para o profissional para realização das injeções das células na circulação periférica, através da veia da cauda.

O cirurgião recebeu 25,0 μ L (vinte e cinco microlitros) da solução previamente preparada desprovida de células; ou seja, apenas solução salina (grupo não tratado)

ou 25,0 μL (vinte e cinco microlitros) da solução contendo aproximadamente $1,0 \times 10^{07}$ de células. Visualmente era localizada a veia caudal do animal e cuidadosamente realizada a punção da mesma e, com a ajuda de um auxiliar, essa solução foi então injetada lentamente na veia caudal do animal, tomando-se o cuidado para que de fato a injeção estivesse sendo realizada na circulação sanguínea. Depois do tratamento, os animais foram observados até o pronto restabelecimento da anestesia e reconduzidos às suas gaiolas.

3.11 Avaliação da Insuficiência Cardíaca

Uma avaliação indireta de insuficiência cardíaca pode ser obtida calculando-se o percentual de água presente nos pulmões e fígado. Para tanto, esses órgãos foram pesados em uma balança de precisão antes e após a desidratação em estufa na temperatura de 80,0° C (oitenta graus centígrados) pelo tempo necessário para que ocorresse a desidratação completa desses órgãos. O tempo foi considerado suficiente quando não se percebeu mais alterações nos pesos desses órgãos em pesagens consecutivas. A relação entre os pesos de antes e após a desidratação em estufa dos órgãos permitiu estimar a quantidade de líquido presente neles e calcular o percentual relativo de água destes órgãos nos grupos experimentais.

3.12 Análises Histopatológicas e Medição do Tamanho do Infarto

Os corações obtidos na necrópsia foram pesados e limpos, sendo previamente fixados em solução de formaldeído tamponado à 10,0 % por 18 (dezoito) à 32 (trinta e duas) horas. Os corações foram então destituídos de seus átrios através de um corte transversal a altura da região das valvas cardíacas com uma lâmina de bisturi. Os ventrículos isolados foram novamente incisados transversalmente em quatro cortes equidistantes, sendo nomeados sequencialmente do ápice para base de cortes: A, B, C e D.

Esses segmentos foram lavados rapidamente com água, desidratados e clarificados com álcool etílico PA e Xileno respectivamente, na seguinte ordem de concentração e duração: álcool 70° (30 minutos), álcool 100° (50 minutos), álcool 100° (50 minutos), álcool 100° (60 minutos) e xileno PA (40 minutos) para serem finalmente impregnados em parafina através de dois banhos de parafina de 50 (cinquenta) minutos cada, ambos na temperatura de 60,0°C (sessenta graus centígrados). Uma vez incluídos em parafina, os segmentos foram submetidos ao micrótomo para obtenção de cortes de 5,0 µm (cinco micrômetros) de espessura para posterior produção de lâminas histológicas.

As lâminas montadas a partir dos cortes histológicos dos segmentos foram submetidas a dois protocolos de coloração: Hematoxilina e Eosina (HE) para a observação das alterações histopatológicas e a coloração de “Picrosirius”, que por corar especificamente as fibras de colágenos, foi usada para medir a extensão dos

infartos dos corações dos animais. Os protocolos de coloração estão resumidamente descritos em seguida.

Coloração de Hematoxilina e Eosina

Uma quantidade de 0,5 (meia) grama de hematoxilina foi dissolvida em 5,0 (cinco) mL de álcool, enquanto 10,0 (dez) gramas de alúmen de potássio ou amônio foram dissolvidos em água quente. Então as duas soluções formadas foram misturadas. Após isso, a mistura foi levada à ebulição o mais breve possível e depois de removida do fogo lhe foi acrescentado 0,25 (vinte cinco centésimos) gramas de óxido vermelho de mercúrio.

A solução foi aquecida novamente até que ficasse com a cor vermelha escura (cerca de um minuto), removida do fogo e deixada para resfriar rapidamente em água fria na geladeira. A solução depois de resfriada estava pronta para uso.

Pesava-se 0,5 (meia) grama de eosina Y (amarela hidrossolúvel) que então foram dissolvidos em 10 (dez) mL de água destilada. Acrescentou-se ainda 90 (noventa) mL de álcool 95° e opcionalmente, podia-se adicionar 1 (uma) gota de ácido acético para aumentar a intensidade da coloração.

Os cortes foram desparafinados e hidratados e então as lâminas foram colocadas na solução de hematoxilina durante 2,5 (dois e meio) minutos. Em seguida as lâminas foram rapidamente lavadas em água corrente e colocadas numa solução diferenciadora, constituída por 5 (cinco) gotas de ácido acético clorídrico em

100 (cem) mL de álcool 95°. Novamente foram lavadas em água corrente por 10 (dez) minutos; Decorrido esse tempo, as lâminas foram colocadas na solução de Eosina por 2 (dois) minutos. Uma vez montada as lâminas, os núcleos celulares se coravam em azul, enquanto o citoplasmas, as fibras colágenas e elásticas se coravam em vermelho.

Coloração de “Picrosirius”

Preparou-se uma solução de Picrosirius vermelho acrescentando 0,5 (meia) grama de Sirius vermelho (Sigma-Aldrich, sob o nome de “*Direct Red 80*”; Cat# 365548 ou Cat # 43665) em 500 (quinhentos) mL de uma solução aquosa saturada de ácido pícrico (Sigma-Aldrich Cat # P6744-1GA).

Os cortes foram desparafinados e hidratados e, em seguida, as lâminas foram coradas com a Hematoxilina de Weigert por 8 (oito) minutos e lavadas por 10 (dez) minutos em água corrente. Acrescentou-se então a solução de “Picrosirius” vermelho, preparada previamente e deixando as lâminas corando por 1 (uma) hora. Em seguida, as lâminas foram lavadas por duas vezes em água acidificada, que consistia de uma solução onde se adicionou 5,0 (cinco) mililitros de ácido acético (glacial) em 1,0 (um) litro de água destilada. Promoveu-se uma agitação vigorosa e foi removido o excesso de água das lâminas. Posteriormente os cortes foram desidratados com etanol a 100,0 % em três etapas. No final desse processo, as lâminas foram limpas em Xilol e montadas.

3.13 Medição do Tamanho do Infarto

Os cortes histológicos obtidos foram observados em um microscópio invertido de epifluorescência (Axievert 100, ZEISS – Germany) e as análises morfológicas foram realizadas em todas as lâminas para confirmar as alterações histopatológicas características dos infartos do miocárdio.

As lâminas coradas com *Picrosirius* foram fotografadas com câmera digital. As áreas cicatrizadas, por apresentarem maior concentração de colágeno, ficaram coradas em marrom o que facilitou a sua delimitação. O arquivo digital foi analisado com um programa gráfico adequado (ImageJ versão 1.27z, *National Institute of Health*, EUA, disponível em <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) que permitiu facilmente medir os diversos parâmetros para determinação do tamanho do infarto do VE. Isso foi realizado através de planimetria, método amplamente descrito na literatura (Spadaro et al. 1980), que pode ser resumido da seguinte forma: Cada corte transversal (A, B, C e D) foi avaliado individualmente. Cada segmento deste foi fotografado ou a lâmina histológica oriunda do segmento foi escaneada e analisada com o programa citado. A porção do endocárdio infartado foi medido, assim como, o tamanho total da porção endocárdica (porção infartada e não infartada). A partir destes valores foi possível calcular o valor percentual de infarto do endocárdio daquele corte. O mesmo procedimento foi realizado com o epicárdio, obtendo-se assim o valor do percentual de epicárdio infartado. De posse destes dois valores percentuais, calculou-se a média e esta média foi considerada como o valor percentual de infarto para aquele corte (segmento) estudado (Ellis, Doumanian, e Plun 1962).

O mesmo procedimento foi realizado para cada um dos quatro cortes do coração. Com os valores percentuais dos quatro segmentos conforme descrito acima foi possível calcular a média entre eles; obtendo-se, assim, o percentual de VE infartado do coração analisado.

3.14 Análises Estatísticas

A escolha dos testes estatísticos empregados na análise dos dados foi feita de acordo com a finalidade e com as características da variável envolvida. Deu-se preferência a utilização de testes paramétricos, porém nos casos onde a variável não tinha distribuição normal¹¹ ou os pressupostos para a sua utilização não puderam ser cumpridos, utilizou-se o teste não paramétrico equivalente. Foi usado o teste t de “student” quando a análise envolveu a comparação de duas amostras e quando a análise envolveu mais de dois grupos, a análise de variância (ANOVA) foi o teste de eleição, sendo utilizada ANOVA de uma via, quando uma variável era analisada e ANOVA de duas vias, quando mais de uma variável precisou ser testada (análise entre grupos e ao longo do tempo, por exemplo). Em todos os testes, o grau mínimo de significância considerado foi de 95,0 % ($p < 0,05$) ou de 99,0 % ($p < 0,01$) e os cálculos foram realizados em computador, utilizando-se, para tanto, o *programa de estatística R* (do *R - Project*) que pode ser baixado gratuitamente em <http://www.r-project.org>. Todos os valores foram representados como Média \pm Desvio Padrão (DP) sobretudo nas tabelas; enquanto nos gráficos, salvo menção em contrário, os valores foram expressos como Média \pm Erro Padrão da Média. Os gráficos foram

¹¹ Para determinar se a variável tem distribuição normal, além da visualização gráfica da variável em estudo também foi empregado testes estatísticos específicos como o *Shapiro test*, por exemplo.

construídos pelo mesmo programa empregado para realização dos testes estatísticos.

Resultados

4. Resultados

4.1 Rendimento do processo de obtenção e cultura das células

De um rato macho adulto de aproximadamente 400 (quatrocentas) gramas de peso vivo foi possível retirar cerca de 15 (quinze) gramas de tecido adiposo da região inguinal. Esse material processado resultou, depois da última filtragem, em aproximadamente $6,0 \times 10^{07}$ células com viabilidade de mais de 98,0 % (avaliado através do uso de Azul de Trypan).

As CDTAs se desenvolveram rápido em cultura e foram capazes de se manter em cultura por pelo menos 120 (cento e vinte) dias, sem diferenciação espontaneamente; quando só então começaram a apresentar diminuição da taxa de proliferação e alterações fenotípicas ao microscópio ótico. Essas células aderiram em cultura e se apresentaram em forma estelares. A proliferação das células em DMEM foi grande e rápida, fazendo com que a densidade de células chegasse aos limites da garrafa de cultura rapidamente, Esses achados foram condizentes com os dados encontrados na literatura sobre as CDTAs (Bunnell et al. 2008; Ren et al. 2012). Com isso, houve a necessidade de que as trocas de meios ocorressem numa frequência bem maior. Chegou-se, em alguns momentos, a se realizar trocas em intervalos de 24 horas; mas a média os intervalos de trocas ficaram entre 48 a 72 horas.

Na **Figura 11** é possível visualizar uma cultura de CDTA de ratos depois de 7 (sete) dias em cultura. Como pode ser notado, com esse tempo de cultura já existe uma grande densidade de células, demonstrando a característica de crescimento rápido que essas células possuem, enquanto na **Figura 12** pode ser vista uma cultura com 15 dias.

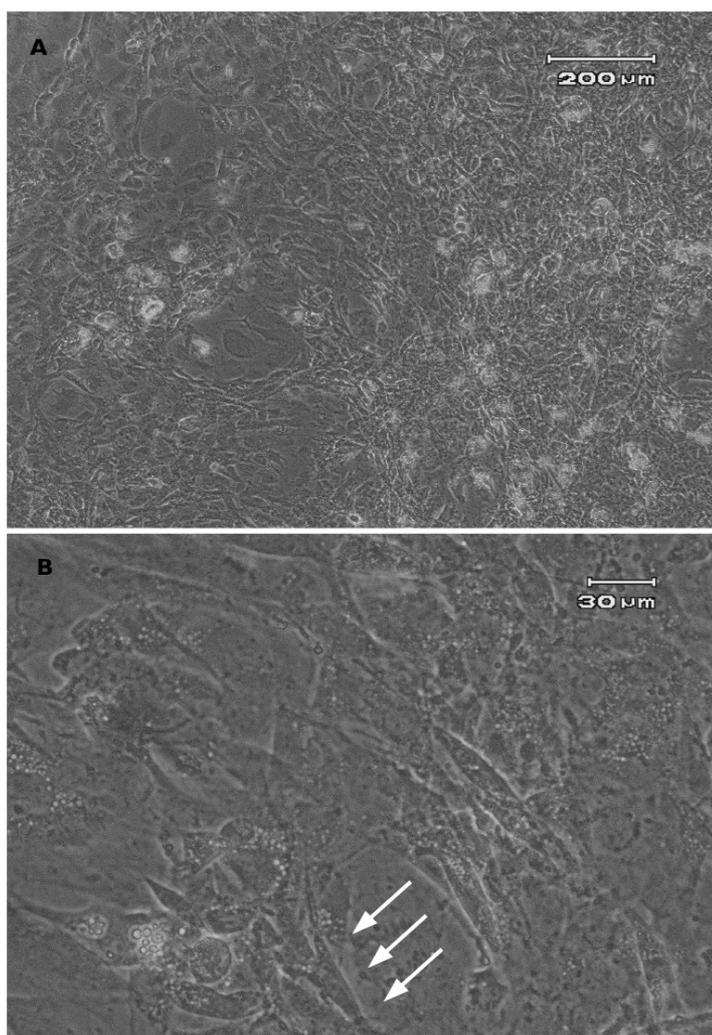


Figura 11: Micrografia mostrando uma cultura de CDTA de ratos em DMEM com 7 dias. Em A) é mostrado a grande densidade de células. Barra indicando 200 µm de tamanho. Em B) a mesma cultura visualizada em um aumento maior. Nela pode ser visualizado (setas brancas) uma CDTA, que se apresenta de forma estrelada. Barra indicando 30 µm de tamanho.

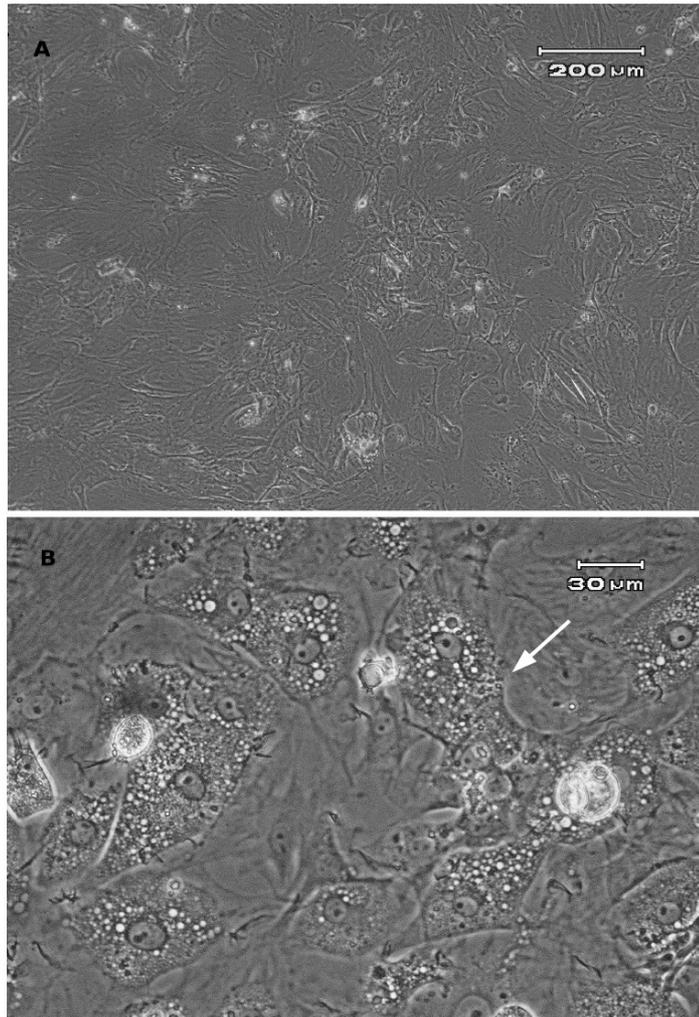


Figura 12: Micrografia mostrando uma cultura de CDTA de ratos em DMEM com 15 dias. Em A) é mostrado a grande densidade de células. Barra indicando 200 µm de tamanho. Em B) a mesma cultura visualizada em um aumento maior. Algumas células apresentam áreas em seu citoplasma, onde se acumula gotículas de gordura, indicada na figura pela seta. Barra indicando 30 µm de tamanho.

4.2 Caracterização das Células

As CDTA foram caracterizadas empregando a coloração de “Red-Oil” e através da citometria de fluxo. A coloração de “Red – Oil” foi utilizada para detectar a presença de gotículas de gordura no citoplasma das células, já que nesta coloração, quanto mais gordura presente no citoplasma, mais intenso é o vermelho apresentado. Tanto as células obtidas, quanto aquelas que permaneceram em cultura por vários dias não apresentaram coloração rósea, o que demonstrou que as células utilizadas nos experimentos, continham muito pouca ou nenhuma gotículas de gordura em seu citoplasma; resultado, este, esperado já que as células não eram diferenciadas.

Outra maneira de caracterização das células foi pelo emprego da técnica de citometria de fluxo. Conforme pode ser visto nas figuras 13 e 14, a citometria de fluxo demonstrou que o perfil imune fenotípico encontrado nas amostras foi predominantemente de células não hematopoiética (percentual $\geq 95,0$ % das células analisadas), sendo elas principalmente **CD45-**, **CD11b-**, **CD90+** e **CD29+**. Apenas $4,5 \pm 0,7$ % das células eram de origem hematopoiética (**CD45+**); sendo elas, sobretudo **CD90+** e **CD11b+** (figuras 13 e 15).

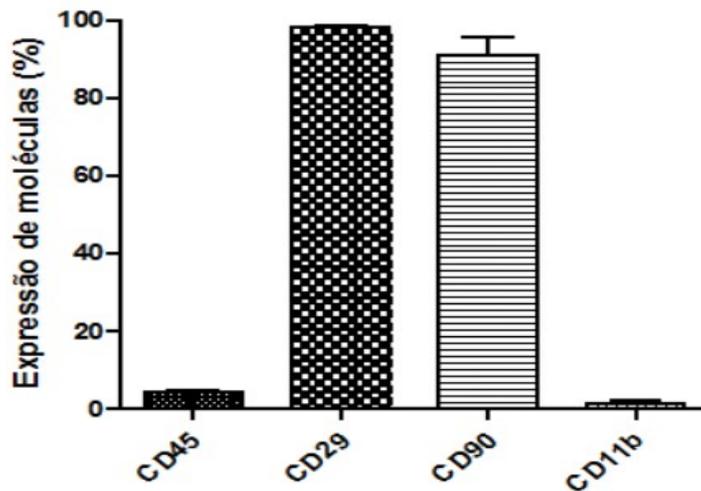


Figura 13: Gráfico mostrando o perfil imuno fenotípico em percentual das células isoladas pela citometria de fluxo. Como pode ser evidenciado no gráfico a maior parte das células isoladas foi CD29+ e CD90+, que são marcadores presentes em células mesenquimais enquanto um percentual bem menor de células tiveram marcadores para células hematopoiéticas (CD45 e CD11b). Valores expressos em média \pm erro padrão da média.

Tipos celulares presentes no isolamento

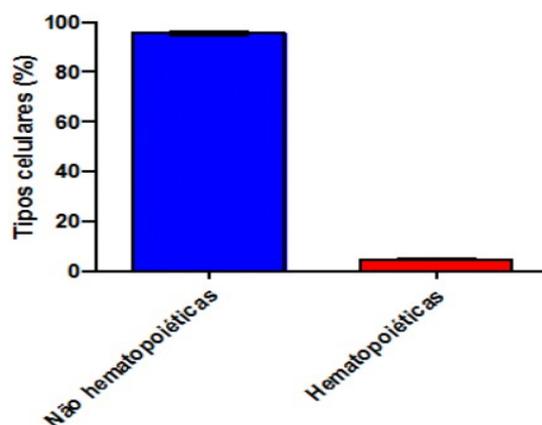


Figura 14: Gráfico demonstrando o percentual da população hematopoiética em relação a não hematopoiética nas amostras de CDTA de ratos, quando analisadas pela citometria de fluxo. O gráfico mostra que mais de 95,0 % das células isoladas apresentaram um perfil não hematopoiético (mesenquimal). Valores expressos em média \pm erro padrão da média.

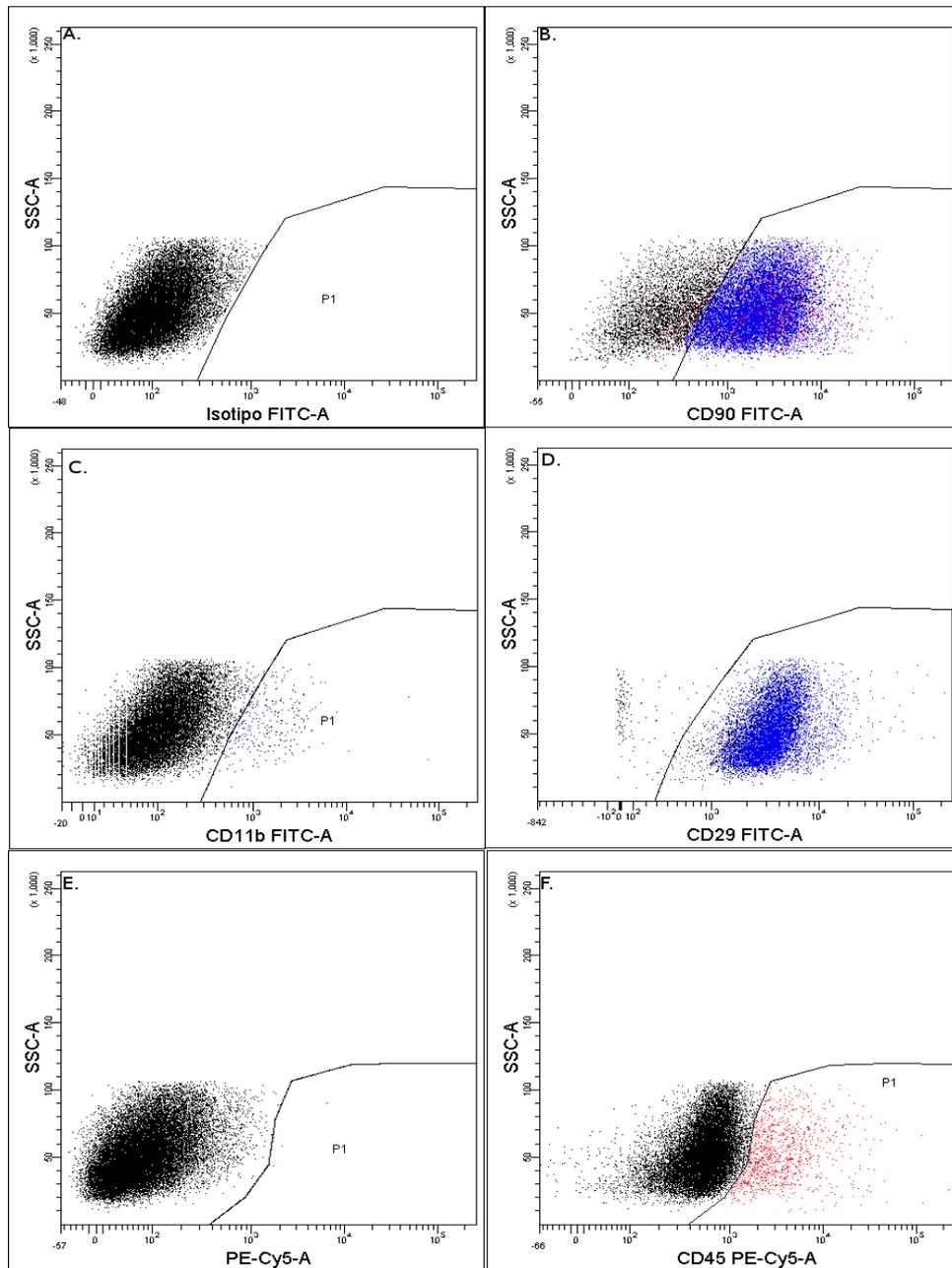


Figura 15: Gráficos mostrando a citometria de fluxo realizada nas amostras de células derivadas do tecido adiposo após 48 horas em cultura. Os **pontos azuis** representam as células **não hematopoiéticas positivas** para a molécula estudada. Os **pontos pretos** representam as células **não hematopoiéticas negativas** para a molécula estudada, enquanto os **pontos vermelhos** mostram as células **hematopoiéticas**. A) Mostra a área de interesse (P1) selecionada para as análises seguintes, considerando o isotipo FITC. B) Mostra a análise considerando o marcador para CD90, que é um marcador para células mesenquimais. Como mostrado, na área de interesse é possível ver uma grande quantidade de células não hematopoiéticas (azuis) em relação a hematopoiéticas (vermelho). C) Mostra a análise considerando o marcador CD11b, que é um marcador para células hematopoiéticas. D) Mostra a análise considerando o marcador para CD29, que é um marcador para células mesenquimais. É possível observar muitos pontos azuis em relação aos vermelhos. E) Mostra a área de interesse (P1) selecionada para as análises seguintes, considerando o isotipo PE-Cy5. F) Mostra a análise considerando o marcador CD45, que é um marcador para células hematopoiéticas.

4.3 Grupos Experimentais: Visão Clínica e Comparativo da Taxa de Mortalidade dos Animais

Os animais estavam com 201,4 gramas (duzentas) \pm 26,65 quando os experimentos foram iniciados e no final de 28 dias apresentavam peso de 210 (duzentos e dez) gramas \pm 15,0; não havendo, portanto, ganho de peso nos grupos ao final do experimento ($p>0.05$). Cerca de 30,0 % (trinta) dos animais alocados para o experimento morreram durante a realização do primeiro procedimento cirúrgico (produção do infarto do miocárdio). Do total dos animais sobreviventes e confirmadamente infartados, cerca de 10,0 % (dez) faleceram durante alguma outra fase dos experimentos.

Cerca de 50,0 % (cinquenta) dos animais alocados para o grupo experimental que recebeu tratamento por injeção de célula na região peri infarto (Referenciado nesse trabalho como **Grupo Experimental Nº 01**, ou simplesmente de **T1**) faleceram durante o procedimento cirúrgico para injeção das células. Ou seja, durante a segunda cirurgia que como explicado anteriormente é realizada apenas 24 (vinte e quatro) horas após a primeira; fazendo com que o número de animais neste grupo e conseqüentemente levado até o final do experimento fosse de 6 animais ($n=6$). Nestes animais foi comum encontrar forte edema na região da incisão, uma certa dificuldade em expor o coração para realização do procedimento e já era possível perceber aderências nos tecidos circunvizinhos. Efusão pleural também foi um achado comum nesses animais. Além disso, letargia e taquipneia foram

encontrados em alguns animais e estes geralmente eram os que culminavam em óbito durante a segunda cirurgia.

Alguns animais dos diferentes grupos experimentais faleceram durante alguma fase dos experimentos. No entanto, nenhuma das mortes ocorreu espontaneamente; ou seja, todos os óbitos ocorridos durante todo o tempo de experimento aconteceram durante a realização de algum procedimento (como realização dos exames, por exemplo) em que os animais precisavam ser anestesiados para serem manipulados, sugerindo que o estado geral desses animais representava um risco considerável para procedimentos anestésicos ou invasivos.

É interessante ressaltar que, exceto por aqueles animais que morreram durante a segunda cirurgia (devido ao caráter extremamente invasivo desse procedimento cirúrgico), “todos” os óbitos ocorridos posteriormente aconteceram apenas no Grupo dos não tratados e no grupo experimental dos animais receberam o tratamento com células injetadas por via endovenosa (Grupo T2). Nenhuma morte de animais foi constatada no grupo experimental que recebeu as células por injeção direta na região periférica do coração (Grupo T1), mesmo considerando que os procedimentos realizados neste grupo foram visivelmente mais “cruentos” ou invasivos do que os realizados nos demais grupos, já que neste grupo os animais sofreram duas toracotomias num período de 24 (vinte quatro) horas entre elas.

Importante ressaltar que todos os exames ou procedimentos só foram realizados depois que os animais foram anestesiados, utilizando o protocolo já

descrito anteriormente (Xilazina e Cetamina) para que houvesse uniformidade na coleta dos dados e comparações, fazendo que todos os grupos fossem submetidos as mesmas rotinas e desafios.

4.4 Eletrocardiograma

Eletrocardiograma dos animais antes e depois da cirurgia para obtenção do infarto do miocárdio

Os principais parâmetros eletrocardiográficos dos animais antes e após a cirurgia para produção do infarto pode ser visualizado na **Tabela 1**.

Tabela 1: Parâmetros eletrocardiográficos dos animais antes e após a cirurgia para obtenção do infarto do miocárdio.

Parâmetros Eletrocardiográficos	Pré infarto	Pós infarto
Onda Q em D1 (mV)	0 ± 0	0,241 ± 0,11**
Índice de QRS	1,342 ± 0,186	0,838 ± 0,15**
Índice QRS em D1	0,31 ± 0,095	0,248 ± 0,125
Índice QRS em D2	0,632 ± 0,106	0,312 ± 0,123*
Índice QRS em D3	0,4 ± 0,094	0,325 ± 0,188
Ângulo de QRS	+60,45 ± 11,27	+133,63 ± 26,01***
Intervalo RR (s)	0,205 ± 0,017	0,194 ± 0,026
FC (bpm)	293,98 ± 25,85	314,52 ± 42,057
Onda P (mV)	0,065 ± 0,014	0,082 ± 0,029
Intervalo PR (s)	0,046 ± 0,008	0,044 ± 0,010
Duração da onda P (s)	0,027 ± 0,008	0,025 ± 0,008
Onda Q em D2 (mV)	0 ± 0	0,135 ± 0,442
Onda R em D2 (mV)	0,63 ± 0,104	0,61 ± 0,102
Onda S em D2 (mV)	0,002 ± 0,012	0,002 ± 0,013
Onda T (mV)	0,159 ± 0,037	0,155 ± 0,028
Duração da Onda T (s)	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,02
Duração do QT (s)	0,087 ± 0,013	0,086 ± 0,012
Onda Q em D3 (mV)	0,002 ± 0,009	0,001 ± 0,006
Onda R em D3 (mV)	0,382 ± 0,090	0,380 ± 0,08
Onda S em D3 (mV)	0,016 ± 0,051	0,014 ± 0,053

Parâmetros Eletrocardiográficos dos animais antes e após a cirurgia para obtenção do IM nos ratos. N=28 animais. Realizado teste t de "student". Todos os valores expressos como Média ± Desvio Padrão. *p < 0,05; **p < 0,01; *** p < 0,001.

Nenhum dos animais apresentou Onda Q em D1 antes da cirurgia para produzir o IM, que conforme a literatura é uma característica do IM experimental em ratos (Miranda et al. 2007). Por outro lado, todos os animais infartados tiveram a presença de Onda Q nesta derivação, cuja amplitude foi variável entre os animais. A maioria das ondas Q presente estava no formato QS, sendo que nos poucos animais onde a onda R foi observada, esta se apresentava com a amplitude extremamente reduzida.

A presença da onda Q em D2 nos animais infartados, foi um achado comum, mas não presente em todos os animais, e geralmente naqueles em que foi encontrada, tinha uma amplitude reduzida. O índice de QRS nesta derivação foi reduzido no grupo infartado ($p < 0.05$).

O eletrocardiograma na derivação D3 foi pouco alterado depois da cirurgia.

O índice de QRS total se mostrou relativamente homogêneo antes da cirurgia, bem como o ângulo de despolarização ventricular médio ($\hat{A}QRS$). O IQRS foi em média de $1,34 \text{ mV} \pm 0,19$. Enquanto o $\hat{A}QRS$, outro parâmetro que se altera depois do infarto, teve valor média de $+60,45 \pm 11,27$ graus, com o maior ângulo encontrado de $+85,24$ graus, ou seja, todos os animais normais tiveram ângulos de despolarização pertencentes ao primeiro quadrante. O somatório das alterações dos índices de QRS medidos nas derivações fez com que os animais depois de infartados tivessem uma menor amplitude do índice de QRS total ($p < 0.01$), que pode ser visualizado na figura 16. Além disso, Os animais depois de infartados tiveram o $\hat{A}QRS$ drasticamente aumentado, significando que o eixo foi desviado para

a direita ($p < 0.001$). O menor ângulo encontrado foi de + 95,85 graus, sendo a média do grupo de 133,63 graus, situando, portanto, todos os ângulos no segundo quadrante. Esse achado esteve presente em todos os animais infartados, independente da extensão do IM e pode ver visualizado na figura 17.

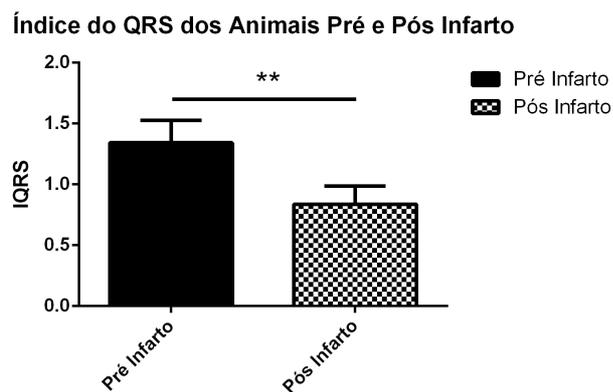


Figura 16: Figura mostrando o gráfico do IQRS dos animais antes e após a cirurgia para produção do IM, mostrando uma queda desse parâmetro após o IM. N=28 animais. Realizado teste t de student. Todos os valores expressos como Média \pm Desvio Padrão. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

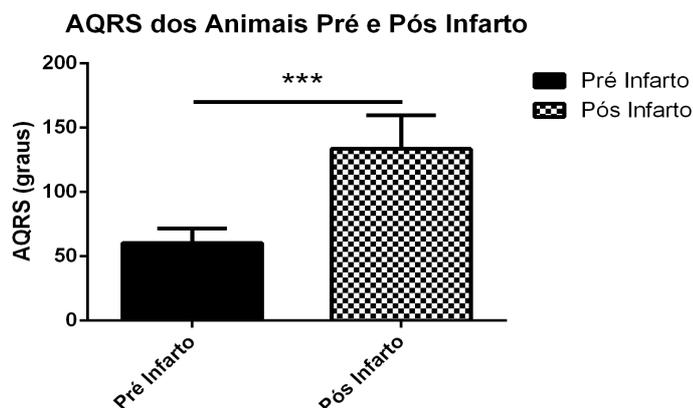


Figura 17: Figura mostrando o gráfico do Eixo de despolarização ventricular médio dos animais antes e após a cirurgia para produção do IM, mostrando um aumento desse parâmetro após o IM, fazendo com que o eixo se deslocasse do primeiro quadrante para o segundo. N=28 animais. Realizado teste t de student. Todos os valores expressos como Média \pm Desvio Padrão. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Os animais sob anestesia tiveram frequência cardíaca média de $294 \pm 25,85$ bpm e intervalo RR de $0,205 \pm 0,017$ segundos. O intervalo PR foi de $0,046 \pm 0,008$ segundos, sendo a duração de QRS de 0,02 segundos, o intervalo QT de $0,087 \pm 0,013$ segundos. A onda P foi facilmente visível ao longo do traçado tendo amplitude média de $0,065 \pm 0,014$ mV e duração de $0,027 \pm 0,008$ segundos. Não houve diferenças significativas nos intervalos PR, duração do QRS e intervalo QT, assim como, na duração da onda P, depois do infarto.

Todos essas alterações foram condizentes com a literatura (Miranda et al. 2007; Saraiva et al. 2007) e caracterizam o infarto em ratos. A Figura 18 mostra um traçado eletrocardiográfico de um rato normal e o traçado deste animal depois do IM, onde se evidencia a presença da Onda Q.

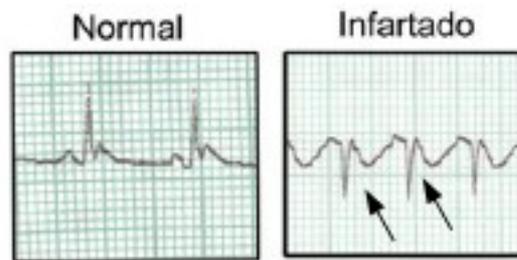


Figura 18: Eletrocardiograma na derivação D1 de um rato normal e depois da cirurgia de IM. Antes da cirurgia, o ECG não apresentou onda Q em D1. Após a cirurgia, já foi possível observar a presença da Onda Q, geralmente no formato QS (setas na figura). Velocidade do papel de 50 mm/s e 20 mV/mm.

Parâmetros Eletrocardiográficos quando se considera os Grupos Experimentais

Os principais parâmetros eletrocardiográficos dos grupos experimentais podem ser visualizados na **Tabela 2**. O AQRS, como já discutido anteriormente, aumentou depois do IM em todos os grupos experimentais e permaneceu aumentado até o final do tempo de acompanhamento, em todos os grupos experimentais. Comparando-se os grupos entre si, o AQRS não foi significativamente diferente entre o grupo T2 e o grupo não tratado. No entanto, o Grupo T1 apresentou uma diminuição significativa no valor desse parâmetro, quando avaliado com 7 e com 28 dias ($p < 0,001$, em ambos os tempos) de experimento, se comparado com o grupo não tratado e com o grupo T2 ($p < 0,05$). Além disso, existiu uma melhora nesse parâmetro quando se comparou os valores apresentados nos dias 7 ($p < 0,01$) e 28 ($p < 0,001$) com os valores que foram encontrados no dia 1; ou seja, com o dia em que os animais foram infartados, sugerindo melhoras ao longo do tempo no grupo T1. O mesmo não ocorreu com o grupo não tratado e com o grupo

T2, o qual só apresentou uma ligeira queda do AQRS com 28 dias ($p < 0,05$). Apesar dessas melhoras, em nenhum dos grupos o valor do AQRS retornou ao patamar que tinham antes do IM (figura 19).

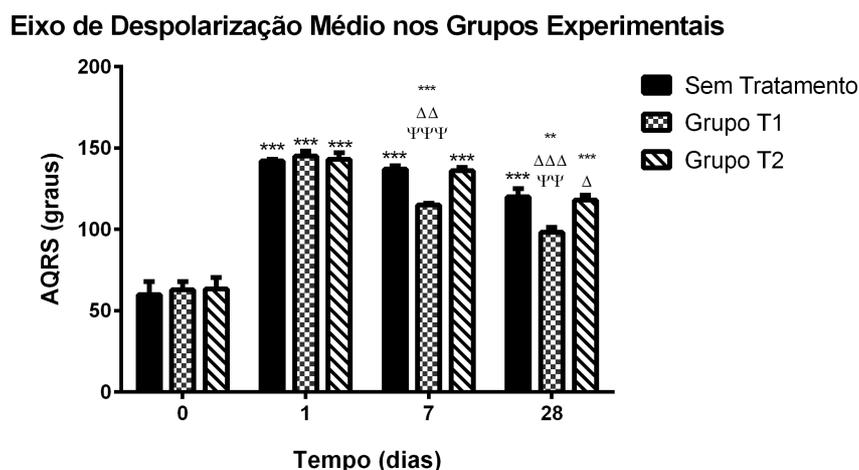


Figura 19: Gráfico mostrando o Eixo de Despolarização Ventricular Médio nos grupos experimentais. Tempo zero corresponde ao exame dos animais antes do IM. Valores indicados com (*), significam que a comparação foi realizada intra grupo com os valores do dia 0 (controle); ou seja, com o próprio animal antes da cirurgia; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Δ também significa que a comparação foi realizada intra grupo; ou seja, com o próprio animal, mas com os valores encontrados no dia 1, que eram os valores no início do IM; $\Delta p < 0,05$; $\Delta\Delta p < 0,01$; $\Delta\Delta\Delta p < 0,001$. \dagger significa que a comparação foi realizada contra o grupo Não Tratado no mesmo tempo de observação; $\dagger p < 0,05$; $\dagger\dagger p < 0,01$; $\dagger\dagger\dagger p < 0,001$. O gráfico mostra que o AQRS aumentou em todos os grupos depois do IM; porém T1 apresentou redução desse valor com 7 e 28 dias quando comparado com o próprio grupo ou em contraste com o grupo sem tratamento. O grupo T2 apresentou redução deste valor com 28 dias, quando comparado com o valor que apresentava logo após o IM. Valores expressos em média \pm desvio padrão.

O Índice de QRS total (IQRS), que serve para estimar a voltagem gerada no coração, também não apresentou diferença significativa entre o grupo não tratado e

o grupo T2, apresentando-se com valores baixos, nesses grupos, até o final do experimento. Os animais que receberam o tratamento com CDTA injetada diretamente na região infartada (Grupo T1) apresentaram valores médios ligeiramente superiores que os encontrados nos animais dos demais grupos com 28 dias ($p < 0,05$).

Os demais parâmetros eletrocardiográficos não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos experimentais.

Tabela 2: Parâmetros Eletrocardiográficos dos Grupos Experimentais.

Parâmetros	Grupos Experimentais											
	Grupo Não Tratado (n=6) Tempo pós-cirúrgico				Grupo T1 (n=6) Tempo pós-cirúrgico				Grupo T2 (n=6) Tempo pós-cirúrgico			
	0	1	7	28	0	1	7	28	0	1	7	28
AQRS (graus)	59,8±8	142,0±1 ^{***}	137,0±2 ^{***}	120,0±5 ^{***}	62,8±5	145,0±3 ^{***}	115,0±1 ^{***ΔΔ†††}	98,13±3 ^{**ΔΔΔ†††}	63,4±7	143,0±4 ^{***}	136,0±2 ^{***}	118,0±3 ^{***Δ}
IQRS (mV)	1,378±0,152	0,97±0,02 ^{***}	0,89±0,03 ^{***}	0,85±0,02 ^{***}	1,258±0,126	1,07±0,01 [*]	1,03±0,03 ^{*Δ}	1,178±0,02 ^{*Δ†}	1,248±0,152	0,84±0,04 [*]	0,82±0,02 [*]	0,86±0,03 [*]

Parâmetros Eletrocardiográficos nos Grupos Experimentais. AQRS – Eixo de Despolarização Ventricular Médio no Plano Frontal, expressos em Graus. IQRS – Índice de QRS, medidos em milivolts (mV). **Todos os valores expressos como Média ± Desvio Padrão.**

*** Comparação intra grupo com o dia 0 (controle), ou seja; com o próprio animal antes da cirurgia; *p < 0,05; **p < 0,01; *** p < 0,001.**

Δ Comparação intra grupo com o dia 1, ou seja; com o próprio animal, mas no início do IM; Δ p < 0,05; ΔΔ p < 0,01; ΔΔΔ p < 0,001.

† Comparação com o grupo não tratado no mesmo tempo de observação; † p < 0,05; †† p < 0,01; ††† p < 0,001.

4.5 Ecocardiograma

Ecocardiografia dos animais antes e depois da cirurgia para produção do infarto do miocárdio

Os principais parâmetros ecocardiográficos dos animais antes e após a cirurgia para produzir IM podem ser observados na **tabela 3**. Como mencionado anteriormente, o ecocardiograma foi usado para medições das dimensões de cavidades e paredes, ambas pelo modo M e fluxo através da ecodopplecardiografia. Os animais normais tiveram diâmetro da aorta médio de e diâmetro do átrio esquerdo medido no mesmo corte.

Tabela 3: Parâmetros Ecocardiográficos antes e após a cirurgia para produção de infarto.

Parâmetros Ecocardiográficos	Pré infarto	Pós infarto
Diâmetro da aorta (mm)	3,27 ± 0,37	3,29 ± 0,299
Diâmetro do átrio esquerdo (mm)	3,30 ± 0,51	4,09 ± 1,033***
Relação Átrio esquerdo/ Aorta	1,014 ± 0,145	1,250 ± 0,299***
DDF (mm)	5,72± 0,96	7,776 ± 1,016*
DSF (mm)	2,04 ± 0,71	5,913 ± 1,139*
PAD (mm)	0,94 ± 0,11	0,777± 0,77*
PPD (mm)	0,94 ± 0,11	0,856 ± 0,069
PAS (mm)	2,11 ± 0,28	0,815 ± 0,218*
PPS (mm)	2,12± 0,20	2,017 ± 0,262
FEM (Modo M) %	92,16 ± 4,17	53,24 ± 10,85***
FE (Modo M) %	64,61 ± 11,71	24,44 ± 6,53***
FES Simpson (%)	76,71 ± 8,07	39,57 ± 11,55***

DDF- Diâmetro do Ventrículo esquerdo medido no final da diástole. DSF- Diâmetro do Ventrículo esquerdo medido final da sístole. PAD- Espessura da parede anterior do Ventrículo esquerdo em diástole. PPD- Espessura da parede posterior do Ventrículo esquerdo em diástole. PAS- Espessura da parede anterior do Ventrículo esquerdo em sístole. PPS - Espessura da parede posterior do Ventrículo esquerdo em sístole. Todos

esses valores em milímetros e medidos no Modo M. FEM- Fração de ejeção em percentual medida no Modo M. FE- Fração de encurtamento em percentual medida no Modo M. FES - Fração de ejeção em percentual medida pelo método de Simpson. Todos os valores expressos como Média \pm Desvio Padrão. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Considerando que o diâmetro da aorta costuma variar muito pouco sobre várias condições, a relação entre átrio esquerdo e a aorta costuma ser utilizada para avaliação do aumento ou dilatação atrial. Nos animais antes do IM, essa relação ficou em 1,014. Posterior a cirurgia para a produção do IM, o diâmetro da aorta não variou significativamente nos animais, porém o diâmetro do átrio esquerdo aumentou depois da cirurgia de infarto ($p < 0,001$) fazendo com que a relação Ae/Ao, que melhor expressa esse aumento, uma vez que compensa eventuais diferenças de peso, se mostrasse também aumentada ($p < 0,001$).

Foram medidos dois índices de função sistólica no modo M: fração de ejeção (FEM) e fração de encurtamento (FE). A FEM ficou em torno de 94 % e a FE em 64 %. A menor FEM e a FE encontrada nos animais antes da cirurgia foi de 78 % e 41%, respectivamente. A fração de ejeção pelo método de Simpson foi de 77%, com o menor valor encontrado de 60 %. Houve uma queda acentuada desses valores com o IM, mostrando que a função sistólica desses animais ficaram bem prejudicadas, independentemente da metodologia empregada para sua mensuração (tabela 3).

A frequência cardíaca durante os exames ecocardiográficos não variou significativamente, o que diminuiu a influência deste fator nas medidas efetuadas no modo M e no eco doppler. A espessura da parede posterior (em sístole e em

diástole) não variou significativamente depois do infarto. Porém, o mesmo não ocorreu com a parede anterior que teve sua espessura diminuída depois do infarto ($p < 0,05$). O diâmetro da cavidade ventricular no final da sístole e da diástole, também sofreu aumento com o infarto ($p < 0,05$).

Ecocardiografia dos grupos experimentais

De um modo geral, os animais que receberam as CDTAs injetadas diretamente na borda da região infartada (Grupo T1) tiveram alguma melhora nos índices utilizados para a avaliação da função cardíaca, quando comparado com os animais do grupo não tratado. Essa melhora não foi tão evidente nos animais que receberam as células por via endovenosa (Grupo T2).

Fração de Ejeção no Modo M

Os gráficos mostrando o comportamento da Fração de Ejeção no Modo M (FEM) podem ser visualizado nas figuras **20, 21, 22 e 23**. Cabe ressaltar que não houve diferença estatística na mensuração da frequência cardíaca (FC) entre os grupos durante a realização dos exames, que é uma variável capaz de influenciar nas medidas realizadas no Modo M pelo ECO.

Na **Figura 20** é possível observar o comportamento do grupo não tratado isoladamente ao longo do tempo. A FEM foi baixa, como esperado em animais infartados (Miranda et al. 2007) e se manteve dessa forma durante todo o tempo de observação. Por outro lado, o Grupo T1 parece recuperar parte da FEM com 7 (sete) dias pós-tratamento ($p < 0,001$) e a melhora persistiu por, pelo menos, até 28 (vinte oito) dias após o tratamento ($p < 0,001$); quando se comparou os animais do próprio

grupo, (os próprios animais do grupo servindo como seus controles), como pode ser observado na figura 21. Não houve diferença significativa no grupo em que os animais receberam as células por via endovenosa (Grupo T2), quando os comparamos com eles mesmos ao longo do tempo (figura 22).

Fração de Ejeção no Modo M (Grupo Sem Tratamento)

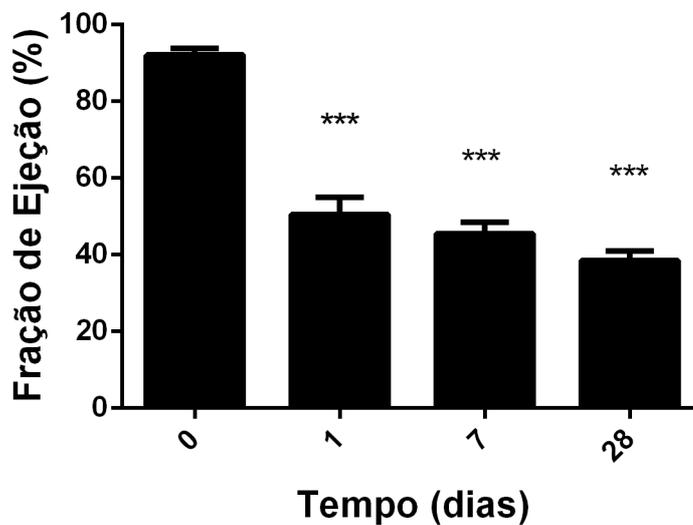


Figura 20: Gráfico mostrando a Fração de Ejeção medido com o ecocardiograma no modo M em % (FEM) do grupo sem tratamento, ao longo do tempo, Como pode ser observado, a FEM diminuiu no grupo sem tratamento ao longo do tempo. Análise realizada intra grupo, tendo como contraste o exame realizado no dia zero que é considerado antes da cirurgia de IM. N= 6 animais. Realizado ANOVA de uma via como teste estatístico. Todos os valores expressos como Média \pm Erro Padrão da Média. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. * representa significância em relação ao tempo zero (antes da cirurgia de IM).

Fração de Ejeção no Modo M (Grupo T1)

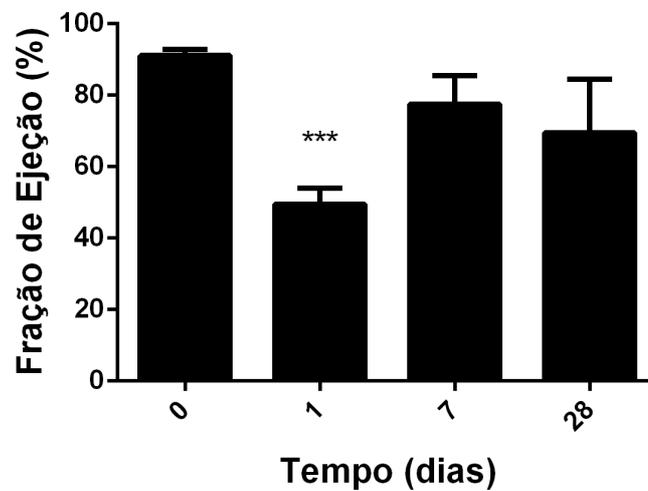


Figura 21: Gráfico mostrando a Fração de Ejeção medido com o ecocardiograma no modo M do grupo que recebeu o tratamento com as células injetadas na borda da lesão (peri infarto) ao longo do tempo, Como pode ser observado, a FEM diminuiu com o IM (dia 1), mas se recuperou nos dias seguintes, após o tratamento. Análise realizada intra grupo, tendo como contraste o exame realizado no dia zero que é considerado sem qualquer tratamento. N= 6 animais. Realizado ANOVA de uma via como teste estatístico. Todos os valores expressos como Média \pm Erro Padrão da Média. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. * representa significância em relação ao tempo zero (antes da cirurgia de MI).

Fração de Ejeção no Modo M (Grupo T2)

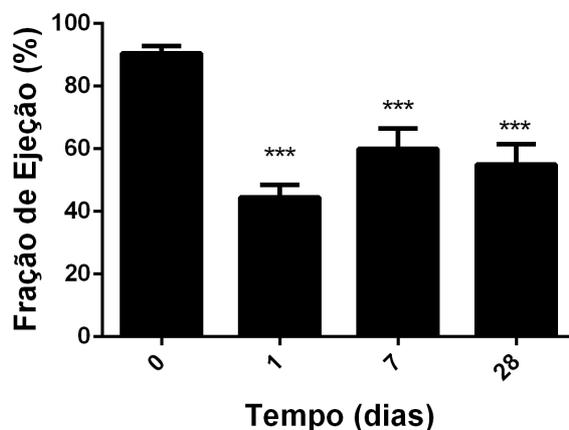


Figura 22: Gráfico mostrando a Fração de Ejeção medido com o ecocardiograma no modo M do grupo que recebeu o tratamento com as células injetadas na veia da cauda ao longo do tempo (grupo T2). Como pode ser observado, a FEM diminuiu com o IM (dia 1) e se manteve relativamente baixo após o tratamento. Análise realizada intra grupo, tendo como contraste o exame realizado no dia zero que é considerado antes da cirurgia de IM. N= 6 animais. Realizado ANOVA de uma via como teste estatístico. Todos os valores expressos como Média \pm Erro Padrão da Média. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (*) representa significância em relação ao tempo zero (antes da cirurgia de IM).

Quando os grupos são comparados entre si, percebeu-se que a FEM no grupo T1 foi maior do que nos demais grupos, quando se comparou o mesmo tempo de observação. Antes da cirurgia e antes do tratamento, ou seja, nos dias zero e no dia 01 (um) todos os grupos apresentavam a mesma média de FEM, o que equivale a dizer que ambos os grupos partiram do mesmo valor basal médio de FEM. Com 7 (sete) dias de tratamento o Grupo T1 se destacou em relação aos demais ($p < 0,001$) e essa diferença ainda foi perceptível até o fim do experimento ($p < 0,001$). A FEM no grupo T1 aumentou nos dias 7 e 28, tanto quanto se comparou com os valores que tinham logo após a cirurgia (dia 1), tanto quanto se comparou usando o grupo sem tratamento como contraste. De uma maneira geral, não houve melhora

no grupo T2 quando comparado com o grupo que não recebeu tratamento com 7 dias, mas apresentou uma ligeira melhora nesse parâmetro com 28 dias. A observação de todos os grupos juntos se encontra na figura 23.

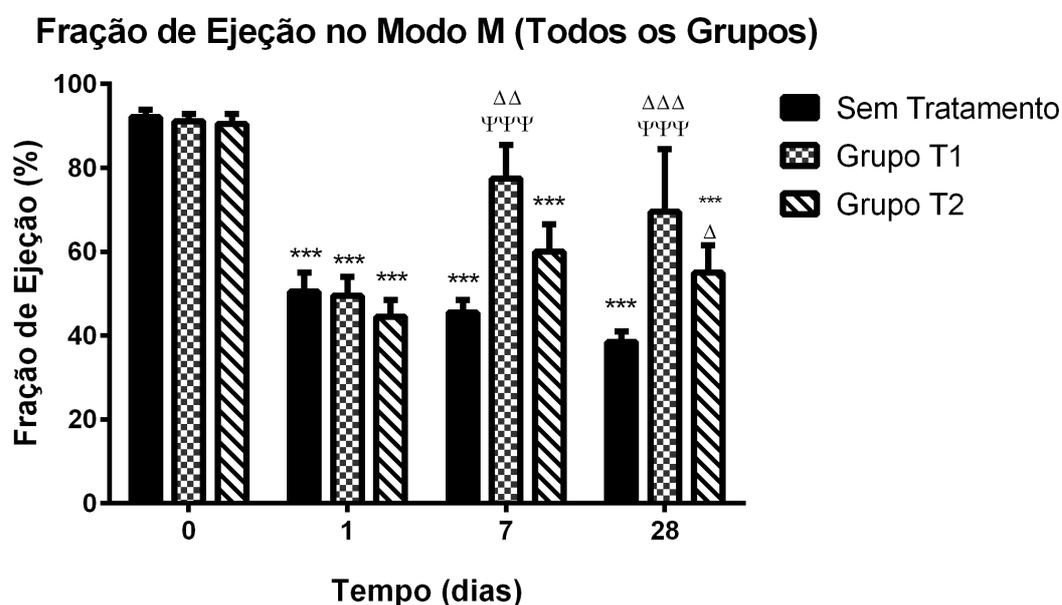


Figura 23: Gráfico mostrando a Fração de Ejeção em % medida no ecocardiograma no modo M de todos os grupos experimentais. Valores indicados com (*) significam que a comparação foi realizada intra grupo com os valores do dia 0 (controle); ou seja, com o próprio animal antes da cirurgia; *p < 0,05; **p < 0,01; *** p < 0,001. (Δ) significa que a comparação foi realizada intra grupo; ou seja, com o próprio animal, mas com os valores encontrados no dia 1, que eram os valores no início do IM; Δ p < 0,05; ΔΔ p < 0,01; ΔΔΔ p < 0,001. (†) significa que a comparação foi realizada contra o grupo Não Tratado no mesmo tempo de observação; † p < 0,05; †† p < 0,01; ††† p < 0,001. O gráfico mostra que o grupo não tratado apresentou valor FEM baixo depois do IM e permaneceu com esse valor reduzido até o fim da observação. O grupo T1 apresentou recuperação do valor da FEM nos dias 7 e 28, atingindo valores similares aos encontrados antes do IM. Com 7 e 28 dias, o grupo T1 também teve um valor de FEM maior do que o grupo não tratado nestes mesmos tempos. O grupo T2 só apresentou melhora com 28 dias, quando comparado com o mesmo tempo dos animais que não receberam nenhum tratamento. Todos os valores foram expressos como Média ± Erro Padrão da Média. Foi usado ANOVA de duas vias e Tukey para análise estatística.

Fração de Encurtamento no Modo M

Na figura 24 observamos o comportamento da FE do grupo que não recebeu nenhum tratamento. Como esperado, a FE deste grupo se manteve baixa até o final do tempo de experimento.

Fração de Encurtamento no Modo M (Grupo Sem Tratamento)

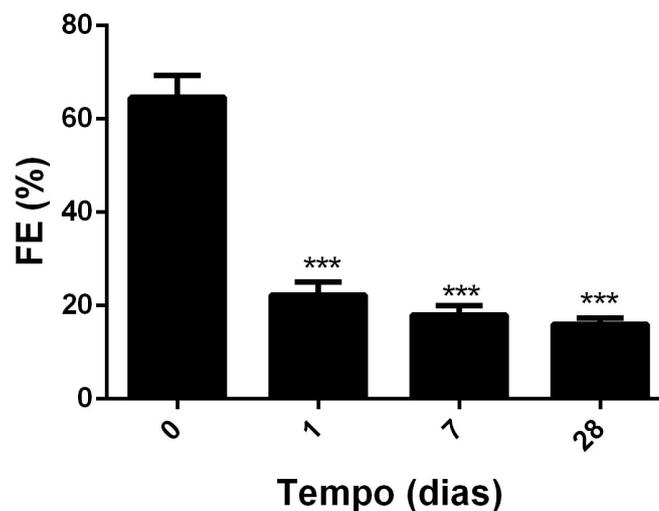


Figura 24: Gráfico mostrando a Fração de Encurtamento (FE) em % medido no ecocardiograma no modo M do grupo sem tratamento ao longo do tempo. Como pode ser observado, a FE diminuiu no grupo sem tratamento ao longo do tempo. Análise realizada intra grupo, tendo como contraste o exame realizado no dia zero que é considerado antes da cirurgia de IM. N= 6 animais. Realizado ANOVA de uma via como teste estatístico. Todos os valores expressos como Média \pm Erro Padrão da Média. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (*) representa significância em relação ao tempo zero (antes da cirurgia de IM).

O Grupo T1 apresentou uma diminuição da FE no dia 1 como consequência do IM ($p < 0.001$), mas apresentou um aumento da FE no tempo 7 (sete) e 28 (vinte oito) dias pós-infarto (figura 25), quando se compara com as médias obtidas pelos animais do mesmo grupo antes do tratamento ($p < 0,01$). Mais uma vez, a melhora da variável se manteve até o término do tempo de observação.

Fração de Encurtamento no Modo M (Grupo T1)

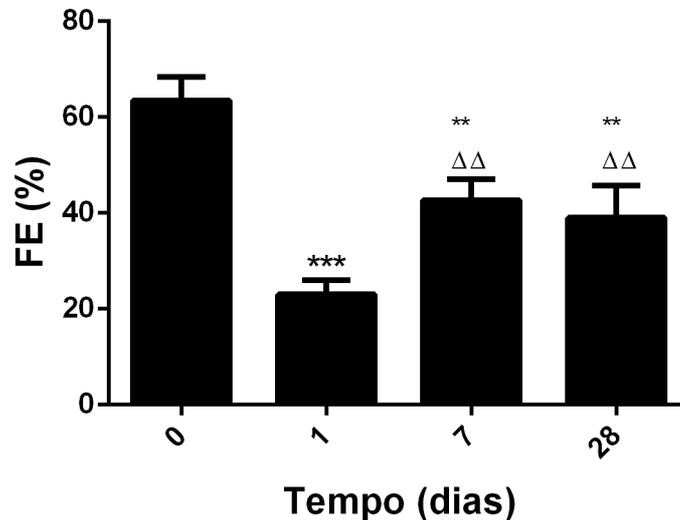


Figura 25: Gráfico mostrando a Fração de Encurtamento em % medida no ecocardiograma no modo M do grupo que recebeu o tratamento com as células injetadas na borda da lesão (peri infarto) ao longo do tempo. Como pode ser observado, a FE diminuiu com o IM (dia 1), mas se recuperou nos dias seguintes, após o tratamento, quando comparada ao dia do IM, mas ainda diferente dos valores obtidos antes do IM. Análise realizada intra grupo, tendo como contraste o exame realizado no dia zero que é considerado sem qualquer tratamento (*). N= 6 animais. Realizado ANOVA de uma via como teste estatístico. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (*) representa significância em relação ao tempo zero (antes da cirurgia de IM). (Δ) significa que a comparação foi realizada intra grupo; ou seja, com o próprio animal, mas com os valores encontrados no dia 1, que eram os valores no início do IM. Δ $p < 0,05$; ΔΔ $p < 0,01$; ΔΔΔ $p < 0,001$. Todos os valores expressos como Média \pm Erro Padrão da Média.

Como pode ser observado na figura 26 o grupo T2 apresentou queda no valor de FE após o IM e este valor permaneceu baixo até o final do experimento; não havendo, portanto, melhoras nesse parâmetro quando as células foram injetadas na veia da cauda.

Fração de Encurtamento no Modo M (Grupo T2)

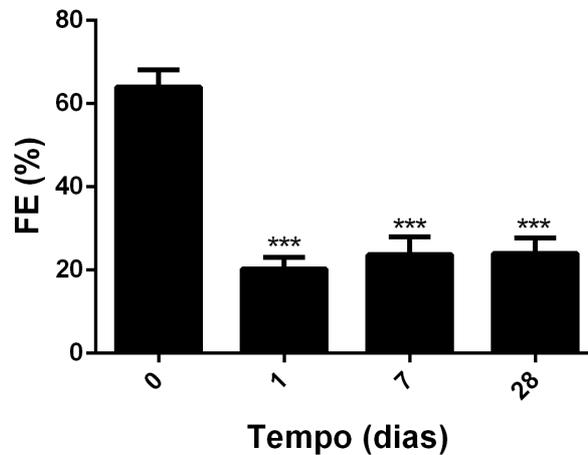


Figura 26: Gráfico mostrando a Fração de Encurtamento em % medido com o ecocardiograma no modo M do grupo que recebeu o tratamento com as células injetadas na veia da cauda (grupo T2). Como pode ser observado, a FE diminuiu com o IM (dia 1) e manteve-se baixa nos dias seguintes, após o tratamento. Análise realizada intra grupo, tendo como contraste o exame realizado no dia zero que é considerado sem qualquer tratamento (*). N= 6 animais. Realizado ANOVA de uma via como teste estatístico. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (*) representa significância em relação ao tempo zero (antes da cirurgia de IM). Todos os valores expressos como Média \pm Erro Padrão da Média.

Na comparação dos três grupos entre si, a FE se mostrou significativamente maior e, portanto, melhor no grupo que recebeu a injeção das células diretamente na periferia da lesão miocárdica do que nos grupos que as receberam por via endovenosa nos tempos 7 (sete) e 28 (vinte e oito dias) ($p < 0,001$) ou no grupo não tratado. Novamente percebemos que a FE, em média, não foi diferente nos grupos antes da realização dos tratamentos (dia 1) e que não existiu diferenças estatísticas entre o grupo T2 e o grupo não tratado após o tratamento (figura 27).

Fração de Encurtamento no Modo M (Todos os Grupos)

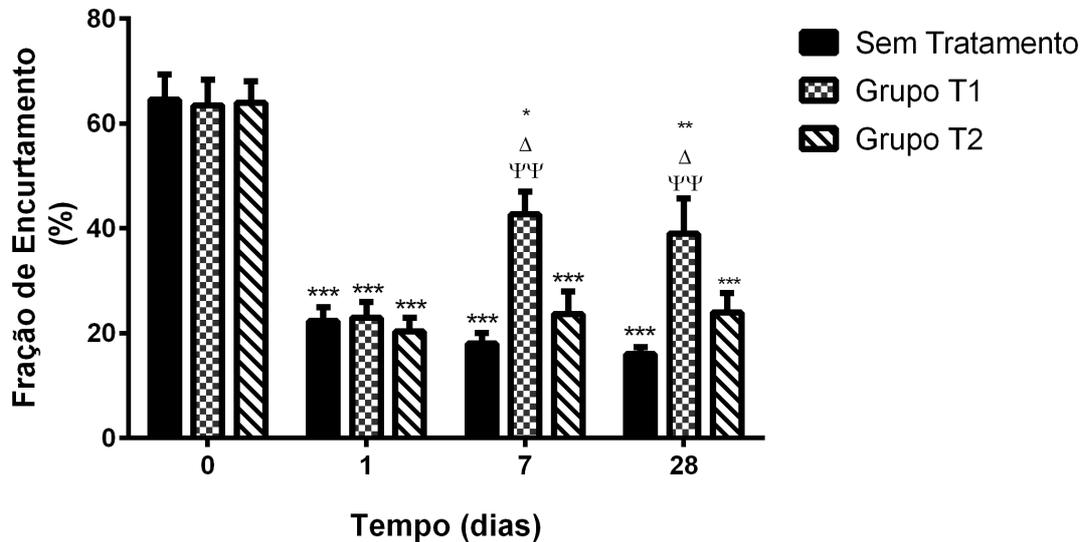


Figura 27: Gráfico mostrando a Fração de Encurtamento em % medido com o ecocardiograma no modo M de todos os grupos experimentais. Valores indicados com (*) significam que a comparação foi realizada intra grupo com os valores do dia 0 (controle); ou seja, com o próprio animal antes da cirurgia; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (Δ) significa que a comparação foi realizada intra grupo; ou seja, com o próprio animal, mas com os valores encontrados no dia 1, que eram os valores no início do IM; $\Delta p < 0,05$; $\Delta\Delta p < 0,01$; $\Delta\Delta\Delta p < 0,001$. (Ψ) significa que a comparação foi realizada contra o grupo Não Tratado no mesmo tempo de observação; $\Psi p < 0,05$; $\Psi\Psi p < 0,01$; $\Psi\Psi\Psi p < 0,001$. O gráfico mostra que o grupo não tratado apresentou valor FE baixo depois do IM e permaneceu com esse valor reduzido até o fim da observação. O grupo T1 apresentou recuperação do valor de FE nos dias 7 e 28, mas ainda ficando com valores inferiores aos encontrados antes do IM. Com 7 e 28 dias, o grupo T1 também apresentou um valor de FE maior do que o grupo não tratado nestes mesmos tempos. O grupo T2 não apresentou melhoras neste parâmetro depois do tratamento. Todos os valores expressos como Média \pm Erro Padrão da Média. Foi usado ANOVA de duas vias e Tukey para análise estatística.

Fração de Ejeção pelo Método de Simpson

Outra maneira de verificar a função do ventrículo esquerdo pelo ECO foi através da medida da Fração de Ejeção pelo Método de Simpson (FES). As figuras 28, 29, 30 e 31 mostram os valores obtidos dos grupos experimentais.

Na figura 28 pode-se verificar o comportamento do grupo sem tratamento ao longo do tempo, mostrando que o valor da FES reduziu-se após o IM e se manteve baixo durante o restante do período de tempo do experimento.

Fração de Ejeção pelo Simpson (Grupo Sem Tratamento)

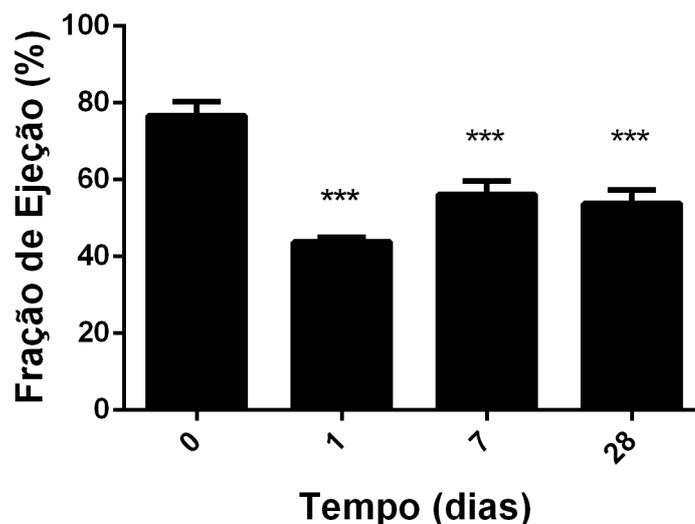


Figura 28: Gráfico mostrando a Fração de Ejeção medido pelo método de Simpson em % do grupo sem tratamento ao longo do tempo. Como pode ser observado, a FES diminui no grupo sem tratamento logo após o IM e permanece baixo ao longo do tempo. Análise realizada intra grupo, tendo como contraste o exame realizado no dia zero que é considerado antes da cirurgia de IM. N= 6 animais. Realizado ANOVA de uma via como teste estatístico. Todos os valores expressos como Média \pm Erro Padrão da Média. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (*) representa significância em relação ao tempo zero (antes da cirurgia de IM).

Na figura 29 pode ser observado o comportamento do Grupo T1, quando os animais foram confrontados com eles mesmos ao longo do tempo de experimentação. O valor da FES neste grupo quase dobrou de valor no sétimo dia após o tratamento e manteve-se ainda alto aos 28 (vinte e oito) dias, com valores equivalentes ao encontrado antes do IM.

Fração de Ejeção pelo Simpson(Grupo T1)

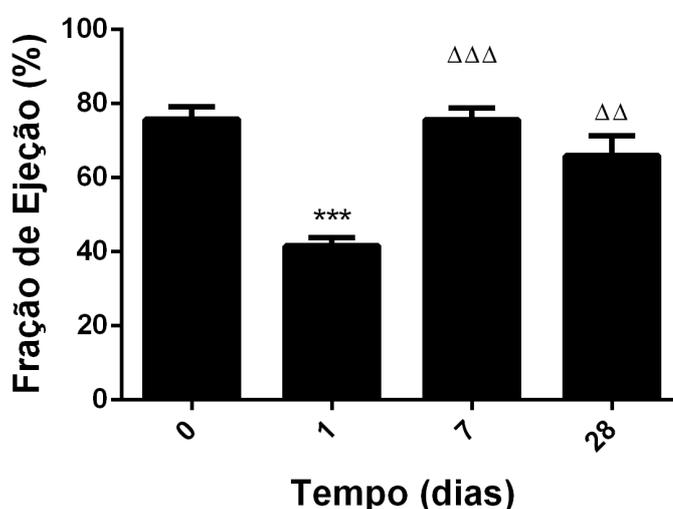


Figura 29: Gráfico mostrando a Fração de Ejeção em % medido no ecocardiograma pelo método de Simpson do grupo que recebeu o tratamento com as células injetadas na borda da lesão (peri infarto) ao longo do tempo. Como pode ser observado, a FES diminuiu com o IM (dia 1), mas se recuperou nos dias seguintes, após o tratamento, quando comparada ao dia do IM, chegando a valores similares aos encontrados antes do IM. Análise realizada intra grupo, tendo como contraste o exame realizado no dia zero que é considerado sem qualquer tratamento ou em relação ao dia 1 (dia do IM). N= 6 animais. Realizado ANOVA de uma via como teste estatístico. (*) representa significância em relação ao tempo zero (antes da cirurgia de IM) * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; enquanto (Δ) significa que a comparação foi realizada intra grupo; ou seja, com o próprio animal, mas com os valores encontrados no dia 1, que eram os valores no início do IM; Δ p < 0,05; ΔΔ p < 0,01; ΔΔΔ p < 0,001. Todos os valores expressos como Média ± Erro Padrão da Média.

Na figura 30 é mostrado a média de FES do grupo que recebeu o tratamento por via endovenosa (Grupo T2). Neste grupo, o valor de FES que caiu no dia 1, após a cirurgia de IM, se manteve baixo durante todo o período de observação.

Fração de Ejeção pelo Simpson (Grupo T2)

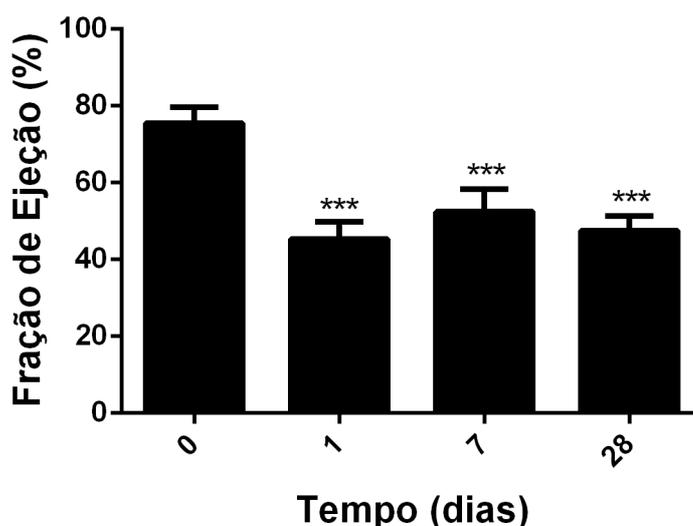


Figura 30: Gráfico mostrando a Fração de Ejeção em % medido no ecocardiograma pelo método de Simpson do grupo que recebeu o tratamento com as células injetadas na veia da cauda (grupo T2). Como pode ser observado, a FES diminuiu com o IM (dia 1) e manteve-se baixa nos dias seguintes, após o tratamento. Análise realizada intra grupo, tendo como contraste o exame realizado no dia zero que é considerado sem qualquer tratamento (*). N= 6 animais. Realizado ANOVA de uma via como teste estatístico. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (*) representa significância em relação ao tempo zero (antes da cirurgia de IM). Não houve diferença estatística quando os valores de 7 e 28 dias foram comparados com dia 1 (IM). Todos os valores expressos como Média \pm Erro Padrão da Média.

Na figura 31 são visualizados os três grupos experimentais no mesmo gráfico. Após a cirurgia de IM e antes dos tratamentos todos os grupos experimentais apresentavam valores médios de FES equivalentes. Porém, após sete dias, apenas

o Grupo T1 apresentou melhoras significativas neste parâmetro ($p < 0,001$) que persistiu no tempo 28 (vinte oito) dias e sem diferença significativa com os valores que tinham antes da produção do IM e também apresentou valores mais elevados quando se comparou com o grupo sem tratamento. O grupo T2 não apresentou valores de FES diferente do grupo não tratado.

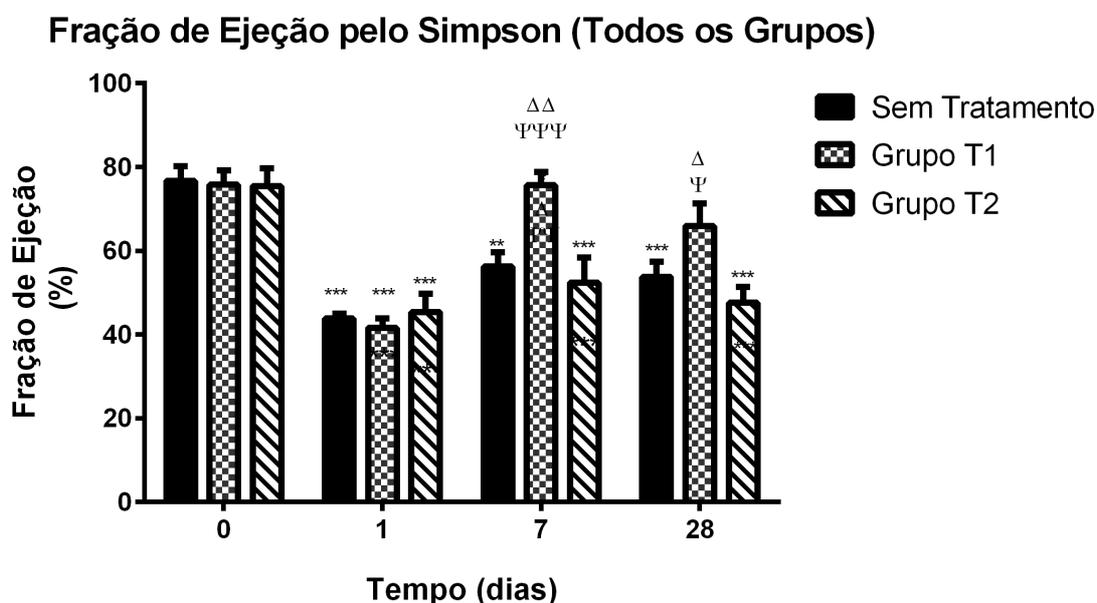


Figura 31: Gráfico mostrando a Fração de Ejeção em % medido no ecocardiograma com o método de Simpson de todos os grupos experimentais. Valores indicados com (*) significam que a comparação foi realizada intra grupo com os valores do dia 0 (controle); ou seja, com o próprio animal antes da cirurgia; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (Δ) significa que a comparação foi realizada intra grupo; ou seja, com o próprio animal, mas com os valores encontrados no dia 1, que eram os valores no início do IM; Δ $p < 0,05$; ΔΔ $p < 0,01$; ΔΔΔ $p < 0,001$. (†) significa que a comparação foi realizada contra o grupo não tratado no mesmo tempo de observação; † $p < 0,05$; †† $p < 0,01$; ††† $p < 0,001$. O gráfico mostra que o grupo não tratado apresentou valor FES baixo depois do IM e permaneceu com o valor reduzido até o fim da observação. O grupo T1 apresentou recuperação do valor de FES nos dias 7 e 28 para valores que não diferiram estatisticamente dos encontrados antes do IM. Com 7 e 28 dias, o grupo T1 também apresentou um valor de FES maior do que o grupo não tratado nestes mesmos tempos. O grupo T2 não apresentou melhoras neste parâmetro depois do tratamento. Todos os valores expressos como Média \pm Erro Padrão da Média. Foi usado ANOVA de duas vias e Tukey para análise estatística.

Mensuração do Débito Cardíaco

Também foi avaliado o Débito Cardíaco (DC) dos animais pelo ecocardiograma. O DC diminuiu com o IM e não houve diferença desse valor no grupo sem tratamento ao longo do tempo, conforme pode ser visto na figura 32.

Débito Cardíaco pelo Ecocardiograma (Grupo não tratado)

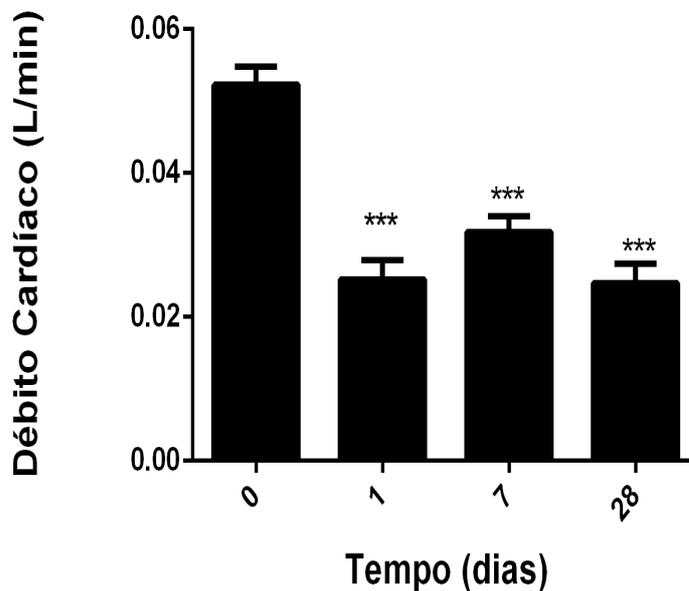


Figura 32: Gráfico mostrando o Débito Cardíaco (L/min) medido no ECO do grupo sem tratamento ao longo do tempo. Como pode ser observado, o DC diminuiu no grupo sem tratamento logo após o IM e permaneceu baixo ao longo do tempo. Análise realizada intra grupo, tendo como contraste o exame realizado no dia zero que é considerado antes da cirurgia de IM. N= 6 animais. Realizado ANOVA de uma via como teste estatístico. Todos os valores expressos como Média \pm Erro Padrão da Média. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (*) representa significância em relação ao tempo zero (antes da cirurgia de IM).

Houve uma queda do DC após o IM e que foi recuperado após o tratamento com a injeção na região peri infarto. Assim, houve um aumento significativo desse

parâmetro no sétimo dia seguinte ao tratamento no Grupo T1 ($p < 0,001$), que persistiu até o final do tempo de observação (Conforme pode ser visto na figura 33).

Débito Cardíaco pelo Ecocardiograma (Grupo T1)

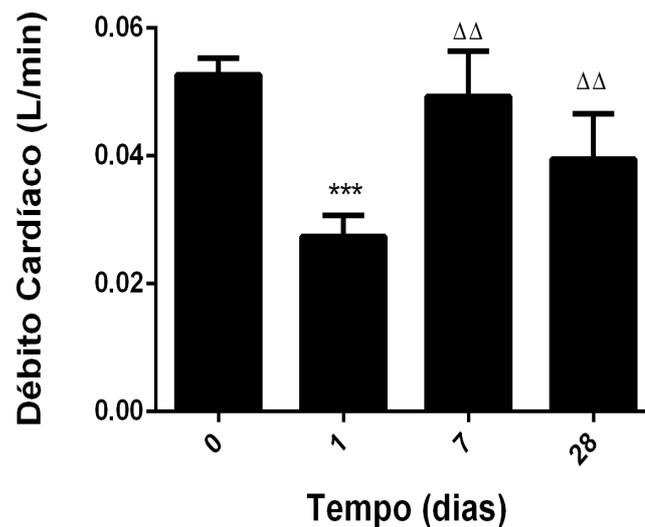


Figura 33: Gráfico mostrando o Débito Cardíaco (L/min) medido no ECO do grupo que recebeu o tratamento com as células injetadas na borda da lesão (peri infarto) ao longo do tempo. Como pode ser observado, o DC diminuiu com o IM (dia 1), mas se recuperou nos dias seguintes, após o tratamento, quando comparada ao dia do IM, chegando a valores similares aos obtidos antes do IM. Análise realizada intra grupo, tendo como contraste o exame realizado no dia zero que é considerado sem qualquer tratamento ou em relação ao dia 1 (dia do IM). N= 6 animais. Realizado ANOVA de uma via como teste estatístico. (*) representa significância em relação ao tempo zero (antes da cirurgia de IM) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; enquanto (Δ) significa que a comparação foi realizada intra grupo; ou seja, com o próprio animal, mas com os valores encontrados no dia 1, que eram os valores no início do IM; Δ $p < 0,05$; $\Delta\Delta$ $p < 0,01$; $\Delta\Delta\Delta$ $p < 0,001$. Todos os valores expressos como Média \pm Erro Padrão da Média.

O grupo experimental T2 também teve o DC diminuído depois do IM, que não se recuperou ao longo do tempo (figura 34).

Débito Cardíaco pelo Ecocardiograma (Grupo T2)

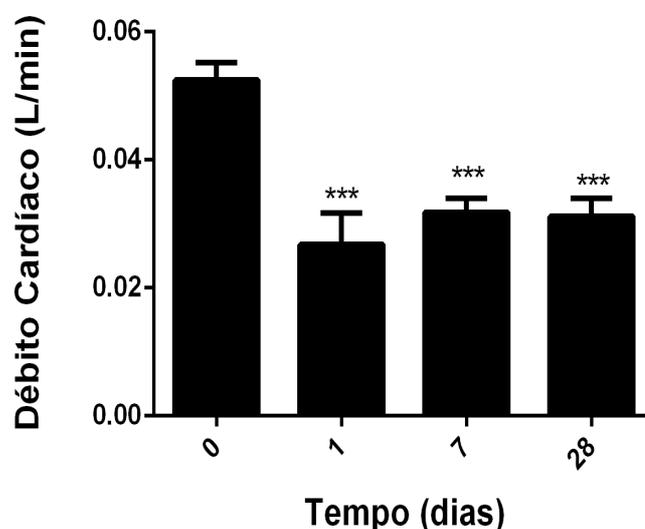


Figura 34: Gráfico mostrando o Débito Cardíaco (L/min) medido no ECO do grupo que recebeu o tratamento com as células injetadas na veia da cauda (grupo T2). Como pode ser observado, o DC diminuiu com o IM (dia 1) e manteve-se baixo nos dias seguintes, após o tratamento. Análise realizada intra grupo, tendo como contraste o exame realizado no dia zero que é considerado sem qualquer tratamento (*). N= 6 animais. Realizado ANOVA de uma via como teste estatístico. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (*) representa significância em relação ao tempo zero (antes da cirurgia de IM). Não houve diferença estatísticas quando os valores de 7 e 28 dias foram comparados com dia 1 (IM). Todos os valores expressos como Média \pm Erro Padrão da Média.

Quando foram analisados os grupos experimentais juntos (figura 35), se percebeu que antes dos tratamentos, os grupos tinham valores médios equivalentes de DC e com 7 e 28 dias apenas o grupo T1 se destacou positivamente em relação aos demais ($p < 0,001$). Além disso, apenas esse grupo apresentou melhoras quando comparados com o grupo que não recebeu tratamento.

Débito Cardíaco pelo Ecocardiograma (Todos os grupos)

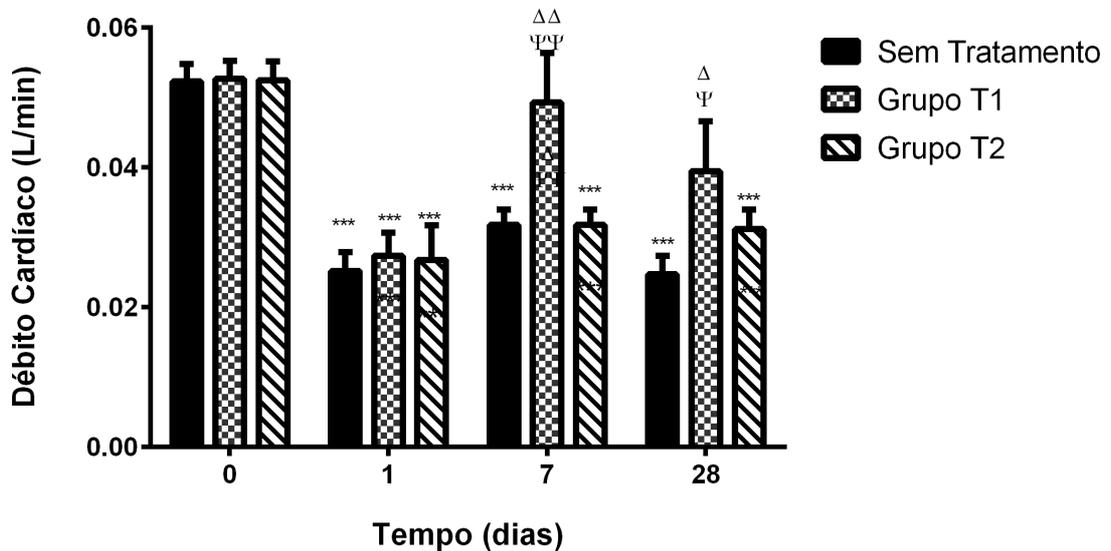


Figura 35: Gráfico mostrando o Débito Cardíaco (L/min) medido no ECO de todos os grupos experimentais. Valores indicados com (*) significam que a comparação foi realizada intra grupo com os valores do dia 0 (controle); ou seja, com o próprio animal antes da cirurgia; *p < 0,05; **p < 0,01; *** p < 0,001. (Δ) significa que a comparação foi realizada intra grupo; ou seja, com o próprio animal, mas com os valores encontrados no dia 1, que eram os valores no início do IM; Δ p < 0,05; ΔΔ p < 0,01; ΔΔΔ p < 0,001. (†) significa que a comparação foi realizada contra o grupo sem tratamento no mesmo tempo de observação; † p < 0,05; †† p < 0,01; ††† p < 0,001. O gráfico mostra que o grupo não tratado apresentou valor DC baixo depois do IM e permaneceu com o valor reduzido até o fim da observação. O grupo T1 apresentou recuperação do valor de DC, nos dias 7 e 28 para valores que não diferiram estatisticamente dos encontrados antes do IM. Com 7 e 28 dias, o grupo T1, também teve um valor de DC maior do que o grupo não tratado nestes mesmos tempos. O grupo T2 não apresentou melhoras neste parâmetro depois do tratamento. Todos os valores expressos como Média ± Erro Padrão da Média. Foi usado ANOVA de duas vias e Tukey para análise estatística.

Diâmetro do Ventrículo Esquerdo Medido pelo Ecocardiograma

A média dos valores do DDF do grupo sem tratamento pode ser visto na figura 36. Neste grupo, o DDF aumentou significativamente ao longo do tempo ($p < 0,05$).

Diâmetro Diastólico Final no Modo M (Grupo não tratado)

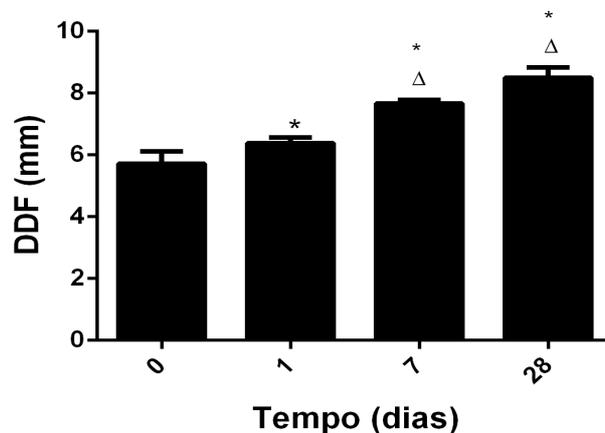


Figura 36: Gráfico mostrando o Diâmetro Diastólico Final (em mm) medido no ECO do grupo sem tratamento ao longo do tempo. Como pode ser observado, o DDF aumentou no grupo sem tratamento e continuou aumentando ao longo do tempo. N= 6 animais. Realizado ANOVA de uma via como teste estatístico. Todos os valores expressos como Média \pm Erro Padrão da Média. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (*) representa significância em relação ao tempo zero (antes da cirurgia de IM). (Δ) significa que a comparação foi realizada intra grupo; ou seja, com o próprio animal, mas com os valores encontrados no dia 1, que eram os valores no início do IM; $\Delta p < 0,05$; $\Delta\Delta p < 0,01$; $\Delta\Delta\Delta p < 0,001$.

O grupo que recebeu o tratamento com células injetadas na borda do IM apresentou aumento do DDF após o IM, mas não apresentou aumento significativo desse valor ao longo do tempo, conforme pode ser visualizado nas figuras 37.

Diâmetro Diastólico Final no Modo M (Grupo T1)

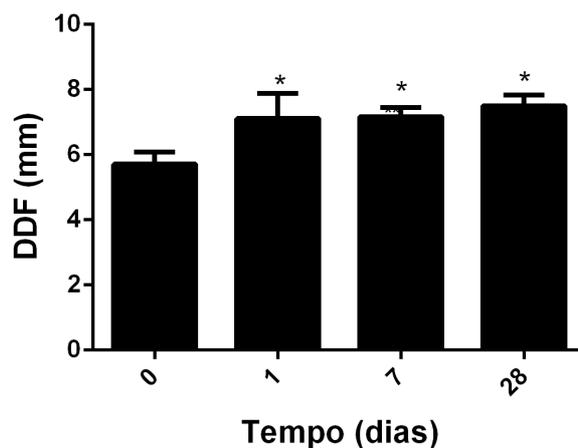


Figura 37: Gráfico mostrando o Diâmetro Diastólico Final (em mm) medido no ECO do grupo T1, ao longo do tempo. Como pode ser observado, o DDF aumentou no grupo T1 após o infarto, mas não aumentou ao longo do tempo com o tratamento com as células. N= 6 animais. Realizado ANOVA de uma via como teste estatístico. Todos os valores expressos como Média \pm Erro Padrão da Média. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (*) representa significância em relação ao tempo zero (antes da cirurgia de IM). (Δ) significa que a comparação foi realizada intra grupo; ou seja, com o próprio animal, mas com os valores encontrados no dia 1, que eram os valores no início do IM; $\Delta p < 0,05$; $\Delta\Delta p < 0,01$; $\Delta\Delta\Delta p < 0,001$.

O grupo que recebeu o tratamento com células injetadas por via endovenosa também apresentou aumento do DDF após o IM. Porém, não apresentou aumento significativo desse valor ao longo do tempo, conforme pode ser visualizado nas figuras 38.

Diâmetro Diastólico Final no Modo M (Grupo T2)

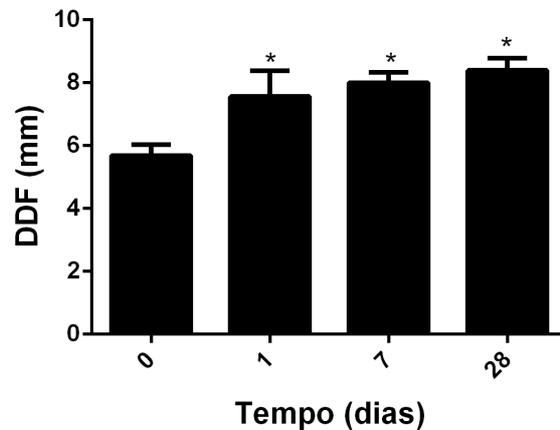


Figura 38: Gráfico mostrando o Diâmetro Diastólico Final (em mm) medido no ECO do grupo T2 ao longo do tempo. Como pode ser observado, o DDF aumentou no grupo T2 após o infarto, mas não aumentou ao longo do tempo. N= 6 animais. Realizado ANOVA de uma via como teste estatístico. Todos os valores expressos como Média \pm Erro Padrão da Média. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (*) representa significância em relação ao tempo zero (antes da cirurgia de IM). (Δ) significa que a comparação foi realizada intra grupo; ou seja, com o próprio animal, mas com os valores encontrados no dia 1, que eram os valores no início do IM; $\Delta p < 0,05$; $\Delta\Delta p < 0,01$; $\Delta\Delta\Delta p < 0,001$.

Analisando os dados, confrontando os grupos experimentais entre si, não houve diferenças estatísticas no DDF entre os grupos, conforme pode ser visualizado na figura 39.

Diâmetro Diastólico Final no Modo M (Todos os grupos)

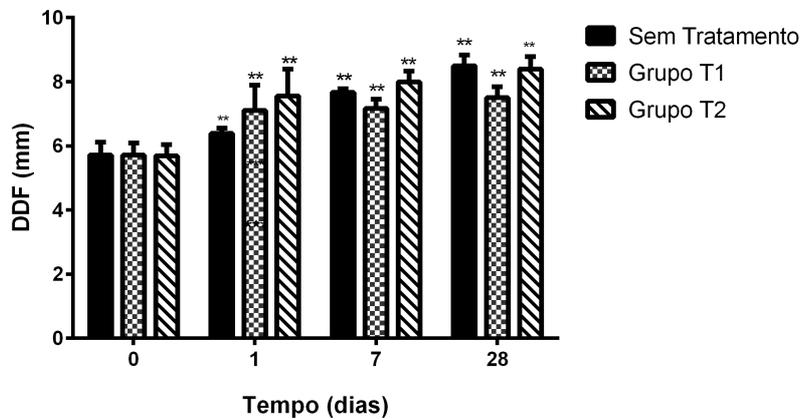


Figura 39: Gráfico mostrando o DDF (mm) medido no ECO de todos os grupos experimentais. Valores indicados com (*) significam que a comparação foi realizada intra grupo com os valores do dia 0 (controle); ou seja, com o próprio animal antes da cirurgia; *p < 0,05; **p < 0,01; *** p < 0,001. (Δ) significa que a comparação foi realizada intra grupo; ou seja, com o próprio animal, mas com os valores encontrados no dia 1, que eram os valores no início do IM; Δ p < 0,05; ΔΔ p < 0,01; ΔΔΔ p < 0,001. (†) significa que a comparação foi realizada contra o grupo sem tratamento no mesmo tempo de observação; † p < 0,05; †† p < 0,01; ††† p < 0,001. O gráfico mostra que todos os grupos apresentaram valores de DDF baixos depois do IM. Analisando estatisticamente todos os grupos juntos não houve diferenças entre os grupos. Todos os valores expressos como Média ± Erro Padrão da Média. Foi usado ANOVA de duas vias e Tukey para análise estatística.

4.6 Avaliação da Insuficiência Cardíaca

Os grupos experimentais tiveram seus pulmões e fígados retirados e pesados, conforme descrito na página 92. Além disso, conforme já mencionado foi criado um grupo de animais normais com as mesmas características e faixa de peso, usados exclusivamente para servir como referência para os outros grupos (valores normais). Após a desidratação em estufa esses órgãos foram pesados novamente. Desses valores foram calculados os percentuais de água nestes órgãos e indiretamente a possibilidade de insuficiência cardíaca. Não foram encontradas diferenças significativas no percentual de água no fígado entre os grupos normais, T1, T2 e Sem Tratamento. Porém, o pulmão dos animais dos grupos não tratados e do grupo T2 apresentou uma quantidade de água maior do que o encontrado nos animais normais. O grupo T1 apresentou uma quantidade de água no pulmão não diferente do grupo normal e uma quantidade menor de água quando contrastado com o grupo sem tratamento. Sugerindo que esse grupo apresentou um menor grau de insuficiência do que os grupos não tratados e o grupo T2. No caso dos corações, o peso do órgão após a necrópsia foi corrigido pelo peso corporal dos animais. Não houve diferença estatística no peso dos corações entre os grupos experimentais. Os dados podem ser visualizados na **Tabela 4**.

Tabela 4: Percentuais de água no pulmão e fígado e Índice de coração nos grupos experimentais no final dos experimentos.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	Animais Normais	Não Tratados	Grupo T1	Grupo T2
Percentual de Água no Pulmão (%)	25,6 ± 5,9	40,15 ± 17,20*	26,50 ± 6,78†	42,11 ± 17,20*
Percentual de Água no Fígado (%)	14,9 ± 1,52	18,51 ± 7,72	15,6 ± 1,76	21,52 ± 7,88
Índice de coração	0,004044 ± 0,000349	0,003873 ± 0,002160	0,004052 ± 0,000353	0,004073 ± 0,001169

*N=06 animais em cada grupo. Valores expressos em Média ± DP * p < 0,05.*

() Comparação com o grupo de animais normais; *p < 0,05; **p < 0,01; *** p < 0,001.*

(†) Comparação com o grupo não tratado; † p < 0,05; †† p < 0,01; ††† p < 0,001.

4.7 Análises Histológicas e Medição do Tamanho dos Infartos

Os corações foram retirados e o percentual de infarto foi mensurado conforme já descrito anteriormente (página 96). A região infartada pode ser distinguida da região saudável não somente pela histologia característica, mas também por alterações na espessura da parede ventricular esquerda (diminuição da espessura) que em alguns casos pode ser facilmente visível macroscopicamente. A figura 40 mostra um exemplo do citado. Em “A” desta figura, pode ser observado um coração normal, onde pode ser visualizada que a parede do ventrículo esquerdo (VE) expressa uma espessura normal. Enquanto em “B” da mesma figura é visualizado um coração infartado com 28 dias. É possível perceber o afinamento da parede infartada em alguns pontos (apontado com a seta). Essa alteração morfológica foi bem evidente e a delimitação da área infartada também foi facilitada pela visualização da deposição de colágeno (coloração avermelhada) através da coloração de *Picrosirius*.

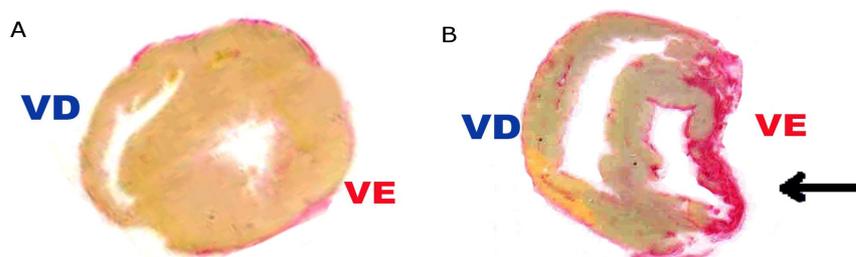


Figura 40: Imagem demonstrando a coloração de Picrosirius utilizada para medir o tamanho dos infartos. Em A) é demonstrado um coração normal (não infartado). Em B) é mostrado um coração infartado após 28 dias. É possível notar o afinamento da parede infartada, ressaltada pela indicação da seta e a grande deposição de colágeno que pode ser evidenciado nessa coloração pelo forte coloração avermelhada. VE significa ventrículo esquerdo; enquanto VD significa ventrículo direito.

Como já mencionado, cortes como esses foram utilizados para se dimensionar o tamanho do infarto. Os principais dados referentes aos tamanhos dos infartos obtidos podem ser visualizados na **Tabela 5**.

Tabela 5: Tabela com os valores do tamanho dos infartos dos animais em cada fatia e o valor total calculado (N=18 animais).

Tamanho dos Infartos em (%)	Média	Desvio Padrão
Fatia A	50,593	15,287
Fatia B	43,703	13,986
Fatia C	40,729	10,295
Fatia D	19,175	21,713
Infarto Total	37,326	10,939

A porção do coração que teve maior infarto foi a **porção A** (ápice) seguido pela **porção B**. O valor médio do tamanho dos infartos foi de 37%, tendo infartos muito grandes (máximo de 61,7%) e infartos relativamente pequenos (9,6%). Os achados histológicos foram condizentes com os encontrados na literatura (Fishbein, Maclean, e Maroko 1978a; Bäcklund et al. 2003; Antonio et al. 2015).

O grupo não tratado teve tamanho médio de infarto de 46,62 % \pm 13,59 (N=6), enquanto no grupo T1 esse valor foi de 25,09 % \pm 9,20 (N=6) e no grupo T2 foi de 40,83 % \pm 5,19 (N=6) com 28 dias.

A **Figura 41** mostra a análise estatísticas realizadas no grupo.

Tamanho do infarto na Histologia entre os Grupos

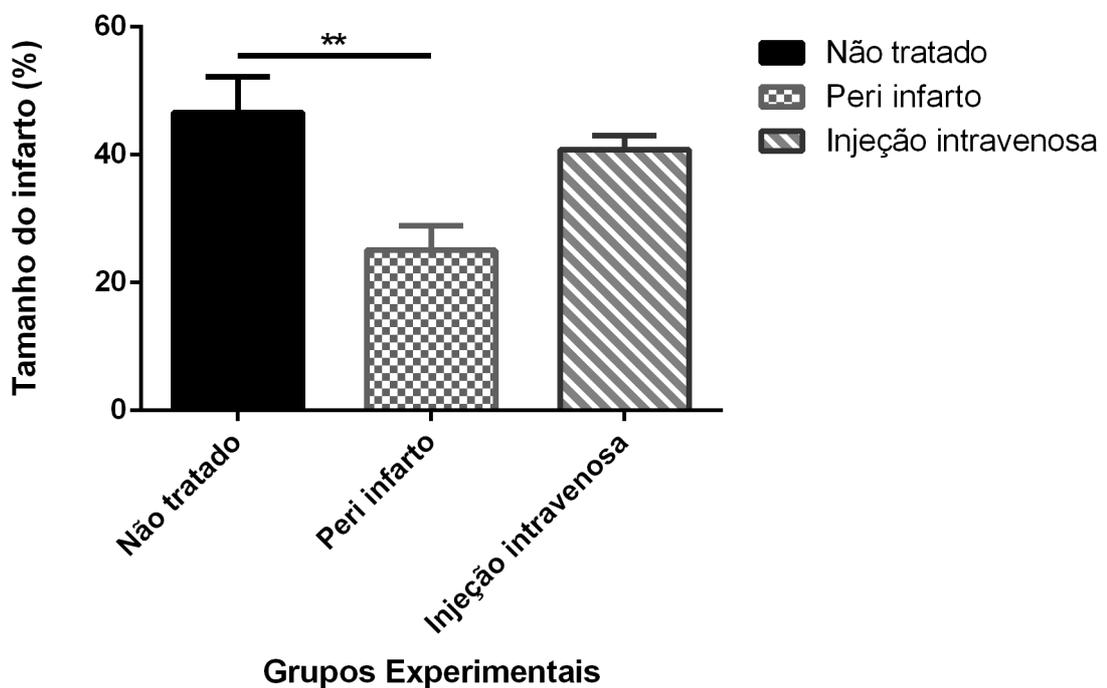


Figura 41: Gráficos mostrando o tamanho do infarto em % nos grupos experimentais ao final do experimento (28 dias). O grupo de animais cujo tratamento foi realizado com injeção de células na borda infartada (T1) apresentou um tamanho de infarto menor do que o grupo não tratado e do que o grupo que recebeu as células por via endovenosa (grupo T2) pela injeção na veia da cauda. O grupo T2 apresentou tamanho de infarto com tamanho similar ao grupo não tratado. Análise realizada inter grupo, utilizando ANOVA de uma via. Todos os valores expressos como Média \pm Erro Padrão da Média. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Como pode ser observado no gráfico, o grupo que recebeu as células injetadas diretamente na borda infartada teve tamanho médio de infartos menor do que o grupo não tratado e o grupo T2 ($p < 0.01$) com 28 dias de IM. Não houve diferenças entre os grupos T2 e o grupo não tratado.

O exame histopatológico dos corações com 28 dias de infarto foi condizente com os dados de literatura e com os dados do nosso laboratório.

Discussão

5. Discussão

No presente trabalho ratas foram submetidas à cirurgia para obtenção de IM com o objetivo de estudar a possibilidade de utilização de CDTA como uma opção viável para o tratamento do IM agudo e ainda observar se existem diferenças entre se utilizar duas vias diferentes de injeção dessas células para tratamento desses animais: diretamente na borda da região infartada ou a injeção das células diretamente na circulação sanguínea, através da veia da cauda. Para tanto, as CDTAs precisaram ser isoladas, estudadas e caracterizadas antes que estivessem disponíveis para emprego nos animais.

5.1 Obtenção e caracterização das células derivadas do tecido adiposo

Neste trabalho procurou-se empregar um protocolo para obtenção das células que fosse ao mesmo tempo fácil, rápido para que seu uso seja viável como terapia. O protocolo que foi usado teve como base um processo de filtração que foi descrito a quase 40 anos (Björntorp et al. 1978) que com modificações, mostrou-se ser bem eficiente. O rendimento obtido pelo processo foi bom e o quantitativo de célula obtido (Aprox. $6,0 \times 10^7$ em 15 gramas de tecido adiposo) foi considerável, quando se compara com o quantitativo obtido a partir de medula óssea e condizente com o encontrado na literatura (Bunnell et al. 2008).

As CDTAs tiveram rápida proliferação em cultura que é uma característica importante quando se faz necessário uma grande quantidade de células em pouco tempo. Neste aspecto, o resultado também foi semelhante aos encontrados na literatura (Baksh, Yao, e Tuan 2007; Bunnell et al. 2008; Ren et al. 2012).

A caracterização das células nesse estudo foi baseada na sua morfologia, seu comportamento em cultura, coloração e citometria de fluxo. No tocante a morfologia, as células apresentaram características semelhantes as células mesenquimais derivadas da medula óssea, aderindo-se enquanto em cultura e apresentando-se na forma estelar, porém com um crescimento bem mais acelerado. Esses achados também foram condizentes com os relatos da literatura (Caplan 1991; Baksh, Yao, e Tuan 2007; Astori et al. 2007; Sánchez et al. 2010). Com a coloração de “Red Oil” foi possível apenas supor que as células não eram completamente diferenciadas (adultas) já que não possuíam depósitos de gorduras suficientes em seu citoplasma para apresentar qualquer tipo de cor diante desse corante. A citometria de fluxo demonstrou que a população de células obtidas e conseqüentemente injetadas nos animais nesses experimentos eram constituídas em sua maioria por células não hematopoiéticas, por serem CD45- e CD11- e ainda que essa população expressava alguns marcadores presentes em células mesenquimais, como CD90+ e CD29+. Porém a ausência de outros marcadores em nossa análise que pudessem caracterizar populações mais indiferenciada não permitiu afirmar que foi injetado células troncos nos animais. Na verdade, estava sendo injetado um “pool” de células que provavelmente podia conter as células troncos e esse “pool” de célula era basicamente constituído por células mesenquimais. No mínimo deveria se

experimentalizar outros marcadores como **c-kit**, por exemplo, para caracterização mais adequada como células troncos (Song et al. 2005; Ryu et al. 2013).

5.2 Grupos experimentais, considerações

A cirurgia para obtenção dos infartos, como esperado, causou muitas alterações clínicas nos animais que foram condizentes com os relatos na literatura (Spadaro et al. 1980; Jack P. Cleutjens et al. 1995; Saraiva et al. 2007; Miranda et al. 2007; Antonio et al. 2015). Isso se refletiu em vários aspectos que puderam ser demonstrados pelos diversos exames e mesmo pela clínica e necrópsia dos animais. O pouco ganho de peso dos animais durante o tempo do experimento foi um exemplo do impacto causado nesses animais pelo IM. Além disso, a presença de ascite e efusão pleural em alguns animais durante a necrópsia demonstrou o quanto esses animais estavam comprometidos hemodinamicamente, que se refletiu também no acúmulo maior de líquido em órgãos como fígado e pulmão (quando comparados com animais normais), sugerindo um certo grau de insuficiência cardíaca. Essa situação pode ocorrer posteriormente a eventos isquêmicos e essas alterações hemodinâmicas seriam consequências da progressão do quadro de ICC (Minicucci et al. 2011; Liang et al. 2015). O grupo T1 apresentou um acúmulo menor de líquidos nesses órgãos, sugerindo que tratamento pode ter favorecido uma melhor condição hemodinâmica para esses animais no final do experimento.

O tamanho dos infartos foi variável quando verificado na histopatologia, fato comum em infartos produzidos pelo método de ligadura da artéria coronária anterior, onde a altura da ligação influencia no tamanho do infarto (Spadaro et al. 1980).

Apesar de o cirurgião procurar ligar a coronária no mesmo ponto em todos os animais na tentativa de obter infartos mais uniformes o resultado ainda foi imprevisível. O procedimento foi bastante cruento o que explica a mortalidade de animais durante os procedimentos cirúrgicos. Isso se tornou ainda mais crítico para o grupo T1, que recebeu as células diretamente na borda da lesão e por isso precisou ser submetido a uma nova cirurgia para injeção das células apenas 24 horas após a primeira. Apesar disso, conforme já discutido anteriormente, aparentemente o grupo T1 apresentou menos morte ao longo do tempo de observação do que os demais grupos, sugerindo que após o tratamento, esses animais estavam em melhores condições clínicas que os animais dos demais grupos.

Os resultados dos exames realizados no dia 1 sugerem que, apesar da distribuição aleatória dos animais entre os grupos, os grupos eram bem homogêneos entre si, tendo a maior parte dos exames realizados neste dia não diferindo estatisticamente entre os grupos. Este fato é interessante porque permite extrapolar que os grupos eram bem semelhantes antes dos tratamentos e possivelmente poderiam ter tamanhos de infartos também semelhantes, conforme reportado em literatura (Miranda et al. 2007).

O eletrocardiograma é um exame útil, simples de ser realizado e que pode trazer informações importantes, servindo para detecção do IM e para avaliação do quadro clínico decorrente do IM em ratos. A presença da onda Q em D1, aliado a queda das voltagens dos Complexos QRS e o desvio do ângulo de despolarização são achados constantes nos animais infartados (Miranda et al. 2007). Como

observado, o ECG mostrou que todos os grupos experimentais apresentaram alterações condizentes com animais infartados. As principais alterações causadas pelo IM, puderam ser detectadas precocemente, logo após a cirurgia. A perda de miócitos durante o processo de necrose e o conseqüente remodelamento do coração pela substituição do tecido eletricamente ativo por tecido fibroso pode ser refletido por baixa atividade elétrica no coração (IQRS) e pelo desvio do eixo elétrico (AQRS) para direita, já que o infarto afeta mais o lado à esquerda do miocárdio (Fishbein, Maclean, e Maroko 1978b; Jack P. Cleutjens et al. 1995; Saraiva et al. 2007; Antonio et al. 2015).

Apesar da maioria dos parâmetros eletrocardiográficos não ter apresentado diferenças significativas entre os grupos experimentais, o grupo T1 apresentou o valor do AQRS menor já no sétimo dia e se manteve com valor mais baixo em relação aos demais grupos com 28 dias. O grupo T1 também apresentou valores maiores de voltagem no ECG (maior valor do IQRS), o sugerindo que neste grupo haveria mais miócitos eletricamente ativos posterior ao tratamento com injeção das células. A melhora desses parâmetros no grupo T1 pode em parte ser explicado pelo menor tamanho do infarto encontrado nesse grupo no final do experimento e conseqüentemente maior probabilidade de que neste grupo se encontrasse maior quantidade de miócitos eletricamente ativos. Por outro lado, o grupo T2 não apresentou o mesmo resultado, sugerindo que o tratamento por via endovenosa não afetou a quantidade de miócito viável.

O ECO tem sido apontado como uma ferramenta importante em avaliações de terapias em IM experimental, por apresentar correlações com os resultados obtidos

nos exames “*post mortem*” dos animais, sobretudo tamanho do infarto; permitindo aferir e avaliar os tratamentos empregados “*In Vivo*”, conforme já discutido anteriormente e amplamente divulgado na literatura (de Simone et al. 1990; Litwin et al. 1994; Prunier et al. 2002; Miranda et al. 2007).

A FEM e a FE são parâmetros importantes para avaliação da função sistólica do ventrículo esquerdo e esses parâmetros diminuem após o IM à valores que podem depender da extensão do IM encontrado nos animais (Litwin et al. 1994; Miranda et al. 2007; Saraiva et al. 2007; Albert e Lewis 2008; Motaal et al. 2014). Outro parâmetro usado para avaliar a função sistólica que também se reduz após o IM é a fração de ejeção medida pelo método de Simpson (FES), que segundo a literatura é mais adequado do que a FEM para avaliar a função sistólica quando a morfologia do coração se encontra alterado, como ocorre durante o processo de remodelamento pós infarto (de Simone et al. 1990; Litwin et al. 1994; Prunier et al. 2002; Saraiva et al. 2007; Dornberger, Dittrich, e Busch 2015).

Os animais tiveram importantes alterações ecocardiográficas depois da cirurgia de infarto, quando comparados aos exames de antes do IM: como redução da FEM, da FC e da FES conforme já discutido anteriormente e estas alterações foram condizentes com as descritas na literatura (de Simone et al. 1990; Litwin et al. 1994; Prunier et al. 2002; Miranda et al. 2007; Saraiva et al. 2007; Dornberger, Dittrich, e Busch 2015).

Neste estudo, os dados do ECO demonstraram que o tratamento realizado com CDTA, quando injetada diretamente ao redor da lesão miocárdica; melhorou ou,

no mínimo, foi capaz de manter a função sistólica dos animais tratados por um tempo maior do que aqueles que não receberam as células. Já foi mostrado na literatura que os animais submetidos ao IM experimental são incapazes de melhorar espontaneamente a sua função cardíaca, caso não lhes sejam instituídos qualquer tipo de intervenção ou tratamento. Pelo contrário, a maioria deles sofre uma dramática piora do quadro clínico ao longo do tempo (Miranda et al. 2007; Saraiva et al. 2007; Antonio et al. 2015). Baseado nesta premissa, alguns autores acreditam que se houver algum tipo de intervenção terapêutica capaz de, no mínimo, evitar a deterioração do quadro; esse fato, já poderia ser considerado como um efeito benéfico da terapia (E. Olivares et al. 2004).

Os resultados da FEM mostrados neste trabalho condizem, portanto, com uma melhora considerável da função sistólica do VE no grupo T1, já que os animais antes de serem submetidos aos tratamentos, apresentavam FEM de valores bem similares (não havia diferença estatística) entre si. Considerando o fato já exposto de não haver melhoras espontâneas em ratos infartados experimentalmente (que pode também ser confirmado com os valores encontrados no grupo não tratado), faz com que o aumento da FEM encontrado na semana posterior ao tratamento, possa ser atribuído ao tratamento com as CDTAs, injetadas diretamente na borda da lesão. Melhoras semelhantes foram encontrados na literatura com o uso de células troncos oriundas de várias origens, como as de cordão umbilical (H.-J. Chen et al. 2015) e medula óssea, sendo que aparentemente as células mesenquimais de medula óssea são melhores que as mononucleares para uso na terapia de doenças cardíacas (Westphal et al. 2014; Tao et al. 2015).

Os dados também demonstraram que a melhora percebida no Grupo T1 não foi apenas nos valores da FEM, mas que os outros parâmetros ecocardiográficos que foram avaliados também refletiram as melhoras encontradas. Como visto, também houve melhoras na FE, FES e melhora, ainda que menos evidente, nos valores do DC. A maioria das melhoras foi atribuída ao período compreendido de uma semana após o tratamento. Apesar de encontrarmos melhoras persistentes posteriores a esse tempo (no caso, 28 dias), ela não pareceu tão evidente, em alguns dos exames, quanto as que foram observadas no dia 7. A literatura relata que com 7 dias de IM em ratos já é possível encontrar uma leve deposição de colágeno na cicatriz em formação, mas somente a partir de 28 dias de IM, que o infarto deveria ser considerado crônico ou cicatrizado nesta espécie (Spadaro et al. 1980; Miranda et al. 2007; Antonio et al. 2015).

A anatomia do coração pode ser avaliada pelo diâmetro da cavidade do ventrículo esquerdo (DDF) que tende a aumentar, refletindo a dilatação do ventrículo esquerdo durante o processo de remodelamento e instauração do quadro de ICC (de Simone et al. 1990; Litwin et al. 1994; Prunier et al. 2002; Dornberger, Dittrich, e Busch 2015).

Diante desse fato, surgem algumas indagações sobre o tipo de melhora que foi evidenciado nesses experimentos e como ela de fato esteja ocorrendo. A análise dos dados que permitiu avaliar o tamanho da Câmara Ventricular Esquerda (neste caso, DDF) mostrou que apesar da melhora na Função Sistólica (FEM, FE e FES) evidenciada no Grupo T1, o VE ainda se encontrava dilatado (aumentado de tamanho), similar ao que foi visto nos demais grupos experimentais. Exceto pelo

grupo não tratado, no qual ficou claramente evidenciado um aumento progressivo da dilatação da câmara ventricular ao longo do tempo, nos demais grupos ainda não ficou claro com esses resultados, se o tratamento com injeção de células na borda da lesão estava conseguindo “deter” a progressão do remodelamento cardíaco que, como já mencionado previamente, acarreta consequências danosas para os indivíduos. De fato, não houve diminuição do diâmetro da cavidade ventricular no grupo T1, mas também não houve aumento como ocorrido no grupo não tratado. Esse dado foi similar ao encontrado na literatura, onde o tratamento com células-troncos aparentemente foi capaz de evitar a progressão do aumento do diâmetro do VE; não conseguindo, porém, o processo (Fan et al. 2006).

Outra questão que merece um pouco de discussão é como a terapia celular atuaria. De fato, ao longo desse trabalho foi levantado um número considerável de literatura ao redor do tema; alguns relativamente antigos e outros bem mais recentes. Sem dúvida, nenhum deles até o momento foi conclusivo sobre os mecanismos de atuação desse tipo de terapia. Alguns trabalhos propõem que as CDTA e outras células mesenquimais seriam capazes de se diferenciar e reparar, por si mesmo, os tecidos lesados (Planat-Bénard, Menard, et al. 2004; Strem et al. 2005; Khaleghi et al. 2014; L. Chen et al. 2014). Outros, entretanto, acreditam que essas células atuariam apenas como liberadoras de citocinas e fatores de crescimento e estes, sim, promoveriam o recrutamento de novas células para o local lesado ou mesmo, atuariam sobre as possíveis células progenitoras já existentes nestes locais e estas fariam os reparos (Jafarzadeh et al. 2014; Yan et al. 2014; C. Liu et al. 2015; Minter, Marra, e Rubin 2015). De fato, os estudos recentes ainda

não conseguiram responder completamente essas indagações, embora a tendência geral seja que a atuação se dê principalmente pelo efeito parácrino dessas células (Gharaibeh et al. 2011).

O efeito parácrino é sugerido em vários estudos. Um deles, enfatizou que essa possibilidade seria uma característica importante e presente em todas as células mesenquimais (Nakamura et al. 2015). Foi demonstrada a melhora com o uso de CTM no tratamento de injúrias musculares provocadas experimentalmente. Foi identificado que os exossomas dessas células, apesar de conterem poucas citocinas que atuam normalmente na reparação de músculos esqueléticos lesados, continham uma grande quantidade de micro RNA mensageiros (micro RNA-494, por exemplo) que estão relacionados com o reparo muscular; sugerindo que o reparo da injúria promovido pelos exossomas derivados das CTM, ocorreu pelo aumento da miogênese e pelo aumento da angiogênese e não pela formação de fibras musculares (Nakamura et al. 2015). Como o exossoma é basicamente uma vesícula contendo vários componentes, sobretudo RNA mensageiros e micro RNA e uma vez que se fundindo com a membrana plasmática da célula libera para meio extracelulares esses componentes; a hipótese de que esse mecanismo estaria presente durante o reparo das lesões, agindo de forma importante na interação célula a célula no local da lesão e esta seria uma das formas de atuação das CTMs nas terapias celulares (Nakamura et al. 2015). Fazendo um paralelo com os dados observados e considerando o fato de não ter ocorrido melhora evidente no grupo T2, como a ocorrida no grupo T1, pode-se reforçar a hipótese do efeito parácrino

descrito, já que o resultado foi bem melhor quando a injeção da célula ocorreu mais próximo da lesão.

A não evidência de melhoras com as células injetadas na circulação periférica vista no grupo T2 pode não estar relacionado somente a questão do efeito parácrino comentado anteriormente. De fato, foi demonstrado a importância das células chegarem nos locais das lesões para que houvesse melhora com o emprego de células como terapia (Chang et al. 2015). Isso é especialmente importante, quando se considera a questão na reparação no IM; seja pelo efeito parácrino ou pelos demais mecanismos. Acredita-se que as células usadas em terapia celular cheguem a área infartada, passando pelos espaços existentes entre as células endoteliais e esses espaços podem ser maior ou menor em decorrência da gravidade das lesões, dos mediadores inflamatórios existentes no local, que por sua vez, também pode estar relacionado com o tempo da lesão (Chang et al. 2015). Assim, baseado no exposto; seria possível supor que as células injetadas na veia da cauda, talvez não tivessem alcançado a área lesionada em número suficiente, pela possibilidade de distribuição dessas células para outras áreas do corpo ou mesmo pela dificuldade que essas células teriam para chegar ao sítio lesionado por problemas na circulação local, causado pelo evento isquêmico.

Os parâmetros do ECO e do ECG podem dar uma ideia do tamanho do infarto, uma vez que podem ser correlacionar com ele em alguns momentos (Prunier et al. 2002; Miranda et al. 2007). Baseado neste fato, pode-se supor que no início dos experimentos os grupos eram bem homogêneos entre si e conseqüentemente poderiam ter tamanhos de infartos semelhantes. O tamanho dos infartos no grupo T1

foi menor do que nos outros grupos no final dos experimentos que pode indicar que o tratamento por injeção das células na borda da lesão pode ter influenciado diretamente na redução do tamanho do infarto. A literatura reporta diminuição do tamanho do infarto com o tratamento usando CTM (Yamada et al. 2006; Zhang et al. 2010; Nascimento et al. 2014). Os mecanismos possíveis para explicar a diminuição do tamanho do infarto ainda são controversos. Já foi demonstrada a possibilidade de ocorrência de diferenciação da CTM (e a CDTA injetada apresenta marcadores de célula mesenquimal, como visto anteriormente) em cardiomiócito “in vitro” e mesmo “in vivo” (Planat-Bénard, Menard, et al. 2004; Zhang et al. 2010; Nascimento et al. 2014). Também já foi evidenciado que possa ocorrer o fenômeno de fusão das células transplantadas com as células locais e a trans diferenciação dessas células (Quevedo et al. 2009; Nascimento et al. 2014) e que outro mecanismo de atuação seria pela atenuação do processo de remodelamento cardíaco (Ohnishi et al. 2007; Wang et al. 2008; Locke, Feisst, e Dunbar 2011; Dayan et al. 2012; Nascimento et al. 2014) e também já foi sugerido o aumento da angiogênese, como fator de diminuição dos infartos (Nagaya et al. 2004; Planat-Bénard, Silvestre, et al. 2004; Locke, Feisst, e Dunbar 2011; Nascimento et al. 2014).

Aparentemente, pode estar ocorrendo todos esses mecanismos. Um estudo recente, por exemplo, sugere que os macrófagos seriam os grandes responsáveis pelas melhoras evidenciadas nos estudos de terapias celulares, em especial, no infarto experimental do miocárdio. Esse trabalho sugere que macrófagos poderiam ter um papel importante tanto atuando isoladamente, quanto utilizado junto a outras células na terapia celular, liberando fatores e citocinas que ajudariam no

remodelamento cardíaco (Ben-Mordechai et al. 2013). Foi evidenciado que a depleção de macrófagos atuou negativamente no remodelamento cardíaco, aumentando o tamanho do infarto e piorando a função sistólica. A restauração dos macrófagos e o uso de CTM reverteram esses efeitos deletérios. Além disso, o uso de CTM aumentou o número de macrófagos no local da lesão melhorando o reparo da injúria (Ben-Mordechai et al. 2013).

Existe também uma importante relação da terapia celular com o sistema renina-angiotensina no tratamento das doenças isquêmicas. Um sistema renina-angiotensina local é expresso nas CTM que é constituído inclusive por receptores de angiotensina II e enzima conversora de angiotensina. Esse sistema é capaz de atuar regulando algumas funções das CTM por mecanismo autócrino e parácrino (C. Liu et al. 2014). Além disso, foi demonstrado que o pré-tratamento de CTM com angiotensina II aumentou a eficácia da terapia do IM pela CTM, prolongando o tempo de permanência dessas células no local da lesão; favorecendo a angiogênese, pela estimulação da produção do Fator estimulador de crescimento de endotélio e vasos (VEGF) pela CTM; e ainda aumentando a produção de junções comunicantes (aumento da expressão de conexina 43). Todos esses fatores juntos, fizeram com que houvesse melhora na função sistólica, menor tamanho do infarto, menor quantidade de tecido cicatricial e com menor remodelamento cardíaco de uma maneira geral (C. Liu et al. 2014; C. Liu et al. 2015). Essas características da CTM de modificar o microambiente no local da lesão, pode explicar parte dos achados e melhoras do presente estudo.

Atualmente, considerando os avanços nas descobertas nos mecanismos de diferenciação celular, surge cada vez mais a possibilidade de se induzir a direção da diferenciação das células antes de usá-las na terapia celular. São as chamadas células-tronco induzidas (iPS). Várias metodologias têm sido usadas para produzi-las (Y. Liu et al. 2014; Okano e Yamanaka 2014; Shimamoto et al. 2014) e parece ser um campo de estudo bastante interessante, já que poderia ser usada na terapia, células com um certo grau de comprometimento.

De uma maneira geral, os resultados apresentados demonstram que o tratamento com Células Derivadas do Tecido Adiposo, quando injetadas diretamente na borda da lesão miocárdica parece ser eficiente (Grupo T1) no tratamento do IM quando aplicadas 24 horas após a cirurgia para obtenção do IM, enquanto que a injeção intravenosa destas mesmas células (Grupo T2) não surtiu os mesmos efeitos de melhora. Isso foi refletido nos resultados dos diversos exames realizados. Mais estudos precisam ser feitos pra melhor compreender os mecanismos envolvidos e determinar o melhor momento para utilizá-las na terapia; mas os dados obtidos neste estudo, somado as informações encontradas na literatura sugere que as CDTAs são bastante promissoras para uso no tratamento do infarto agudo do miocárdio.

Conclusões

6. Conclusões

- O tratamento com injeções das CDTA diretamente na periferia do IM parece ser promissor e se mostrou eficiente quando efetuado agudamente após o IM;
- O tamanho do infarto foi menor no grupo tratado com CDTA injetadas diretamente na borda do infarto;
- A terapia com injeção de CDTAs por via endovenosa não surtiu efeito benéfico, quando usado como tratamento do IM em ratos;

7. Referências Bibliográficas

- Albert, Nancy M., e Connie Lewis. 2008. "Recognizing and Managing Asymptomatic Left Ventricular Dysfunction After Myocardial Infarction". *Critical Care Nurse* 28 (2): 20–37.
- Algire, Carolyn, Dasa Medrikova, e Stephan Herzig. 2012. "White and Brown Adipose stem cells: From Signaling to Clinical Implications". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, outubro. doi:10.1016/j.bbaliip.2012.10.001.
- Alison, Malcolm R. 2002. "Liver regeneration with reference to stem cells". *Seminars in Cell & Developmental Biology* 13 (6): 385–87. doi:10.1016/S1084952102001246.
- Alison, Malcolm R., Richard Poulson, Stuart Forbes, e Nicholas A. Wright. 2002. "An introduction to stem cells". *The Journal of Pathology* 197 (4): 419–23. doi:10.1002/path.1187.
- Antonio, Ednei Luiz, Andrey Jorge Serra, Alexandra Alberta Dos Santos, Stella Sousa Vieira, Jairo Montemor Augusto Silva, Amanda Yoshizaki, Renato Rodrigues Sofia, e Paulo José Ferreira Tucci. 2015. "Are There Gender Differences in Left Ventricular Remodeling after Myocardial Infarction in Rats?". *Revista Brasileira De Cirurgia Cardiovascular: Órgão Oficial Da Sociedade Brasileira De Cirurgia Cardiovascular* 30 (1): 70–76. doi:10.5935/1678-741.20140093.
- Astori, Giuseppe, Francesca Vignati, Silvana Bardelli, Monica Tubio, Mauro Gola, Veronica Albertini, Franco Bambi, et al. 2007. "'In vitro' and multicolor phenotypic characterization of cell subpopulations identified in fresh human adipose tissue stromal vascular fraction and in the derived mesenchymal stem cells". *J Transl Med* 5 (1): 55.
- Ausma, J, J Cleutjens, F Thoné, W Flameng, F Ramaekers, e M Borgers. 1995. "Chronic hibernating myocardium: interstitial changes". *Molecular and Cellular Biochemistry* 147 (1-2): 35–42.
- Bäcklund, Tom, Eeva Palojoki, Antti Saraste, Tina Grönholm, Anders Eriksson, Päivi Lakkisto, Olli Vuolteenaho, et al. 2003. "Effect of vasopeptidase inhibitor omapatrilat on cardiomyocyte apoptosis and ventricular remodeling in rat myocardial infarction". *Cardiovascular Research* 57 (3): 727–37.

doi:12618234.

- Baksh, Dolores, Raphael Yao, e Rocky S. Tuan. 2007. "Comparison of Proliferative and Multilineage Differentiation Potential of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Umbilical Cord and Bone Marrow". *STEM CELLS* 25 (6): 1384–92. doi:10.1634/stemcells.2006-0709.
- Belicchi, Marzia, Federica Pisati, Raffaella Lopa, Laura Porretti, Francesco Fortunato, Manuela Sironi, Mario Scalamogna, Eugenio A. Parati, Nereo Bresolin, e Yvan Torrente. 2004. "Human Skin-Derived Stem Cells Migrate throughout Forebrain and Differentiate into Astrocytes after Injection into Adult Mouse Brain". *Journal of Neuroscience Research* 77 (4): 475–86. doi:10.1002/jnr.20151.
- Ben-David, Uri, e Nissim Benvenisty. 2011. "The Tumorigenicity of Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells". *Nature Reviews Cancer* 11 (4): 268–77. doi:10.1038/nrc3034.
- Ben-Mordechai, Tamar, Radka Holbova, Natalie Landa-Rouben, Tamar Harel-Adar, Micha S Feinberg, Ihab Abd Elrahman, Galia Blum, et al. 2013. "Macrophage Subpopulations Are Essential for Infarct Repair with and without Stem Cell Therapy". *Journal of the American College of Cardiology*, agosto. doi:10.1016/j.jacc.2013.07.057.
- Bianco, Paolo, e Pamela Gehron Robey. 2000. "Marrow stromal stem cells". *Journal of Clinical Investigation* 105 (12): 1663–68.
- Billon, Nathalie, Miguel Caetano Monteiro, e Christian Dani. 2008. "Developmental origin of adipocytes: new insights into a pending question". *Biology of the Cell* 100 (10): 563–75. doi:10.1042/BC20080011.
- Björntorp, P, M Karlsson, H Pertoft, P Pettersson, L Sjöström, e U Smith. 1978. "Isolation and characterization of cells from rat adipose tissue developing into adipocytes". *Journal of lipid research* 19 (3): 316–24.
- Bocchi, E A, G Guimaraes, F Tarasoutshi, G Spina, S Mangini, e F Bacal. 2009. "Cardiomyopathy, adult valve disease and heart failure in South America". *Heart* 95 (3): 181–89. doi:10.1136/hrt.2008.151225.
- Bonnet, Dominique. 2002. "Haematopoietic stem cells". *The Journal of Pathology* 197 (4): 430–40. doi:10.1002/path.1153.
- . 2003. "Hematopoietic stem cells". *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* 69 (3): 219–29. doi:10.1002/bdrc.10018.
- Boyd, Ashleigh S., Neil P. Rodrigues, Kathy O. Lui, Xuemei Fu, e Yang Xu. 2012.

“Concise Review: Immune Recognition of Induced Pluripotent Stem Cells”. *STEM CELLS* 30 (5): 797–803. doi:10.1002/stem.1066.

Bristow, L. R. 1994. “Contributions from the American Medical Political Action Committee to members of Congress”. *The New England Journal of Medicine* 330 (22): 1614; author reply 1615. doi:8177254.

Bunnell, Bruce A., Mette Flaatt, Christine Gagliardi, Bindiya Patel, e Cynthia Ripoll. 2008. “Adipose-derived stem cells: Isolation, expansion and differentiation”. *Methods, Methods in stem cell research*, 45 (2): 115–20. doi:10.1016/j.ymeth.2008.03.006.

Cannon, Barbara, e Jan Nedergaard. 2004. “Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance”. *Physiol. Rev.* 84 (1): 277–359. doi:10.1152/physrev.00015.2003.

Caplan, Arnold I. 1991. “Mesenchymal Stem Cells”. *Journal of Orthopaedic Research* 9 (5): 641–50. doi:10.1002/jor.1100090504.

Case RB. 1989. “The ischemic myocardium: Metabolic, electrolyte, and structural abnormalities”. In *Cardiopatía isquêmica: Aspectos de importância clínica*, 63–72. São Paulo: Savier.

Chang, Xuefeng, Jiaqing Liu, Xudong Liao, e Guohui Liu. 2015. “Ultrasound-mediated microbubble destruction enhances the therapeutic effect of intracoronary transplantation of bone marrow stem cells on myocardial infarction”. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 8 (2): 2221–34.

Cheng, Kuang-Hung, Tzu-Lei Kuo, Kung-Kai Kuo, e Chang-Chun Hsiao. 2011. “Human adipose-derived stem cells: Isolation, characterization and current application in regeneration medicine”. *Genomic Medicine, Biomarkers, and Health Sciences* 3 (2): 53–62. doi:10.1016/j.gmbhs.2011.08.003.

Chen, Hong-Jung, Chien-Hsi Chen, Ming-Yao Chang, Da-Ching Tsai, Ellen Z. Baum, Robert Hariri, Uri Herzberg, e Patrick C. H. Hsieh. 2015. “Human Placenta-Derived Adherent Cells Improve Cardiac Performance in Mice With Chronic Heart Failure”. *Stem Cells Translational Medicine* 4 (3): 269–75. doi:10.5966/sctm.2014-0135.

Chen, Lina, Fengming Qin, Menghua Ge, Qiang Shu, e Jianguo Xu. 2014. “Application of Adipose-Derived Stem Cells in Heart Disease”. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, setembro, 1–13. doi:10.1007/s12265-014-9585-1.

Choi, Yong-Soo, Sang-Eun Noh, Sang-Min Lim, Chang-Woo Lee, Chul-Soo Kim,

- Moon-Whan Im, Moon-Hee Lee, e Dong-Il Kim. 2008. "Multipotency and Growth Characteristic of Periosteum-Derived Progenitor Cells for Chondrogenic, Osteogenic, and Adipogenic Differentiation". *Biotechnology Letters* 30 (4): 593–601. doi:10.1007/s10529-007-9584-2.
- Cinti, Saverio. 2006. "The role of brown adipose tissue in human obesity". *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 16 (8): 569–74. doi:10.1016/j.numecd.2006.07.009.
- Clarke, Brian R., e Armand Keating. 1995. "Biology of Bone Marrow Stroma". *Annals of the New York Academy of Sciences* 770 (Bone Marrow Transplantation: Foundations for the 21st Century): 70–78. doi:10.1111/j.1749-6632.1995.tb31044.x.
- Clarke, Diana L., Clas B. Johansson, Johannes Wilbertz, Biborka Veress, Erik Nilsson, Helena Karlström, Urban Lendahl, e Jonas Frisén. 2000. "Generalized Potential of Adult Neural Stem Cells". *Science* 288 (5471): 1660–63. doi:10.1126/science.288.5471.1660.
- Cleutjens, Jack P., Jagannadha C. Kandala, Eduardo Guarda, Ramareddy V. Guntaka, e Karl T. Weber. 1995. "Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction". *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 27 (6): 1281–92. doi:10.1016/S0022-2828(05)82390-9.
- Cleutjens, J. P., M. J. Verluyten, J. F. Smiths, e M. J. Daemen. 1995. "Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart." *The American Journal of Pathology* 147 (2): 325–38.
- Cristancho, Ana G., e Mitchell A. Lazar. 2011. "Forming Functional Fat: A Growing Understanding of Adipocyte Differentiation". *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12 (11): 722–34. doi:10.1038/nrm3198.
- Dawn, B., e R. Bolli. 2005. "Adult bone marrow–derived cells: Regenerative potential, plasticity, and tissue commitment". *Basic Research in Cardiology* 100 (6): 494–503. doi:10.1007/s00395-005-0552-5.
- Dayan, Victor, Gustavo Yannarelli, Paola Filomeno, e Armand Keating. 2012. "Human mesenchymal stromal cells improve scar thickness without enhancing cardiac function in a chronic ischaemic heart failure model". *Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery* 14 (5): 516–20. doi:10.1093/icvts/ivs048.
- De Bari, Cosimo, Francesco Dell'Accio, Przemyslaw Tylzanowski, e Frank P. Luyten. 2001. "Multipotent Mesenchymal Stem Cells from Adult Human Synovial Membrane". *Arthritis & Rheumatism* 44 (8): 1928–42. doi:10.1002/1529-0131(200108)44:8<1928::AID-ART331>3.0.CO;2-P.

- De Simone, G, D C Wallerson, M Volpe, e R B Devereux. 1990. "Echocardiographic measurement of left ventricular mass and volume in normotensive and hypertensive rats. Necropsy validation". *American Journal of Hypertension: Journal of the American Society of Hypertension* 3 (9): 688–96. doi:2222977.
- Desmoulière, A, A Geinoz, F Gabbiani, e G Gabbiani. 1993. "Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts". *The Journal of Cell Biology* 122 (1): 103–11.
- Dodson, Michael V., Gary J. Hausman, LeLuo Guan, Min Du, Theodore P. Rasmussen, Sylvia P. Poulos, Priya Mir, et al. 2010. "Skeletal Muscle Stem Cells from Animals I. Basic Cell Biology". *International Journal of Biological Sciences* 6 (5): 465–74.
- Dornberger, V., H. D. Dittrich, e Dr R. Busch. 2015. "Echokardiographische Evaluation der systolischen linksventrikulären Funktion bei Herzinsuffizienz". *Herz* 40 (2): 185–93. doi:10.1007/s00059-015-4205-7.
- Duncan, Andrew W., Craig Dorrell, e Markus Grompe. 2009. "Stem Cells and Liver Regeneration". *Gastroenterology* 137 (2): 466–81. doi:10.1053/j.gastro.2009.05.044.
- Ellis, F H, A V Doumanian, e G E Plun. 1962. "Methods of coronary arteriotomy closure in the dog". *Archives of Surgery (Chicago, Ill.: 1960)* 84 (janeiro): 114–21. doi:13889977.
- Engeli, Stefan, Raymond Negrel, e Arya M. Sharma. 2000. "Physiology and Pathophysiology of the Adipose Tissue Renin-Angiotensin System". *Hypertension* 35 (6): 1270–77.
- Evora, P R, P J Pearson, J F Seccombe, e H V Schaff. 1996. "[Ischemia-reperfusion lesion. Physiopathologic aspects and the importance of the endothelial function]". *Arquivos Brasileiros De Cardiologia* 66 (4): 239–45.
- Factor, S M. 1990. "Borderline myocarditis on initial endomyocardial biopsy: no-man's-land no more?". *Journal of the American College of Cardiology* 15 (2): 290–91. doi:2299070.
- Fan, Zhongcai, Mao Chen, Juelin Deng, Xiaojing Liu, Li Zhang, Li Rao, Qing Yang, e Dejie Huang. 2006. "[Changes of heart function after different cell type stem cell transplantation in chronic heart failure]". *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi = Journal of Biomedical Engineering = Shengwu Yixue Gongchengxue Zazhi* 23 (6): 1284–88.
- Farmer, Stephen R. 2006. "Transcriptional control of adipocyte formation". *Cell*

Metabolism 4 (4): 263–73. doi:10.1016/j.cmet.2006.07.001.

Farmer, Stephen R. 2008. “Molecular determinants of brown adipocyte formation and function”. *Genes & Development* 22 (10): 1269–75. doi:10.1101/gad.1681308.

Feng, Jifan, Andrea Mantesso, e Paul T Sharpe. 2010. “Perivascular cells as mesenchymal stem cells”. *Expert Opinion on Biological Therapy* 10 (10): 1441–51. doi:10.1517/14712598.2010.517191.

Ferrari, Giuliana, Gabriella Cusella-, De Angelis, Marcello Coletta, Egle Paolucci, Anna Stornaiuolo, Giulio Cossu, e Fulvio Mavilio. 1998. “Muscle Regeneration by Bone Marrow-Derived Myogenic Progenitors”. *Science* 279 (5356): 1528–30. doi:10.1126/science.279.5356.1528.

Filip, Stanislav, Jaroslav Mokry, Jiri Horacek, e Denis English. 2008. “Stem Cells and the Phenomena of Plasticity and Diversity: A Limiting Property of Carcinogenesis”. *Stem Cells and Development* 17 (6): 1031–38. doi:10.1089/scd.2007.0234.

Fishbein, M C, D Maclean, e P R Maroko. 1978a. “Experimental myocardial infarction in the rat: qualitative and quantitative changes during pathologic evolution”. *The American Journal of Pathology* 90 (1): 57–70. doi:PMC2018229.

———. 1978b. “The histopathologic evolution of myocardial infarction”. *Chest* 73 (6): 843–49. doi:657859.

Fraser, John K., Ronda E. Schreiber, Patricia A. Zuk, e Marc H. Hedrick. 2004. “Adult stem cell therapy for the heart”. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36 (4): 658–66.

Friedenstein, A J, U F Deriglasova, N N Kulagina, A F Panasuk, S F Rudakowa, E A Luriá, e I A Ruadkow. 1974. “Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method”. *Experimental Hematology* 2 (2): 83–92.

Gesta, Stephane, Yu-Hua Tseng, e C. Ronald Kahn. 2007. “Developmental Origin of Fat: Tracking Obesity to Its Source”. *Cell* 131 (2): 242–56. doi:doi: DOI: 10.1016/j.cell.2007.10.004.

Gharaibeh, Burhan, Mitra Lavasani, James H Cummins, e Johnny Huard. 2011. “Terminal differentiation is not a major determinant for the success of stem cell therapy - cross-talk between muscle-derived stem cells and host cells”. *Stem Cell Research & Therapy* 2 (4): 31. doi:10.1186/scrt72.

Go, Alan S., Dariush Mozaffarian, Véronique L. Roger, Emelia J. Benjamin, Jarett D. Berry, William B. Borden, Dawn M. Bravata, et al. 2013. “Heart Disease and

Stroke Statistics—2013 Update A Report From the American Heart Association". *Circulation* 127 (1): e6–245. doi:10.1161/CIR.0b013e31828124ad.

Goodell, M A, K Brose, G Paradis, A S Conner, e R C Mulligan. 1996. "Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo". *The Journal of Experimental Medicine* 183 (4): 1797–1806.

Goossens, Gijs H. 2008. "The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance". *Physiology & Behavior* 94 (2): 206–18. doi:10.1016/j.physbeh.2007.10.010.

Hakuno, Daihiko, Keiichi Fukuda, Shinji Makino, Fusako Konishi, Yuichi Tomita, Tomohiro Manabe, Yusuke Suzuki, Akihiro Umezawa, e Satoshi Ogawa. 2002. "Bone Marrow-Derived Regenerated Cardiomyocytes (CMG Cells) Express Functional Adrenergic and Muscarinic Receptors". *Circulation* 105 (3): 380–86. doi:10.1161/hc0302.102593.

Herzog, Erica L., Li Chai, e Diane S. Krause. 2003. "Plasticity of marrow-derived stem cells". *Blood* 102 (10): 3483–93. doi:10.1182/blood-2003-05-1664.

Hosenpud, J D, L E Bennett, B M Keck, M M Boucek, e R J Novick. 2000. "The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: seventeenth official report-2000". *The Journal of Heart and Lung Transplantation: The Official Publication of the International Society for Heart Transplantation* 19 (10): 909–31.

Hristov, M, Nicole Heussen, A Schober, e C Weber. 2006. "Intracoronary infusion of autologous bone marrow cells and left ventricular function after acute myocardial infarction: a meta-analysis". *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 10 (3): 727–33.

Hüttmann, A., C.L. Li, e U. Dührsen. 2003. "Bone marrow-derived stem cells and 'plasticity'." *Annals of Hematology* 82 (10): 599–604. doi:10.1007/s00277-003-0713-2.

Jafarzadeh, Nazli, Arash Javeri, Maryam Khaleghi, e Masoumeh Fakhr Taha. 2014. "Oxytocin improves proliferation and neural differentiation of adipose tissue-derived stem cells". *Neuroscience Letters* 564 (abril): 105–10. doi:10.1016/j.neulet.2014.02.012.

Jiang, Yuehua, Balkrishna N. Jahagirdar, R. Lee Reinhardt, Robert E. Schwartz, C. Dirk Keene, Xilma R. Ortiz-Gonzalez, Morayma Reyes, et al. 2002. "Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow". *Nature* 418 (6893): 41–49. doi:10.1038/nature00870.

- Johns, T N P, e B J Olson. 1954. "Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals". *Annals of Surgery* 140 (5): 675–82. doi:PMC1609650.
- Julian, D. 1989. "Treatment for chronic CHD". *International Journal of Epidemiology* 18 (3 Suppl 1): S228–30. doi:2572569.
- Kajstura, Jan, Narasimman Gurusamy, Barbara Ogórek, Polina Goichberg, Carlos Clavo-Rondon, Toru Hosoda, Domenico D'Amario, et al. 2010. "Myocyte Turnover in the Aging Human Heart Novelty and Significance". *Circulation Research* 107 (11): 1374–86. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.231498.
- Karantalis, Vasileios, Wayne Balkan, Ivonne H. Schulman, Konstantinos E. Hatzistergos, e Joshua M. Hare. 2012. "Cell-based therapy for prevention and reversal of myocardial remodeling". *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 303 (3): H256–70. doi:10.1152/ajpheart.00221.2012.
- Khaleghi, Maryam, Masoumeh Fakhri Taha, Nazli Jafarzadeh, e Arash Javeri. 2014. "Atrial and Ventricular Specification of ADSCs Is Stimulated by Different Doses of BMP4". *Biotechnology Letters*, setembro. doi:10.1007/s10529-014-1637-8.
- Kikuchi, Kazu, e Kenneth D. Poss. 2012. "Cardiac Regenerative Capacity and Mechanisms". *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 28 (1): 719–41. doi:10.1146/annurev-cellbio-101011-155739.
- Kurihara, Yasuhiro, Takehito Suzuki, Motoharu Sakaue, Ohoshi Murayama, Yoko Miyazaki, Atsushi Onuki, Takuma Aoki, et al. 2013. "Valproic Acid, a Histone Deacetylase Inhibitor, Decreases Proliferation of and Induces Specific Neurogenic Differentiation of Canine Adipose Tissue-Derived Stem Cells". *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*, agosto.
- Laurenti, R, C M Buchalla, e V de S Caratin. 2000. "Ischemic heart disease. Hospitalization, length of stay and expenses in Brazil from 1993 to 1997". *Arquivos brasileiros de cardiologia* 74 (6): 483–92.
- Lenoir, Noëlle. 2000. "Europe Confronts the Embryonic Stem Cell Research Challenge". *Science* 287 (5457): 1425–27. doi:10.1126/science.287.5457.1425.
- Leri, Annarosa, Jan Kajstura, e Piero Anversa. 2005. "Cardiac Stem Cells and Mechanisms of Myocardial Regeneration". *Physiol. Rev.* 85 (4): 1373–1416. doi:10.1152/physrev.00013.2005.
- Liang, Bai, Yongqin Li, Zhenhua Han, Jiahong Xue, Yan Zhang, Shan Jia, e Congxia

- Wang. 2015. "ACE2-Ang (1-7) Axis Is Induced in Pressure Overloaded Rat Model". *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 8 (2): 1443–50.
- Litwin, S E, S E Katz, J P Morgan, e P S Douglas. 1994. "Serial echocardiographic assessment of left ventricular geometry and function after large myocardial infarction in the rat". *Circulation* 89 (1): 345–54. doi:8281668.
- . 1996. "Long-term captopril treatment improves diastolic filling more than systolic performance in rats with large myocardial infarction". *Journal of the American College of Cardiology* 28 (3): 773–81. doi:8772771.
- Liu, Chao, Yue Fan, Lu Zhou, Hong-Yi Zhu, Yi-Chen Song, Liang Hu, Yu Wang, e Qing-Ping Li. 2015. "Pretreatment of mesenchymal stem cells with angiotensin II enhances paracrine effects, angiogenesis, gap junction formation and therapeutic efficacy for myocardial infarction". *International Journal of Cardiology* 188 (junho): 22–32. doi:10.1016/j.ijcard.2015.03.425.
- Liu, Chao, Jing-Wen Zhang, Liang Hu, Yi-Chen Song, Lu Zhou, Yue Fan, Hong-Yi Zhu, Yu Wang, e Qing-Ping Li. 2014. "Activation of the AT1R/HIF-1 α /ACE Axis Mediates Angiotensin II-Induced VEGF Synthesis in Mesenchymal Stem Cells". *BioMed Research International* 2014. doi:10.1155/2014/627380.
- Liu, Y, H Cheng, S Gao, X Lu, F He, L Hu, D Hou, et al. 2014. "Reprogramming of MLL-AF9 leukemia cells into pluripotent stem cells". *Leukemia* 28 (5): 1071–80. doi:10.1038/leu.2013.304.
- Locke, Michelle, Vaughan Feisst, e P Rod Dunbar. 2011. "Concise review: human adipose-derived stem cells: separating promise from clinical need". *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 29 (3): 404–11. doi:10.1002/stem.593.
- Loeffler, M., T. Bratke, U. Paulus, Y. Q. Li, e C. S. Potten. 1997. "Clonality and Life Cycles of Intestinal Crypts Explained by a State Dependent Stochastic Model of Epithelial Stem Cell Organization". *Journal of Theoretical Biology* 186 (1): 41–54. doi:10.1006/jtbi.1996.0340.
- Lotufo, Paulo A., Tiótrefis G. Fernandes, Daniel H. Bando, Airlane P. Alencar, e Isabela M. Benseñor. 2012. "Income and heart disease mortality trends in Sao Paulo, Brazil, 1996 to 2010". *International Journal of Cardiology*. doi:10.1016/j.ijcard.2012.07.006.
- Lovell, M. J., e A. Mathur. 2004. "The role of stem cells for treatment of cardiovascular disease". *Cell Proliferation* 37 (1): 67–87. doi:10.1111/j.1365-2184.2004.00301.x.
- Lu, Tung-Ying, Bo Lin, Jong Kim, Mara Sullivan, Kimimasa Tobita, Guy Salama, e Lei

- Yang. 2013. "Repopulation of Decellularized Mouse Heart with Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiovascular Progenitor Cells". *Nature Communications* 4 (agosto). doi:10.1038/ncomms3307.
- Mattson, Mark P. 2010. "Perspective: Does brown fat protect against diseases of aging?". *Ageing Research Reviews* 9 (1): 69–76. doi:10.1016/j.arr.2009.11.004.
- Mill, J G, I Stefanon, C M Leite, e D V Vassallo. 1990. "Changes in performance of the surviving myocardium after left ventricular infarction in rats". *Cardiovascular Research* 24 (9): 748–53. doi:2146021.
- Minicucci, Marcos F., Paula S. Azevedo, Bertha F. Polegato, Sergio A.R. Paiva, e Leonardo A. M. Zornoff. 2011. "Heart Failure After Myocardial Infarction: Clinical Implications and Treatment". *Clinical Cardiology* 34 (7): 410–14. doi:10.1002/clc.20922.
- Minteer, Danielle M., Kacey G. Marra, e J. Peter Rubin. 2015. "Adipose Stem Cells: Biology, Safety, Regulation, and Regenerative Potential". *Clinics in Plastic Surgery, Fat Grafting: Current Concept, Clinical Application, and Regenerative Potential, Part 1*, 42 (2): 169–79. doi:10.1016/j.cps.2014.12.007.
- Miranda, Amarildo, Ricardo H Costa-E-Sousa, João P S Werneck-de-Castro, Elisabete C Mattos, Emerson L Olivares, Vanessa P Ribeiro, Márcia G Silva, Regina C S Goldenberg, e Antônio C Campos-de-Carvalho. 2007. "Time course of echocardiographic and electrocardiographic parameters in myocardial infarct in rats". *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 79 (4): 639–48.
- Miura, Masako, Stan Gronthos, Mingrui Zhao, Bai Lu, Larry W. Fisher, Pamela Gehron Robey, e Songtao Shi. 2003. "SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (10): 5807–12. doi:10.1073/pnas.0937635100.
- Mizuno, Hiroshi, Morikuni Tobita, e A. Cagri Uysal. 2012. "Concise Review: Adipose-Derived Stem Cells as a Novel Tool for Future Regenerative Medicine". *STEM CELLS* 30 (5): 804–10. doi:10.1002/stem.1076.
- Momma, Stefan, Clas B Johansson, e Jonas Frisén. 2000. "Get to know your stem cells". *Current Opinion in Neurobiology* 10 (1): 45–49. doi:10.1016/S0959-4388(99)00056-2.
- Morris, J J. 1990. "Mechanisms of ischemia in coronary artery disease: spontaneous decrease in coronary blood supply". *American Heart Journal* 120 (3): 746–56; discussion 769–72. doi:2202196.

- Motaal, Abdallah G., Nils Noorman, Wolter L. de Graaf, Verena Hoerr, Luc M. J. Florack, Klaas Nicolay, e Gustav J. Strijkers. 2014. "Functional Imaging of Murine Hearts Using Accelerated Self-Gated UTE Cine MRI". *The International Journal of Cardiovascular Imaging* 31 (1): 83–94. doi:10.1007/s10554-014-0531-8.
- Murata, Daiki, Satoshi Tokunaga, Tadashi Tamura, Hiroaki Kawaguchi, Noriaki Miyoshi, Makoto Fujiki, Koichi Nakayama, e Kazuhiro Misumi. 2015. "A preliminary study of osteochondral regeneration using a scaffold-free three-dimensional construct of porcine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells". *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* 10 (março). doi:10.1186/s13018-015-0173-0.
- Musina, R A, E S Bekchanova, e G T Sukhikh. 2005. "Comparison of Mesenchymal Stem Cells Obtained from Different Human Tissues". *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 139 (4): 504–9.
- Nagaya, Noritoshi, Takafumi Fujii, Takashi Iwase, Hajime Ohgushi, Takefumi Itoh, Masaaki Uematsu, Masakazu Yamagishi, Hidezo Mori, Kenji Kangawa, e Soichiro Kitamura. 2004. "Intravenous Administration of Mesenchymal Stem Cells Improves Cardiac Function in Rats with Acute Myocardial Infarction through Angiogenesis and Myogenesis". *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 287 (6): H2670–76. doi:10.1152/ajpheart.01071.2003.
- Nakamura, Yoshihiro, Shigeru Miyaki, Hiroyuki Ishitobi, Sho Matsuyama, Tomoyuki Nakasa, Naosuke Kamei, Takayuki Akimoto, Yukihito Higashi, e Mitsuo Ochi. 2015. "Mesenchymal-Stem-Cell-Derived Exosomes Accelerate Skeletal Muscle Regeneration". *FEBS Letters* 589 (11): 1257–65. doi:10.1016/j.febslet.2015.03.031.
- Nascimento, Diana Santos, Diogo Mosqueira, Luís Moura Sousa, Mariana Teixeira, Mariana Filipe, Tatiana Pinho Resende, Ana Francisca Araújo, et al. 2014. "Human umbilical cord tissue-derived mesenchymal stromal cells attenuate remodeling after myocardial infarction by proangiogenic, antiapoptotic, and endogenous cell-activation mechanisms". *Stem Cell Research & Therapy* 5 (1): 5. doi:10.1186/scrt394.
- Nelson, Clark J, Jessica P Otis, e Hannah V Carey. 2009. "A role for nuclear receptors in mammalian hibernation". *The Journal of Physiology* 587 (Pt 9): 1863–70. doi:10.1113/jphysiol.2008.167692.
- Nosavanh, LaGina, Da-Hai Yu, Eric J. Jaehnig, Qiang Tong, Lanlan Shen, e Miao-Hsueh Chen. 2015. "Cell-Autonomous Activation of Hedgehog Signaling Inhibits Brown Adipose Tissue Development". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, abril. doi:10.1073/pnas.1420978112.

- Ohnishi, Shunsuke, Hideaki Sumiyoshi, Soichiro Kitamura, e Noritoshi Nagaya. 2007. "Mesenchymal stem cells attenuate cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis through paracrine actions". *FEBS Letters* 581 (21): 3961–66. doi:10.1016/j.febslet.2007.07.028.
- Okano, Hideyuki, e Shinya Yamanaka. 2014. "iPS cell technologies: significance and applications to CNS regeneration and disease". *Molecular Brain* 7 (março): 22. doi:10.1186/1756-6606-7-22.
- Olivares, Emerson L, Ricardo H Costa-E-Sousa, João P S Werneck-de-Castro, Vanessa Pinho-Ribeiro, Márcia G Silva, Karla C Ribeiro, Elisabete C Mattos, Regina C S Goldenberg, Antonio C Campos de Carvalho, e Masako Oya Masuda. 2007. "Cellular cardiomyoplasty in large myocardial infarction: can the beneficial effect be enhanced by ACE-inhibitor therapy?". *European Journal of Heart Failure: Journal of the Working Group on Heart Failure of the European Society of Cardiology* 9 (6-7): 558–67. doi:S1388-9842(07)00053-0.
- Olivares, Emerson, Vanessa P Ribeiro, João P S Werneck de Castro, Karla C Ribeiro, Elisabete C Mattos, Regina C S Goldenberg, José G Mill, et al. 2004. "Bone marrow stromal cells improve cardiac performance in healed infarcted rat hearts". *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 287 (2): H464–70. doi:15044198.
- Olivetti, Giorgio, Rakesh Abbi, Federico Quaini, Jan Kajstura, Wei Cheng, James A. Nitahara, Eugenio Quaini, et al. 1997. "Apoptosis in the Failing Human Heart". *New England Journal of Medicine* 336 (16): 1131–41. doi:10.1056/NEJM199704173361603.
- Orlic, D. 2002. "Adult BM stem cells regenerate mouse myocardium". *Cytotherapy* 4 (6): 521–25. doi:10.1080/146532402761624674.
- Osawa, M, K Hanada, H Hamada, e H Nakauchi. 1996. "Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell". *Science (New York, N.Y.)* 273 (5272): 242–45.
- Paul, S D, K M Kuntz, K A Eagle, e M C Weinstein. 1994. "Costs and effectiveness of angiotensin converting enzyme inhibition in patients with congestive heart failure". *Archives of Internal Medicine* 154 (10): 1143–49. doi:8185426.
- Perin, Emerson C., Hans F.R. Dohmann, Radovan Borojevic, Suzana A. Silva, Andre L.S. Sousa, Guilherme V. Silva, Claudio T. Mesquita, et al. 2004. "Improved Exercise Capacity and Ischemia 6 and 12 Months After Transendocardial Injection of Autologous Bone Marrow Mononuclear Cells for Ischemic Cardiomyopathy". *Circulation* 110 (11_suppl_1): II – 213–18. doi:10.1161/01.CIR.0000138398.77550.62.

- Peterson, Jonathan R., Oluwatobi Eboda, Shailesh Agarwal, Kavitha Ranganathan, Steven R. Buchman, Min Lee, Stewart C. Wang, Yuji Mishina, e Benjamin Levi. 2014. "Targeting of ALK2, a Receptor for Bone Morphogenetic Proteins, Using the Cre/lox System to Enhance Osseous Regeneration by Adipose-Derived Stem Cells". *Stem Cells Translational Medicine*, setembro. doi:10.5966/sctm.2014-0082.
- Pfeffer, M A, e E Braunwald. 1990. "Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications". *Circulation* 81 (4): 1161–72. doi:2138525.
- Pittenger, Mark F., Alastair M. Mackay, Stephen C. Beck, Rama K. Jaiswal, Robin Douglas, Joseph D. Mosca, Mark A. Moorman, Donald W. Simonetti, Stewart Craig, e Daniel R. Marshak. 1999. "Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells". *Science* 284 (5411): 143–47. doi:10.1126/science.284.5411.143.
- Planat-Bénard, V, C Menard, M André, M Puceat, A Perez, J-M Garcia-Verdugo, L Pénicaud, e L Casteilla. 2004. "Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells". *Circulation research* 94 (2): 223–29.
- Planat-Bénard, V, Jean-Sébastien Silvestre, Béatrice Cousin, Mireille André, Maryse Nibbelink, Radia Tamarat, Michel Clergue, et al. 2004. "Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives". *Circulation* 109 (5): 656–63.
- Prunier, Fabrice, Roger Gaertner, Liliane Louedec, Jean-Baptiste Michel, Jean-Jacques Mercadier, e Brigitte Escoubet. 2002. "Doppler echocardiographic estimation of left ventricular end-diastolic pressure after MI in rats". *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283 (1): H346–52. doi:10.1152/ajpheart.01050.2001.
- Qayyum, Abbas Ali, Mandana Haack-Sørensen, Anders Bruun Mathiasen, Erik Jørgensen, Annette Ekblond, e Jens Kastrup. 2012. "Adipose-derived mesenchymal stromal cells for chronic myocardial ischemia (MyStromalCell Trial): study design". *Regenerative Medicine* 7 (3): 421–28. doi:10.2217/rme.12.17.
- Quevedo, Henry C., Konstantinos E. Hatzistergos, Behzad N. Oskouei, Gary S. Feigenbaum, Jose E. Rodriguez, David Valdes, Pradip M. Pattany, et al. 2009. "Allogeneic mesenchymal stem cells restore cardiac function in chronic ischemic cardiomyopathy via trilineage differentiating capacity". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (33): 14022–27. doi:10.1073/pnas.0903201106.
- Rao, Akhilesh, Vishwam Pandya, e Adam Whaley-Connell. 2015. "Obesity and

- Insulin Resistance in Resistant Hypertension: Implications for the Kidney". *Advances in Chronic Kidney Disease* 22 (3): 211–17. doi:10.1053/j.ackd.2014.12.004.
- Ren, Yu, Haiqing Wu, Xueyuan Zhou, Jianxun Wen, Muzi Jin, Ming Cang, Xudong Guo, Qinglian Wang, Dongjun Liu, e Yuzhen Ma. 2012. "Isolation, expansion, and differentiation of goat adipose-derived stem cells". *Research in Veterinary Science* 93 (1): 404–11. doi:10.1016/j.rvsc.2011.08.014.
- Restelli, L., C. Lecchi, G. Invernizzi, G. Avallone, G. Savoini, e F. Ceciliani. 2015. "UCP1 and UCP2 Expression in Different Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue Deposits in 30 Days Old Goat Kids and Effect of Fatty Acid Enriched Diets". *Research in Veterinary Science*, março. doi:10.1016/j.rvsc.2015.03.014.
- Ribeiro, Karla Consort, Elisabete César Mattos, João Pedro Saar Werneck-de-castro, Vanessa Pinho Ribeiro, Ricardo Henrique Costa-e-Sousa, Amarildo Miranda, Emerson Lopes Olivares, et al. 2006. "Ectopic ossification in the scar tissue of rats with myocardial infarction". *Cell transplantation* 15 (5): 389–97.
- Rosen, Evan D., e Ormond A. MacDougald. 2006. "Adipocyte differentiation from the inside out". *Nat Rev Mol Cell Biol* 7 (12): 885–96. doi:10.1038/nrm2066.
- Rosenzweig, Anthony. 2012. "Cardiac Regeneration". *Science* 338 (6114): 1549–50. doi:10.1126/science.1228951.
- Ryu, Young-Joon, Tae-Jun Cho, Dong-Sup Lee, Jin-Young Choi, e Jaejin Cho. 2013. "Phenotypic Characterization and In Vivo Localization of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells". *Molecules and Cells* 35 (6): 557–64. doi:10.1007/s10059-013-0112-z.
- Sabourin, L A, e M A Rudnicki. 2000. "The molecular regulation of myogenesis". *Clinical genetics* 57 (1): 16–25.
- Sánchez, Pedro L., Ricardo Sanz-Ruiz, Ma Eugenia Fernández-Santos, e Francisco Fernández-Avilés. 2010. "Cultured and freshly isolated adipose tissue-derived cells: fat years for cardiac stem cell therapy". *European Heart Journal* 31 (4): 394–97. doi:10.1093/eurheartj/ehp403.
- Sanjuliani, Antonio, Marcia Torres, Lívia de Paula, e Fabiana Bassan. 2011. "Eixo renina-angiotensina-aldosterona: bases fisiológicas e fisiopatológicas". *Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto* 10 (3). <https://www.e-publicacoes.uerj.br/ojs/index.php/revistahupe/article/view/8857>.
- Santos, P E, e M O Masuda. 1991. "The electrocardiogram of rats with an old extensive myocardial infarction". *Brazilian Journal of Medical and Biological*

Research = Revista Brasileira De Pesquisas Médicas E Biológicas / Sociedade Brasileira De Biofísica ... [et Al 24 (11): 1173–77. doi:1823009.

- Saraiva, R M, R M Kanashiro-Takeuchi, E L Antonio, O Campos, P J F Tucci, e V A Moisés. 2007. "Rats with high left ventricular end-diastolic pressure can be identified by Doppler echocardiography one week after myocardial infarction". *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al 40 (11): 1557–65.*
- Selye, H, E Bajusz, S Grasso, e P Mendell. 1960. "Simple techniques for the surgical occlusion of coronary vessels in the rat". *Angiology 11 (outubro): 398–407. doi:13749954.*
- Seo, Byoung-Moo, Masako Miura, Stan Gronthos, Peter Mark Bartold, Sara Batouli, Jaime Brahim, Marian Young, Pamela Gehron Robey, Cun Yu Wang, e Songtao Shi. 2004. "Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament". *The Lancet 364 (9429): 149–55. doi:10.1016/S0140-6736(04)16627-0.*
- Shimamoto, Ren, Naoki Amano, Tomoko Ichisaka, Akira Watanabe, Shinya Yamanaka, e Keisuke Okita. 2014. "Generation and Characterization of Induced Pluripotent Stem Cells from Aid-Deficient Mice". *PLoS ONE 9 (4). doi:10.1371/journal.pone.0094735.*
- Shi, Ming, Masakazu Ishikawa, Naosuke Kamei, Tomoyuki Nakasa, Nobuo Adachi, Masataka Deie, Takayuki Asahara, e Mitsuo Ochi. 2009. "Acceleration of Skeletal Muscle Regeneration in a Rat Skeletal Muscle Injury Model by Local Injection of Human Peripheral Blood-Derived CD133-Positive Cells". *STEM CELLS 27 (4): 949–60. doi:10.1002/stem.4.*
- Smith, W M. 1985. "Epidemiology of congestive heart failure". *The American Journal of Cardiology 55 (2): 3A – 8A. doi:3966408.*
- Song, Lin, Naomi J. Young, Nicole E. Webb, e Rocky S. Tuan. 2005. "Origin and Characterization of Multipotential Mesenchymal Stem Cells Derived from Adult Human Trabecular Bone". *Stem Cells and Development 14 (6): 712–21. doi:10.1089/scd.2005.14.712.*
- Sousa, Bruna R., Ricardo C. Parreira, Emerson A Fonseca, Maria J. Amaya, Fernanda M. P. Tonelli, Samyra M. S. N. Lacerda, Pritesh Lalwani, et al. 2014. "Human Adult Stem Cells from Diverse Origins: An Overview from Multiparametric Immunophenotyping to Clinical Applications". *Cytometry Part A 85 (1): 43–77. doi:10.1002/cyto.a.22402.*
- Spadaro, J, M C Fishbein, C Hare, M A Pfeffer, e P R Maroko. 1980.

“Characterization of myocardial infarcts in the rat”. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 104 (4): 179–83. doi:6892678.

Steppan, Claire M., Shannon T. Bailey, Savitha Bhat, Elizabeth J. Brown, Ronadip R. Banerjee, Christopher M. Wright, Hiralben R. Patel, Rexford S. Ahima, e Mitchell A. Lazar. 2001. “The hormone resistin links obesity to diabetes”. *Nature* 409 (6818): 307–12. doi:10.1038/35053000.

Strem, Brian M, Kevin C Hicok, Min Zhu, Isabella Wulur, Zeni Alfonso, Ronda E Schreiber, John K Fraser, e Marc H Hedrick. 2005. “Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells”. *The Keio journal of medicine* 54 (3): 132–41.

Sun, Yao, e Karl T. Weber. 2000. “Infarct scar: a dynamic tissue”. *Cardiovasc Res* 46 (2): 250–56. doi:10.1016/S0008-6363(00)00032-8.

Takahashi, Kazutoshi, Koji Tanabe, Mari Ohnuki, Megumi Narita, Tomoko Ichisaka, Kiichiro Tomoda, e Shinya Yamanaka. 2007. “Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors”. *Cell* 131 (5): 861–72. doi:10.1016/j.cell.2007.11.019.

Takemura, Genzou, e Hisayoshi Fujiwara. 2006. “Morphological aspects of apoptosis in heart diseases”. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 10 (1): 56–75.

Tao, Bo, Mingliang Cui, Chen Wang, Sai Ma, Feng Wu, Fu Yi, Xing Qin, et al. 2015. “Percutaneous Intramyocardial Delivery of Mesenchymal Stem Cells Induces Superior Improvement in Regional Left Ventricular Function Compared with Bone Marrow Mononuclear Cells in Porcine Myocardial Infarcted Heart”. *Theranostics* 5 (2): 196–205. doi:10.7150/thno.7976.

Tholpady, Sunil S., Ramon Llull, Roy C. Ogle, J. Peter Rubin, J. William Futrell, e Adam J. Katz. 2006. “Adipose Tissue: Stem Cells and Beyond”. *Clinics in Plastic Surgery* 33 (1): 55–62. doi:10.1016/j.cps.2005.08.004.

Timmons, James A., Kristian Wennmalm, Ola Larsson, Tomas B. Walden, Timo Lassmann, Natasa Petrovic, D. Lee Hamilton, et al. 2007. “Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (11): 4401–6. doi:10.1073/pnas.0610615104.

Vázquez-Vela, Maria Eugenia Frigolet, Nimbe Torres, e Armando R. Tovar. 2008. “White Adipose Tissue as Endocrine Organ and Its Role in Obesity”. *Archives of Medical Research* 39 (8): 715–28. doi:10.1016/j.arcmed.2008.09.005.

Wang, Chung-Chi, Chun-Hung Chen, Wei-Wen Lin, Shiaw-Min Hwang, Patrick C. H. Hsieh, Po-Hong Lai, Yi-Chun Yeh, Yen Chang, e Hsing-Wen Sung. 2008.

- “Direct Intramyocardial Injection of Mesenchymal Stem Cell Sheet Fragments Improves Cardiac Functions after Infarction”. *Cardiovascular Research* 77 (3): 515–24. doi:10.1093/cvr/cvm046.
- Weitten, Mathieu, Jean-Patrice Robin, Hugues Oudart, Paul Pévet, e Caroline Habold. 2013. “Hormonal changes and energy substrate availability during the hibernation cycle of Syrian hamsters”. *Hormones and Behavior* 64 (4): 611–17. doi:10.1016/j.yhbeh.2013.08.015.
- Werneck-de-Castro, João Pedro S, Ricardo Henrique Costa-E-Sousa, Patricia Fidelis de Oliveira, Vanessa Pinho-Ribeiro, Débora B Mello, Ramon Peçanha, Elisabete Mattos, et al. 2006. “G-CSF does not improve systolic function in a rat model of acute myocardial infarction”. *Basic Research in Cardiology* 101 (6): 494–501. doi:10.1007/s00395-006-0605-4.
- Westphal, Ricardo João, Ronaldo Rocha Loures Bueno, Paulo Bezerra de Araújo Galvão, José Zanis Neto, Juliano Mendes Souza, Ênio Eduardo Guérios, Alexandra Cristina Senegaglia, Paulo Roberto Brofman, Ricardo Pasquini, e Claudio Leinig Pereira da Cunha. 2014. “Autologous Transplantation of Bone Marrow Adult Stem Cells for the Treatment of Idiopathic Dilated Cardiomyopathy”. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 103 (6): 521–29. doi:10.5935/abc.20140164.
- Yamada, Yoshihiro, Xiang-Di Wang, Shin-ichiro Yokoyama, Noboru Fukuda, e Nobuyuki Takakura. 2006. “Cardiac progenitor cells in brown adipose tissue repaired damaged myocardium”. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 342 (2): 662–70. doi:10.1016/j.bbrc.2006.01.181.
- Yan, Yufang, Tuo Ma, Kai Gong, Qiang Ao, Xiufang Zhang, e Yandao Gong. 2014. “Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation Promotes Adult Neurogenesis in the Brains of Alzheimer’s Disease Mice”. *Neural Regeneration Research* 9 (8): 798–805. doi:10.4103/1673-5374.131596.
- Young, Pampee P., e Richard Schäfer. 2014. “Cell-Based Therapies for Cardiac Disease: A Cellular Therapist’s Perspective”. *Transfusion*, setembro, n/a – n/a. doi:10.1111/trf.12826.
- Zhang, Xuelian, Haibin Wang, Xiang Ma, Azhati Adila, Baozhu Wang, Fen Liu, Bangdang Chen, Changyong Wang, e Yitong Ma. 2010. “Preservation of the cardiac function in infarcted rat hearts by the transplantation of adipose-derived stem cells with injectable fibrin scaffolds”. *Exp. Biol. Med.* 235 (12): 1505–15. doi:10.1258/ebm.2010.010175
- Zuk, Patricia A, Min Zhu, Peter Ashjian, Daniel A De Ugarte, Jerry I Huang, Hiroshi Mizuno, Zeni C Alfonso, John K Fraser, Prosper Benhaim, e Marc H Hedrick. 2002. “Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells”. *Molecular*

Biology of the Cell 13 (12): 4279–95. doi:PMC138633.

Zuk, P A, M Zhu, H Mizuno, J Huang, J W Futrell, A J Katz, P Benhaim, H P Lorenz, e M H Hedrick. 2001. “Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies”. *Tissue Engineering* 7 (2): 211–28. doi:11304456.