



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA
BÁSICA E APLICADA**



**ESTUDO PRÉ-CLÍNICO DE IMPLANTE DE CÉLULAS TRONCO
HEMATOPOÉTIICAS EM CAMUNDONGOS COM CARDIOPATIA
ISQUÊMICA INDUZIDA E TRATADOS COM FATOR DE
CRESCIMENTO CELULAR**

LIZIARA SILVA FRAPORTI

MANAUS

2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA
BÁSICA E APLICADA**

LIZIARA SILVA FRAPORTI

**ESTUDO PRÉ-CLÍNICO DE IMPLANTE DE CÉLULAS TRONCO
HEMATOPOÉTIICAS EM CAMUNDONGOS COM CARDIOPATIA
ISQUÊMICA INDUZIDA E TRATADOS COM FATOR DE
CRESCIMENTO CELULAR**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Imunologia
Básica e Aplicada da Universidade Federal do
Amazonas, como requisito para obtenção do
título de Mestre em Imunologia.**

**Orientadora: Prof^a Doutora Adriana Malheiro
Coorientador: Prof^a Doutor Felipe Naveca**

MANAUS

2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA
E APLICADA**

LIZIARA SILVA FRAPORTI

**ESTUDO PRÉ-CLÍNICO DE IMPLANTE DE CÉLULAS TRONCO
HEMATOPOÉTICAS EM CAMUNDONGOS COM CARDIOPATIA
ISQUÊMICA INDUZIDA E TRATADOS COM FATOR DE
CRESCIMENTO CELULAR**

A comissão julgou os trabalhos de defesa de Mestrado em sessão pública
realizada em/...../.....

Banca examinadora

Presidente: Nome: Prof^a Doutora Adriana Malheiro
Instituição: Universidade Federal do Amazonas
Assinatura:

Examinador (a): Nome:.....
Instituição:
Assinatura:

Examinador (a): Nome:.....
Instituição:
Assinatura:

Ficha catalográfica

Dedicatória

Dedico aos meus pais Gilberto e Marilene Fraporti,
Minha irmã Victória.
Por todo carinho, apoio e compreensão
E a Deus acima de tudo

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a **DEUS** por toda força e por iluminar meus passos para conquistar o que sempre busquei.

Em especial aos meus **pais** que nunca mediram esforços para me apoiar, e que sempre estiveram ao meu lado nos momentos em que mais precisei e mesmo de longe nunca faltou o apoio, o carinho, amor e a dedicação para que eu pudesse construir uma carreira profissional.

A toda minha **Família** por todas as palavras de apoio e por estarem sempre ao meu lado quando preciso.

Em especial as colegas que executaram esse projeto junto comigo **Elisa de Leon** e **Nadja Garcia**, pela determinação e dedicação de cada, concluímos esse trabalho que tiveram grandes desafios pela frente. E com certeza um laço de amizade se formou que será levado por toda vida.

À minha orientadora **Adriana Malheiro** pela oportunidade de entrar no grupo de pesquisa da Fundação HEMOAM em 2008, por passar seus conhecimentos, pela ajuda e compreensão quando preciso.

Aos Amigos da **DEP-Hemoam** em especial **João Paulo Pimentel, Gleicy Almeida, Adélia Marques, Ana Caroline Litaiff, Allyson e Andréa** e os demais colegas por toda ajuda e amizade para que esse trabalho fosse concluído.

À **Fundação de Hematologia e Hemoterapia (HEMOAM)** pela oportunidade e por abrir espaço para a pesquisa.

Ao **Instituto do Coração, São Paulo (INCOR)** em especial aos colegas **Leandro de Souza** e **Diego Figueroa** que nos ajudaram na parte experimental do projeto, passando os seus conhecimentos e técnicas.

Aos professores da UFAM, **Professor Dr. Fernando Marques** pelo apoio na parte histológica do projeto e a professora **Dra. Luciana Fujimoto** pelo apoio na análise histopatológica das lâminas.

Ao **Biotério** da UFAM em especial ao **Dr. Fábio Moroni** juntos podemos montar toda estrutura experimental do projeto.

Ao **Hospital Francisca Mendes** em especial **Dr. Jaime Maldonado** e **Enfermeira Vilma** pela ajuda e auxílio quando foi preciso.

À **Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada** pela oportunidade de formação profissional e científica.

Aos colegas de Mestrado **Juliana, Fernanda e Isabella** pela amizade que foi formada, pelo companheirismo e por todos os momentos que passamos juntas.

Aos meus **amigos** que sempre estiveram comigo, amigos de perto, amigos de longe, que foram a minha família muitas vezes. Sempre me apoiando, dando aquela palavra de conforto. Em especial **Patrícia Souza, Tatiane Amabile, Willian Douglas, Cleiton Fantin**. E os amigos que foram como pais para mim **Luci e Ricardo, Andréa e Codeo**. Pessoas que estiveram juntas nessa minha caminhada para concluir esse trabalho.

À CAPES/ FAPEAM e CNPQ pelo apoio financeiro.

E a todas as pessoas que de alguma forma fizeram parte deste trabalho e ajudaram de alguma forma. Com certeza foram importantes para que este trabalho fosse concluído.

AGRADEÇO

**"Aprendi que não se deve medir o sucesso pela posição que a pessoa alcançou na vida, mas pelos obstáculos que ela teve de superar enquanto tentava ser bem sucedida."
(Booker T. Washington)"**

Resumo

Diversas alternativas terapêuticas vêm sendo empregadas na terapia de paciente com doenças cardíacas. Nos últimos anos, a terapia celular emergiu como uma nova estratégia para doenças cardíacas isquêmicas representando a mais promissora abordagem para tratamento destas doenças. A literatura sugere que o uso de fator de crescimento celular direciona as CTH para o miocárdio e facilita o seu implante e diferenciação no local, porém poucos estudos pré-clínicos e clínicos foram feitos para esta citocina. O objetivo proposto neste estudo foi caracterizar o papel do G-CSF no remodelamento cardíaco em modelo experimental de infarto induzido, em camundongos implantados ou não com CTH. Foi realizada a obtenção de CTH do sangue periférico, com prévia mobilização com G-CSF em camundongos isogênicos e as células foram implantadas em diferentes grupos experimentais. As citocinas TGF- β , IL-6 foram dosadas pela técnica de *Enzume Linked Immunosorbant Assay* (ELISA) e as citocinas IL-2, MCP-1, TNF- α , IL-10, IL-12, IFN- γ por *Cytometric Bead Array* (CBA). A análise histopatológica do tecido cardíaco foi realizado através da coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) e Tricrômio de Malori. Na dosagem das citocinas observou-se que a concentração do TGF- β diminuiu no soro dos grupos experimentais (IAM, IAM-PBS, IAM-CTH-GCSF e IAM-GCSF) quando comparado ao grupo controle SHAM, ($p=0,0470$). A concentração da IL-6 apresentou aumento nos grupos IAM-PBS e IAM-CTH-G-CSF em relação aos grupos SHAM e IAM-G-CSF ($p=0,6053$). Observou que a IL-12 aumentou no grupo IAM-PBS, no tecido cardíaco em relação aos grupos SHAM, IAM-CTH-GCSF e IAM-GCSF e o IFN- γ diminuiu nos grupos IAM-CTH-G-CSF e IAM-GCSF. Dados da análise histopatológica não demonstraram nenhuma alteração no grupo SHAM. Por outro lado nos grupos infartados, sem nenhum tratamento (IAM) e IAM-PBS, foram identificadas, áreas de ectasia vascular, desorganização no sentido das fibras cardíacas, cicatrização transmural, discretas angiogênese e necrose, com pouco infiltrado inflamatório. Os grupos IAM-CTH e IAM-CTH-G-CSF apresentaram uma angiogênese moderada, áreas de cicatrização, discreta fibrose, infiltrado inflamatório com predomínio de macrófagos, plasmócitos e histiócitos, com discreta fibrose, ectasia vascular e desorganização da matriz extra-celular. No grupo IAM-G-CSF foi observado uma moderada angiogênese, com acentuado infiltrado inflamatório, característico de plasmócitos, áreas de calcificação e extensas áreas de fibrose. O G-CSF parece ter um importante papel no remodelamento cardíaco no modelo experimental estudado.

Palavras-chave: células tronco hematopoéticas, fator de estimulação de colônias de granulócitos, infarto do miocárdio, citocinas.

Abstract

Several therapeutic alternatives have been employed in the therapy of patients with heart disease. In recent years, cellular therapy has emerged as a new strategy for ischemic heart disease and represents the most promising approach to treating these diseases. The literature suggests that the use of cell growth factor directs the HSC to the myocardium and facilitates the implantation and differentiation of the cells at the implant site, but few preclinical and clinical data were made for this cytokine. The objective proposed in this study was to characterize the role of G-CSF on cardiac remodeling in an experimental model of myocardial infarction induced in mice implanted with or without CTH. Was performed to obtain peripheral blood hematopoietic stem cells, prior to mobilization with G-CSF in inbred mice and the cells were implanted in different experimental groups. The cytokine TGF- β , IL-6 were measured by the technique of Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and IL-2, MCP-1, TNF- α , IL-10, IL-12, IFN- γ by Cytometric Bead Array (CBA). Histopathology of heart tissue was performed by hematoxylin-eosin (HE) and Masson's Malory. The measurement of cytokines was observed that the concentration of TGF- β decreased the serum of the experimental groups (IAM, IAM-PBS, IAM-CTH-GCSF and IAM-GCSF) compared to SHAM control group ($p = 0.0470$). The concentration of IL-6 showed an increase in the IAM-PBS group and IAM-CTH-G-CSF groups compared to SHAM and IAM-GCSF ($p = 0.6053$). Observed that IL-12 increased in the IAM-PBS group, the heart tissue in relation to the SHAM groups, IAM-CTH-GCSF and IAM-GCSF, and IFN- γ decreased in group IAM-CTH-GCSF and IAM-GCSF. Data from histopathological analysis showed no change in the SHAM group. On the other hand in the infarcted groups, without any treatment (IAM) and IAM-PBS, were identified, areas of vascular ectasia, disorganization in the direction of cardiac fibers, transmural scar, mild angiogenesis and necrosis with little inflammatory infiltrate. Groups IAM-CTH and IAM-CTH-GCSF had a moderate angiogenesis, healing areas, slight fibrosis, and inflammatory infiltrate with predominance of macrophages, plasma cells and histiocytes, with mild fibrosis, vascular ectasia and disorganization of the extracellular matrix. In the IAM-GCSF group, was observed a moderate angiogenesis, with a pronounced inflammatory infiltrate, characteristic of plasma cells, areas of calcification and extensive fibrosis. The G-CSF seems to have an important role in cardiac remodeling in an experimental model studied.

Keywords: hematopoietic stem cells, factor granulocyte colony stimulanting, myocardial infarction, cytokines.

Lista De Abreviaturas

CT - Células Tronco

CTH - Células Tronco Hematopoéticas

CT-CTHs - Células Tronco a curto termo

CD - *Cluster of Differentiation*

FLT3 - Fator Ligante 3

GCSF - Fator de Estimulação de Colônias de Granulócitos

g - gramas

IL - Interleucina

IAM - Infarto Agudo do Miocárdio

IFN- γ - Interferon Gama

IC - Insuficiência cardíaca

kg - kilos

LT-CTHs - Células Tronco a longo termo

ml - mililitro

mm - milímetro

m/s - metros por segundo

PBMC - Células mononucleares do sangue periférico

pg - picograma

SCUP - Sangue de Cordão Umbilical

TGF- β - Fator de Crescimento Transformador

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

Th - Linfócito T *Helper*

VE - Ventrículo Esquerdo

μ L – microlitros

AVANÇOS DO USO DA TERAPIA CELULAR NA MIOCARDIOPATIA ISQUÊMICA

Liziara Fraporti^I
Nadja Garcia^{II}
Elisa Brosina de Leon^{III}
Jaime Giovany Arnez Maldonado^{IV}
Adriana Malheiro^V

^I Especialista em Hemoterapia- UEA, Mestranda em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas - UFAM, Professora da Faculdade Literatus, Manaus-AM;

^{II} Mestranda de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Manaus-AM;

^{III} Doutoranda de Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas – UFAM; Professora do Centro Universitário Luterano do Brasil – CEULM, Manaus – AM;

^{IV} Hospital Francisca Mendes Manaus/ Universidade do Estado do Amazonas;

^V Pesquisadora da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – HEMOAM, Professora da Universidade Federal do Amazonas – UFAM.

Resumo

O estudo das células-tronco (CT) tem-se mostrado uma área bastante explorada nos diversos segmentos da biologia nos últimos anos. As CTs são células pluripotentes capazes de se diferenciar em diversos tipos de células especializadas quando submetidas a determinadas condições fisiológicas ou experimentais. Com isso, a aplicação dessas CTs como terapia representou uma revolução no entendimento dos mecanismos de reparo e regeneração tecidual. No Brasil, estudos relatam o sucesso dos transplantes autólogos das CTs em diferentes doenças, como, nas doenças autoimunes e cardíacas. Pesquisadores no Brasil tem mostrado resultados interessantes de implante de CTs em diferentes cardiopatias, os quais tem apresentado melhora na fração de ejeção e na qualidade de vida do indivíduo. Muitos autores demonstrado em modelos animais alterações teciduais cardíacas que comprovam a importância da utilização destas células. Trabalhos desenvolvidos nos Estados Unidos demonstraram sucesso no uso de CTs obtidas do sangue periférico em cardiopatias. No entanto, o processo pelo qual as células se alojam no tecido cardíaco, a transdiferenciação e os mediadores envolvidos neste mecanismo ainda não foram totalmente esclarecidos. Esta revisão tem como objetivo descrever os avanços da aplicação das células-tronco hematopoéticas na cardiopatia isquêmica.

Palavras-chave: células-tronco hematopoéticas, infarto isquêmico, miocardiopatia, terapia celular.

Abstract

The study of stem cells (SCs) has proved an area widely exploited in several sectors of Biology. Stem Cells are pluripotent cells capable to differentiate in several types of specialized cells when exposed to physiological or experimental conditions. Thus, applying these SCs as therapy has represented a revolution in understanding the mechanisms of tissue repair and regeneration. In Brazil, studies report the success of autologous transplants of SCs in different diseases, such as in autoimmune and heart diseases. Brazilian researchers have shown interesting results of SCs implantation in different heart diseases, which have shown improvement in ejection fraction and quality of life individual. Many authors have demonstrated in animal models changes in cardiac tissue that prove the importance of using these cells. Studies carried in the United States have demonstrated successful use of SCs obtained from peripheral blood in heart

disease. However, the process by which cells become lodged in the heart tissue, transdifferentiation and the mediators involved this mechanism has not been fully elucidated. This review aims to describe the progress of the application of hematopoietic stem cells in ischemic cardiomyopathy.

Keywords

Hematopoetic Stem Cells, ischemic infarction, cardiomyopathy, cell therapy

Introdução

As células-tronco são células mononucleares imaturas, de origem embrionária, fetal ou do adulto e possuem três características que as distinguem dos outros tipos celulares: a) são células indiferenciadas e não especializadas; b) são capazes de se dividir e se auto-renovar indefinidamente; c) e são capazes de se diferenciarem em diversos tipos de células especializadas quando submetidas a certas condições fisiológicas ou experimentais (SILVA JUNIOR et al., 2009). Esta última característica, denominada de plasticidade ou transdiferenciação, destaca a importância dessas células em estudos que buscam a cura de doenças crônico-degenerativas (ORLIC et al., 2006; GOMES; PRANKE, 2008).

As células-tronco podem ser classificadas, em função de sua origem, em embrionárias ou não-embrionárias (células-tronco adultas e células-tronco de cordão umbilical) ou potencialidade, isto é, capacidade de diferenciação em totipotentes, pluripotentes e multipotentes. As células totipotentes resultam da divisão celular do óvulo fertilizado e podem dar origem a qualquer tipo de célula ou de tecido que compõe o embrião e que o sustenta durante seu desenvolvimento uterino. A divisão das células totipotentes resulta na formação das células pluripotentes (células-tronco embrionárias), que se originam da massa interna do blastocisto (SCHWINDT et al., 2005; SILVA JUNIOR et al., 2009) e são um pouco mais limitadas na sua diferenciação quando comparadas às células totipotentes. À medida que as células pluripotentes especializam-se, passam a constituir tecidos específicos e torna-ser mais restritas, denominando-se multipotentes ou células-tronco adultas (células-tronco hematopoéticas e mesenquimais), cuja função é a reparação e manutenção tecidual (SILVA JUNIOR et al., 2009). As células-tronco de cordão umbilical compreendem um conjunto de células-

tronco tipo-embrionárias e tipo-adultas, isto é, pluripotentes e multipotentes, respectivamente (NELSON et al., 2009).

Células-tronco Hematopoéticas

No fim do século XX, a aplicação das células-tronco (CTs) representou uma revolução no entendimento dos mecanismos de reparo e regeneração tecidual (BIANCO; ROBEY, 2001; SCHWINDT et al., 2005; PRENTICE, 2006). A célula-tronco adulta melhor caracterizada é a célula-tronco hematopoética (CTH) (CHRISTENSEN; WEISSMAN, 2001). Essas células residem como raras na medula óssea de mamíferos adultos (tipicamente de 0,01% a 0,05%), podendo também circular no sangue periférico, onde sua concentração é ainda menor (~0,001%), fígado fetal e sangue de cordão umbilical (SCUP) (CABRITA et al., 2006; WILSON; TRUMPP, 2006).

De acordo com sua capacidade de auto-renovação e diferenciação em células do tecido sanguíneo e sistema imune (WILSON; TRUMPP, 2006), as células-tronco hematopoéticas podem ser divididas funcionalmente em três tipos: células-tronco hematopoéticas com capacidade de auto-renovação a longo termo (LT-CTHs), células-tronco hematopoéticas com capacidade a curto termo (CT-CTHs) e progenitores multilinhagem que, aparentemente, são incapazes de se autorrenovar (ABDELHAY et al., 2009). Enquanto as LT-CTHs são consideradas capazes de se renovar indefinidamente, sendo responsáveis por repopular todo o sistema hematopoético, as CT-CTHs e os progenitores multilinhagem têm curta duração, sendo capaz de manter uma hematopoese por um período curto (REYA et al., 2001).

A identificação e a separação destas diferentes populações de células recaem sobre combinações de marcadores de superfície. As CTHs não expressam marcadores de superfície celular, normalmente expressos em células hematopoéticas comprometidas com linhagens (Lin-), porém expressam altos níveis de antígeno de célula-tronco 1

(SCA1) e KIT. Portanto, essas células são $\text{Lin}^- \text{SCA1}^+ \text{KIT}^+$, as quais abrangem as LT-CTHs que não expressam CD34 e tirosina-quinase-fms 3(FLT3), as CT-CTHs as quais expressam CD34 e não expressam FLT3 e as progenitoras multipotentes que expressam CD34 e FLT3 (figura 1) (KIEL et al., 2005; YANG et al.,2005; CHRISTENSEN; WEISSMAN, 2001) .

O sangue periférico tem sido utilizado como fonte de células-tronco hematopoéticas (CTH) para o transplante de medula óssea, visando à recomposição do tecido sanguíneo após a terapia mieloblástica, única aplicação clínica bem estabelecida até o momento para as células-tronco. Recentemente surgiram evidências de que as CTH também têm capacidade de se diferenciarem em outras linhagens celulares não hematopoéticas (MENDRONE JUNIOR, 2009), como por exemplo células musculares periféricas e cardiomiócitos (Dongxu Sun et al.,2008; Jackson, K.A. et al., 2001).

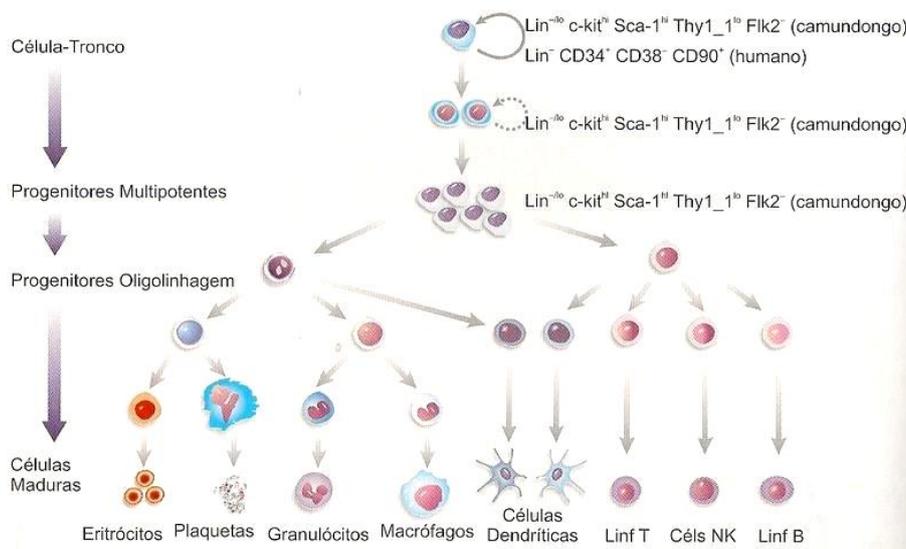


Figura 1: Hematopoese. O sistema hematopoético pode ser visto como uma hierarquia com origem nas Células-tronco hematopoéticas.

Fonte: ZAGO & COVAS, 2007.

Miocardopatias Isquêmicas

As doenças cardiovasculares ainda lideram as estatísticas como principal causa de óbito em todo mundo. A Organização Mundial de Saúde (OMS) projeta quase 20 milhões de mortes por doenças cardiovasculares nos próximos 10 anos (FRANGOIANNIS, 2008). Dentre as causas cardiovasculares, o infarto agudo do miocárdio (IAM), é a mais importante na maioria dos países desenvolvidos. À medida que um maior número de pacientes sobrevive ao IAM, muitos progridem para falência ventricular esquerda. No Brasil, grande número de pacientes portadores de miocardiopatia chagásica e os portadores de miocardiopatia isquêmica desenvolvem insuficiência cardíaca com grande ônus socioeconômico ao sistema único de saúde. Do ponto de vista fisiopatológico, a grande prevalência da insuficiência cardíaca pode ser explicada, ao menos parcialmente, pela inabilidade do coração em reparar/regenerar cardiomiócitos em processo de morte celular (GOWDAK et al., 2005).

A isquemia do miocárdio resulta em injúria e morte dos cardiomiócitos devido à privação de oxigênio e nutrientes (MYLOTTE et al.; 2008) conseqüente da oclusão de uma ou mais artérias coronárias responsáveis pela irrigação sanguínea do músculo cardíaco (OLIVEIRA; CAMPOS, 2009). A maioria dos infartos do miocárdio resulta de uma aterosclerose na coronária, agravada por ruptura aguda de placa aterosclerótica e subseqüente formação de um trombo coronário (FRANGOIANNIS, 2008). Como os cardiomiócitos requerem alta energia para a função contrátil, isso torna o miocárdio muito sensível à isquemia. A isquemia desencadeia uma série de eventos que culmina com a morte dos cardiomiócitos isquêmicos localizados na região suprida pela artéria (FRANGOIANNIS, 2008), via necrose no núcleo da região isquêmica e apoptose ao redor da zona de infarto (MYLOTTE et al.; 2008).

Nos momentos iniciais (minutos a horas) após o dano, a perda celular intensa e indiscriminada (cardiomiócitos, células endoteliais e nervosas) leva ao adelgaçamento das paredes cardíacas com a liberação sistêmica e local de mediadores inflamatórios. A resposta inflamatória é ativada visando o reparo, entretanto, essa resposta inicial amplifica o processo da lesão causando mais necrose. Paralelamente, os cardiomiócitos submetidos a um menor grau de isquemia sofrem morte celular por apoptose. A apoptose leva à perda do músculo cardíaco, mas pode, de alguma maneira, ajudar a

controlar a resposta inflamatória secundária ao IAM. Após a diminuição da inflamação aguda, ocorre o reparo a longo prazo e o processo de cicatrização juntamente com a formação neovascular (OLIVEIRA; CAMPOS, 2009). Porém, embora a circulação possa ser restabelecida, as áreas de fibrose não contribuem para o desempenho miocárdico global em função da perda das unidades contráteis. O processo conseqüente de modificações combinadas em tamanho, forma e função do coração após a lesão é chamado de remodelamento ventricular (OLIVEIRA; CAMPOS, 2009) e manifesta-se clinicamente como dilatação das câmaras, hipertrofia cardíaca, aumento do diâmetro do ventrículo esquerdo e piora da função cardíaca (FRANGOIANNIS, 2008).

A fraca correlação entre as alterações hemodinâmicas (índices de função cardíaca) com a intolerância ao exercício corrobora para a importância das alterações musculares e periféricas na fisiopatologia da IC, além das alterações centrais (SULLIVAN et al., 1990). Sendo estas alterações relacionadas com diminuição dos capilares no músculo periférico (FANG & MARWICK, 2002), modificação do tipo de fibras (DREXLER et al., 1992), apoptose das células musculares (HAMBRECHT et al., 1997), alterações mitocondriais, alterações de enzimas oxidativas (MARIN-GARCIA et al., 2001), aumento nas citocinas circulantes e alterações nutricionais (MURRAY et al., 2006) (Figura 2).

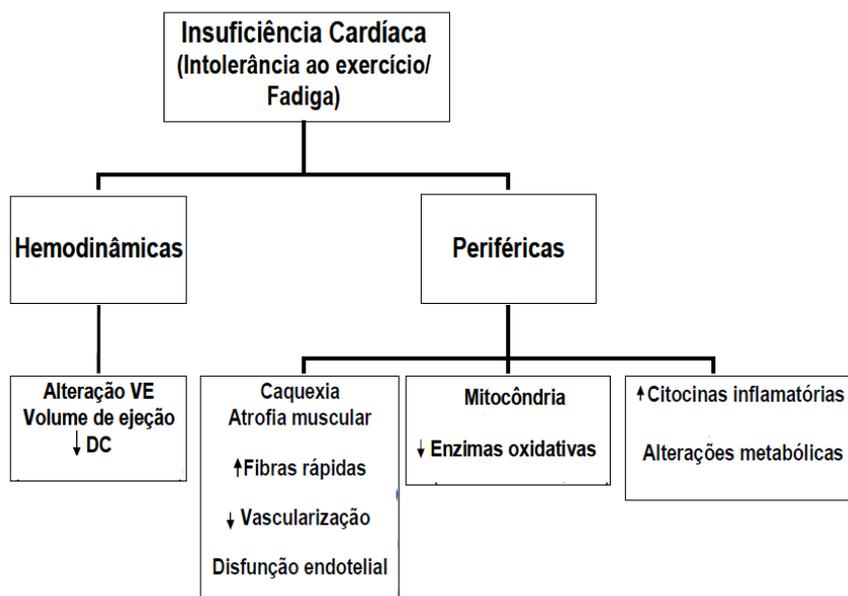


Figura 2: Principais alterações centrais e periféricas conseqüentes da Síndrome da Insuficiência Cardíaca.

Fonte: LEON, 2008.

Capacidade Terapêutica do uso de células-tronco hematopoéticas

O termo terapia celular descreve um conjunto, de limites poucos precisos, de métodos e abordagens tecnológicas fundamentadas no conhecimento de várias ciências, que visam a utilização de células para tratamento de doenças. O principal foco atual do interesse da terapia celular é a medicina regenerativa, em que se busca a substituição de células, ou tecidos lesados, senescentes ou perdidos para restaurar a sua função (ZAGO & COVAS., 2007).

Nos últimos anos, a medicina cardiovascular passou por extraordinárias revoluções: a explosão de estudos pré-clínicos e clínicos suportando a hipótese de que o tecido cardíaco lesado poderia ser reparado com a administração de células-tronco e da consequente formação de novos vasos e miócitos (ANGELI & OLIVEIRA, 2007; GERSH et al., 2009). Em modelos experimentais, diversos tipos celulares têm sido utilizados, assim como: mioblastos esqueléticos, células mononucleares de medula espinhal e células-tronco mesenquimais (KALIL et al., 2008). Porém, o modelo mais utilizado é a implantação de células provenientes da medula óssea. A hipótese inicial do funcionamento da terapia baseada no reparo proveniente de CT é a reposição de um novo grupo muscular no local isquêmico que permite a restauração da função cardíaca através da geração de força sistólica (LAFLAME et al., 2007a).

Nos trabalhos experimentais, demonstrou-se que a melhora funcional estava associada a uma diminuição da área de fibrose, à formação de novos cardiomiócitos e a vascularização (PAYNE, 2007). No infarto agudo do miocárdio, evidências têm mostrado que CT da medula óssea autólogas podem se regenerar dentro do miocárdio infartado e melhorar a perfusão da zona lesada (BARBASH et al., 2003; SMITH et al., 2008). Estudos em várias espécies demonstram que as CT derivadas da medula óssea podem originar vários tecidos mesenquimais. O crescimento e destino das CT dependem da colocação do enxerto no local apropriado; porém, os mecanismos pelos

quais o meio influencia na diferenciação ainda não estão totalmente determinados. Supõe-se que o destino das CT da medula óssea é determinado pelo meio no qual elas são injetadas ao invés de seu destino intrínseco programado. Assim, por exemplo, o tropismo positivo cardíaco após estímulo pode promover e intensificar a transdiferenciação de CT derivadas da medula óssea para o fenótipo de cardiomiócito (STRAUER et al., 2003).

Estudos recentes levantam a possibilidade que exista um sistema natural de cardiomiócitos, conhecidos como células-tronco satélites ou mioblastos, para reparação tecidual. Entretanto, menos de 50% de cardiomiócitos são substituídos durante uma vida normal, e este sistema parece ser insuficiente para a magnitude de uma reparação completa após isquemia ou insuficiência cardíaca (GERSH et al., 2009). O reparo cardíaco pode ser considerado como o resultado de três processos principais: a substituição (transplante de tecidos), rejuvenescimento ou restauração (ativação de CTs cardíacas residentes ou outras CTs, através de mecanismos parácrinos ou autócrinos, modulação da apoptose, inflamação, angiogênese) e regeneração (células progenitoras ou CTs diferenciando-se em cardiomiócitos (GERSH et al., 2009).

Os estudos clínicos utilizando células-tronco hematopoética em cardiologia começaram no Brasil em 2002, usando como premissa para a sua realização dados laboratoriais obtidos com modelos animais que demonstravam a melhora funcional e tecidual das áreas isquêmicas do coração quando as CTs eram implantadas após infarto agudo do miocárdio (ORLIC et al., 2001). Nos trabalhos experimentais, demonstrou-se que a melhora funcional estava associada a uma diminuição da área de fibrose, à formação de novos cardiomiócitos e a neovascularização (PAYNE et al., 2007). O tratamento de animais com hormônios celulares, tais como o G-CSF e o SCF, capazes de induzir a mobilização de células de medula óssea para a periferia, associado ao uso de CT também foi capaz de diminuir as lesões causadas posteriormente por um processo isquêmico no miocárdio (ORLIC et al., 2001) . Além disso, há fortes evidências de que células endoteliais possam ser derivadas de células-tronco da medula óssea (TEPPER et al., 2003). Porém, ainda encontram-se divergências na literatura (Murry et al., 2004) dos efeitos benéficos da implantação de CTs após IAM.

Conclusões

Os mecanismos de reparo cardíaco endógenos não são suficientes para regenerar os corações de pacientes após o infarto do miocárdio. Logo, os progressos na biologia das células-tronco e na medicina regenerativa vem ampliando as pesquisas em terapia celular como tratamento para a insuficiência cardíaca. A multiplicação de cardiomiócitos funcionais e saudáveis, a formação neovascular, o controle da apoptose e fibrose e a modulação da resposta inflamatória seriam potencialmente benéficos e são objetivos naturais da terapia celular em Cardiologia.

REFERÊNCIAS

ABDELHAY ESW, PARAGUAÇÚ-BRAGA, FH, BINATO R, BOUZAS LFS. Células-tronco de origem hematopoética: expansão e perspectivas de uso terapêutico. *Res.Bras.Hematol.Hemoter.* 2009; 31(1):2-8.

ANGELI FS & OLIVEIRA EM. Terapia Celular no Tratamento do Infarto Agudo do Miocárdio. *Rev Bra Cardiol Invas* 2007; 15(2): 145-150.

BIANCO, P.; ROBEY, P.G. Stem Cells in Tissue Engineering. **Nature**, v.414, p.118-121, 2001.

BARBASH IM, CHOURAQUI P, BARON J, et al. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium. *Circulation* 2003;108:863-868.

CABRITA, G.J., FERREIRA, B.S., da SILVA C.L., GONÇALVES, R., QALMEIDA-PORADA, G., CABRAL, J.M. Hematopoietic Stem Cells: from the bone to the bioreactor. **Trends Biotechnol**, v.21, n.5, p.233-240, 2003.

CHRISTENSEN, J., L & WEISSMAN, I.L. Flk-2 is a Marker in Hematopoietic Stem Cell Differentiation: a Simple Method to Isolated Long-Term Stem Cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-PNAS**, v. 98, n.25, p.14541-14546, 2001.

Dongxu Sun, Carlo O. Martinez, Oscar Ochoa, Lourdes Ruiz-Willhite, Jose R. Bonilla. Bone marrow-derived cell regulation of skeletal muscle regeneration. *The FASEB Journal* 2008).

DREXLER, H.; RIEDE, U.; MUNZEL, T.; KONIG, H.; FUNKE, E.; JUST, H. Alterations of skeletal muscle in chronic heart failure. **Circulation**, v.85, p. 1751-1759, 1992.

FANG, Z.Y.; MARWICK, T.H. Vascular dysfunction and heart failure: epiphenomenon or etiologic agent? **American Heart Journal**, v.143, p. 383-390, 2002.

FRANGOIANNIS, N.G. The Immune System and Cardiac Repair. **Journal Pharmacological Research**, v.58, n.2, p.88-111, 2008.

GERSH B.J, SIMARI R, BEHFAR A, TERZIC C.M, TERZIC A. Cardiac Cell Repair Therapy: A Clinical Perspective. *Mayo Clin Proc* 2009; 84(10):876-892.

GOMES, T.L.; PRANKE, P. Comparação entre as Células-tronco de Sangue de Cordão Umbilical de Neonatos Prematuros e Nascidos a Termo: uma Revisão. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.40, n.1, p.25-30, 2008.

GOWDAK, L.H.; SCHETTERT, I.T.; ROCHITTE, C.E.; LISBOA, L.A.; DALLAN, L.A.; CESAR, L.A.; KRIEGER, J.E.; RAMIRES, J.A.; OLIVEIRA, S.A. Cell therapy plus transmyocardial laser revascularization for refractory angina. **The Annals Thoracic Surgery**, v.80, p.712-714, 2005.

HAMBRECHT, R.; FIEHN, E.; YU, J.; NIEBAUER, J.; WEIGL, C.; HILBRICH, L., ADAMS, V.; REIDE, U.; SHULER, G. Effects of endurance training on mitochondrial ultrastructure and fiber type distribution in skeletal muscle of patients with stable chronic heart failure. **Journal of the American College Cardiology**, v.29, p. 1067-1073, 1997.

Jackson, K.A. et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J. Clin. Invest.* 2001; 107:1395–1402.

KALIL RA, OTT D, SANT'ANNA R, DIAS E, MARQUES-PEREIRA JP, DELGADO-CANEDO A, *et al.* Autologous transplantation of bone marrow mononuclear stem cells by mini-thoracotomy in dilated cardiomyopathy: technique and early results. *Sao Paulo medical journal = Revista paulista de medicina* 2008;126:75-81.

KIEL, M.J., YILMAZ, O.H., IWASHITA, T., TERHORST, C., MORRISON, S. J. SLAM Family Receptors Distinguish Hematopoietic Stem and Progenitor Cells and Reveal Endothelial Niches for Stem Cells. **Cell Press**, v.121, n.7, p.1109-1121, 2005.
LAFLAMME MA, ZBINDEN S, EPSTEIN SE, MURRY CE. Cell-based therapy for myocardial ischemia and infarction: pathophysiological mechanisms. *Annual review of pathology* 2007a;2:307-339.

LEON, E.B.D. Efeitos da Estimulação Elétrica sobre os Parâmetros Hemodinâmicos, Morfologia, Densidade Vascular e Concentração de Glut-4 na Musculatura Esquelética Periférica de Ratos com Insuficiência Cardíaca Crônica Induzida por Infarto do Miocárdio. 2008. 69 f. Dissertação em Ciências Médicas. Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Porto Alegre.

MENDRONE JUNIOR A. Sangue periférico como fonte de células para terapia celular. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 2009; 31(supl.1):19-24.

MARIN-GARCIA, J.; GOLDENTHAL, M.J.; MOE, G.W. Abnormal cardiac and skeletal muscle mitochondrial function in pacing-induced cardiac failure. **Cardiovascular Research**, v.52, p.103-110, 2001.

MURRAY AJ, LYGATE CA, COLE MA, CARR CA, RADDA GK, NEUBAUER S, *et al.* Insulin resistance, abnormal energy metabolism and increased ischemic damage in the chronically infarcted rat heart. *Cardiovasc Res* 2006;71:149-157.

MYLOTTE, L.A.; DUFFY, A.M.; MURPHY, M.; O'BRIEN, T.; SAMALI, A.; BARRY, F.; SZEGEZDI, E. Metabolic Flexibility Permits Mesenchymal Stem Cell Survival in an Ischemic Environment. **Stem Cell**, v.26, p.1325-1336, 2008.

NELSON, T.J.; BEHFAR, A.; YAMADA, S.; MARTINEZ-FERNANDEZ, A.; TERZIC, A. Stem cell Platforms for Regenerative Medicine. **Clinical and Translational Science**, v.2, n.3, p. 222-227, 2009.

OLIVEIRA, D.M.; CAMPOS, A.H. Uso Terapêutico de Células-tronco em Cardiologia. **Einstein**, v.7, n.2, p.229-236, 2009.

ORLIC D, KAJSTURA J, CHIMENTI S, ET AL. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001;410:701-5(a).

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, *et al.* Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001;98:10344-10349.

ORLIC, D.; KAJSTURA, J.; CHIMENTI, S.; BODINE, D.M.; LERI, A.; ANVERSA, P. Transplanted Adult Bone Marrow Cells Repair Myocardial Infarcts in Mice. **Annals New York Academy of Sciences**, 2006.

PAYNE TR, OSHIMA H, OKADA M, MOMOI N, TOBITA K, KELLER BB, *et al.* A relationship between vascular endothelial growth factor, angiogenesis, and cardiac repair after muscle stem cell transplantation into ischemic hearts. *Journal of the American College of Cardiology* 2007;50:1677-1684.

PRENTICE, D.A. Current Science of Regenerative Medicine with Stem Cells. **Journal of Investigative Medicine**, v. 54, p.33-37, 2006.

REYA, T., MORRISON S.J., CLARKE M.F., WEISSMAN, I.L. Stem Cell, Cancer and Cancer Stem Cells. **Nature**, v. 414, n.6859, p.105-111, 2001.

SCHWINDT, T.T.; BARNABÉ, G.F.; MELLO, L. Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células tronco. **Jornal Brasileiro de Neurocirurgia**, v. 16, n.1, p. 13-19, 2005.

SILVA JÚNIOR F.C.; ODONGO, F.C.A.; DULLEY, F.L. Células-tronco hematopoéticas: utilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.31, n.1, p. 53-58, 2009.

SMITH R.R, BARILE L, MESSINA E, MARBÁN E. Stem cell in the heart: What's the buzz all about? Part 2: Arrhythmic risks and clinical studies. *Heart Rhythm* 2008; 5(6):880-887.

STRAUER BE, KORNOWSKI R. Stem Cell Therapy in Perspective. *Circulation* 2003; 107:929-934.

SULLIVAN, M.J.; GREEN, H.J.; COBB, F.R. Skeletal muscle biochemistry and histology in ambulatory patients with long-term heart failure. **Circulation**, v.81, p.518-527, 1990.

Tepper OM, Sealove BA, Murayama T, Asahara T. Newly emerging concepts in blood vessel growth: recent discovery of endothelial progenitor cells and their function in tissue regeneration. *J Investig Med* 2003;51:353-359.

WILSON, A.; TRUMPP, A. Bone-marrow Haematopoietic Stem-Cell Niches. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, p.93-106, 2006.

YANG, L., BRYDER, D., ADOLFSSON, J., NYGREN, J., MANSSON, R., SIGVARDSSON, M., EIRIK, S. Identification of Lin⁻ Sca1⁻ Kit⁻ CD34⁻ FLT3⁻ Short-Term Hematopoietic Stem Cells capable of rapidly Reconstituting and Rescuing Myeloablated Transplant Recipients. **Blood Journal**, v.105, n.7, p.2717-2723, 2005.

ZAGO M.A., COVAS D.T. Células-Tronco, a Nova Fronteira da Medicina. São Paulo: Editora Atheneu, 2007.

EFEITO DO GCSF NO REMODELAMENTO CARDÍACO EM CAMUNDONGOS COM INFARTO INDUZIDO E IMPLANTADOS COM CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTICAS.

Liziara Fraporti^{1,2}, Elisa Brosina de Leon^{2,3}, Nadja Garcia^{2,4}, João Paulo Diniz Pimentel², Leandro E. de Souza⁵, Diego M. Taboas Figueroa⁵, José Fernando Marques⁶, Luciana Fujimoto⁷, Jaime Arnez Maldonado⁸, Adélia Figueiredo², Gleicy Almeida², Maria Claudia Irigoyen⁵, Felipe Gomes Naveca⁹, Adriana Malheiro^{1,2}.

¹. Programa de Pós-graduação em Imunologia, Universidade Federal do Amazonas, AM, Brasil; ². Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, Manaus, Brasil; ³. Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil; ⁴. Programa de Pós-Graduação em Ciência da Saúde, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil; ⁵. Unidade de Hipertensão, Instituto do Coração (InCor), Escola de Medicina da Universidade de São Paulo, SP, Brasil; ⁶. Departamento de Histologia da Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, AM, Brasil; ⁷. Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil; ⁸. Hospital Francisca Mendes, Manaus, AM, Brasil, ⁹. Instituto Leônidas e Maria Deani – FIOCRUZ/AM, Manaus, AM, Brasil.

Experimento: Estudar o efeito do Fator de estimulação de colônias de granulócitos (GCSF) no remodelamento cardíaco em camundongos com infarto induzido e implantados com células tronco hematopoéticas.

Métodos e Resultados: Foram distribuídos 84 camundongos isogênicas fêmeas BALB/C em 7 grupos de 12 animais: Grupo doador, Grupo SHAM (controle), Grupo IAM, Grupo IAM-PBS, Grupo IAM-CTH, Grupo IAM-CTH-GCSF e Grupo IAM-GCSF. Os animais foram infartados (IAM e IAM-PBS), tratados somente com GCSF (IAM-GCSF) ou tratados com GCSF e implantados com CTH. Após 30 dias de experimentos esses foram animais foram submetidos ao exame ecocardiográficos e teste de esforço físico. Em seguida foi avaliado o perfil de citocinas no soro e tecido cardíaco e foram feitas análises do tecido cardíaco. Na dosagem das citocinas observou-se que o TGF- β diminuiu no soro dos grupos IAM, IAM-PBS, IAM-CTH-GCSF e IAM-GCSF quando comparado ao grupo controle SHAM, ($p=0,0470$). A IL-6 apresentou aumento

nos grupos IAM-PBS e IAM-CTH-GCSF em relação aos grupos SHAM e IAM-GCSF ($p=0,6053$). Observou-se que a IL-12 aumentou no grupo IAM-PBS, no tecido cardíaco em relação aos grupos SHAM, IAM-CTH-GCSF e IAM-GCSF enquanto o IFN- γ diminuiu nos grupos IAM-CTH-GCSF e IAM-GCSF. Na análise histopatológica foi observado áreas de remodelamento em todos os grupos experimentais e áreas de calcificação no grupo IAM-GCSF.

Conclusão: O GCSF parece ter um importante papel no remodelamento cardíaco no modelo experimental estudado.

Palavras-chave: células-tronco hematopoéticas, fator de estimulação de colônias de granulócitos, infarto do miocárdio, citocinas,

INTRODUÇÃO

A insuficiência cardíaca (IC) é classicamente definida como a incapacidade do coração em bombear suprimento adequado de sangue em relação ao retorno venoso e às necessidades metabólicas tissulares.¹ Esta síndrome é resultado de alterações estruturais ou funcionais cardíacas que prejudicam a habilidade do ventrículo esquerdo (VE) de ejetar sangue², gerando um aumento da pressão capilar pulmonar e o decréscimo da função cardíaca. Este evento geralmente ocorre após uma lesão no miocárdio, que pode ser ocasionada por necrose muscular e/ou pela progressão fisiopatológica de uma doença cardíaca crônica. Como resposta a esse processo ocorrem alterações hemodinâmicas, elevação e ativação do sistema neuro-hormonal e aumento das pressões ventriculares o que representa a piora da função cardíaca.^{3,4}

Os modelos experimentais de infarto do miocárdio após a ligação da artéria coronária em ratos tem sido a técnica de insuficiência cardíaca mais utilizada para estudos de implante de células tronco. A oclusão completa da artéria coronária

esquerda resulta em infarto do miocárdio com ocorrência evidente de IC e comprometimento periférico, após 3 a 6 semanas.⁵

Atualmente, a aplicação clínica de células-tronco adultas humanas representa a mais promissora abordagem para regeneração celular orgânica no tratamento de doenças cardíacas e extra cardíacas. Em condições favoráveis estas células podem se diferenciar em células maduras tissulares.⁶ Nos últimos anos houve uma explosão de estudos pré-clínicos e clínicos suportando a hipótese de que o tecido cardíaco pode ser tratado com o uso de células tronco, tendo como consequência a formação de novos vasos e miócitos.⁷ As células-tronco adultas possuem uma plasticidade de gerar linhagens de células diferentes de seu órgão original.

O Fator de estimulação de colônias de granulócitos (GCSF) é uma citocina hematopoiética normalmente utilizado no tratamento de pacientes com câncer. Estudos têm demonstrado propriedades regenerativas devido a mobilização das células tronco da medula óssea, em animais. Como resultado, esta vêm sendo testada como uma terapia para insuficiência cardíaca isquêmica em seres humanos. Estudos indicam que a GCSF recruta células tronco para o miocárdio lesado, e além disso, ele pode ainda induzir a transdiferenciação destas células em cardiomiócitos, outro mecanismo que também poderia ser benéfico para o indivíduo.⁸ Apesar de muitos estudos sugerirem um papel importante do GCSF em estudos de implante com células tronco, pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos no remodelamento do miocárdio e do papel desta citocina neste processo. O objetivo proposto neste estudo foi caracterizar o papel do GCSF no remodelamento cardíaco em modelo experimental de infarto induzido, em camundongos, tratados e implantados com células tronco hematopoiéticas ou (GCSF).

MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Biotério Central da Universidade Federal do Amazonas e no Laboratório de Terapia Celular da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas-HEMOAM. Foram utilizados camundongos isogênicos fêmeas BALB/c, com 30 dias de idade, com peso médio de 22 gramas, provenientes do Biotério da Universidade Estadual Paulista de Botucatu (UNESP). Foram respeitados os princípios de cuidados com animais de laboratório de acordo com a lei nº6638 da Republica Federativa do Brasil que trata de normas para as práticas didático-científico da vivisseção de animais. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal do Amazonas –UFAM protocolo número 017/2010.

Os animais foram divididos em 7 grupos, com um número amostral em média de 12 animais: 1) Grupo doador: doador de células-tronco periféricas, estes animais receberam uma dose de fator de crescimento de granulócitos (GCSF) e após o 3º dia de tratamento o sangue foi coletado pelo plexo ocular; 2) Grupo Sham: foram submetidos à toracotomia lateral esquerda, sem oclusão da artéria; 3) Grupo IAM-PBS: os animais foram submetidos ao infarto pela oclusão da artéria coronária esquerda e receberam injeção no coração (VE) de solução salina 0,9%; 4) Grupo IAM-CTH: os animais foram submetidos ao infarto, foram implantados com células PBMC, isoladas do Grupo doador; 5) Grupo IAM-CTH-GCSF: os animais foram submetidos ao infarto, receberam PBMC isoladas do grupo doador, e foram tratados com uma dose de 200 µg/kg de GCSF, durante 5 dias consecutivos; 6) Grupo IAM-GCSF: os animais foram submetidos ao infarto, foi injetada uma solução salina a 0,9% e foram tratados com uma dose de 200 µg/kg de GCSF durante 5 dias consecutivos; 7) Grupo IAM: os animais foram submetidos ao infarto, pela oclusão da artéria coronariana esquerda.

Modelo experimental do Infarto do miocárdio.

Os animais foram inicialmente anestesiados (cloridrato de xilazina (Anasedan[®], Paulínia- SP 0,01ml + cloridrato de cetamina (Ketamin –S(+), Itapira-SP) 0,03 ml + 0,6 ml de solução fisiológica), intubados e ventilados artificialmente (HSE-HÁ MiniVent Ventilador for mice – Harvard). Para a indução do infarto foi utilizada a técnica de ligadura da artéria coronária esquerda.⁹ A técnica consiste na exposição do ventrículo esquerdo através de uma toracotomia esquerda, entre a quarta e quinta costelas com posterior sutura da artéria coronária descendente principal esquerda, em um ponto entre 1 e 2 mm distalmente ao bordo do átrio esquerdo. O espaço intercostal foi suturado e o pneumotórax drenado por um sistema de aspiração contínua. A temperatura do animal foi mantida entre 36.8° e 37°C em gaiolas de recuperação.

Preparo e isolamento das células tronco hematopoética.

Foi administrado o Fator de Crescimento GCSF (Filgrastine[®]/Blausiegel Ind.e Com.Ltda), na dose de 200 µg/kg, por via subcutânea por um período de três dias prévios à coleta das CTH no grupo doador, de acordo com o descrito por VILAS-BOAS e colaboradores.¹⁰ O sangue periférico foi coletado em seringa heparinizada pelo plexo ocular e as células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram isoladas, através da separação em gradiente de Ficoll (HISTOPAQUE[®]-1077/Sigma-Aldrich[®]/St.Louis,MO EUA), pelo método de Boyum modificado.¹¹ Em seguida realizou-se a contagem celular em câmara de Neubauer (em solução de Turk) e a viabilidade celular foi determinada utilizando-se o corante vital Azul de Tripán, sendo a viabilidade média de 89% . O percentual de células tronco hematopoiético foi determinado pela análise fenotípica dos marcadores anti-CD34^{+high}/CD45^{+low},

obedecendo ao Protocolo do ISHAGE¹² e o número de PBMC total implantado foi de $2,584 \times 10^3$ em 0,06 mL.

Implante das células-tronco

O implante das células foi realizado sete dias após a indução do infarto, por meio de esternotomia mediana, em uma única injeção no local da lesão¹³, sob as mesmas técnicas anestésicas e ventilatória descritas anteriormente.

Estudo Ecocardiográfico e Teste de Esforço

Após um período de 30 dias os animais foram anestesiados e ventilados (como descrito anteriormente) para o estudo ecocardiográfico. Após a tricotomia da região anterior do tórax, os animais foram posicionados em decúbito dorsal para a realização do exame, utilizando o equipamento GE® VIVID 5 (Highland Park Dr. Bloomfield, USA). A área de infarto foi estimada pela determinação do perímetro interno da região infartada em relação ao perímetro total do coração.

O teste de esforço físico foi realizado através de teste progressivo escalonado até a exaustão do animal em esteira rolante¹⁴ com velocidade inicial de 0,2 m/s, sem inclinação. A cada três minutos, a velocidade foi aumentada em 0,08 m/s, até a exaustão total do animal. A média da velocidade final e da distância total percorrida por cada animal durante o teste foi determinada.

Histopatologia

Após todos os testes os animais foram eutanasiados e os corações retirados e dissecados, separando-se o ventrículo esquerdo e direito. O ventrículo esquerdo foi

dividido em duas partes uma para análise histológica, fixadas em solução de formol a 10% e a outra parte foi armazenada em solução de RPMI-1640 (Sigma-Aldrich®/ *St.Louis,MO EUA*), para a análise das citocinas no tecido cardíaco. Cortes transversais do ventrículo esquerdo foram obtidos em Microtomo (SLEE MAIZ modelo CUT 4055), e as lâminas coradas pelo método hematoxilina-eosina (HE) ou Tricrômio de Malori para a análise histopatológica.

Dosagem de Citocinas

As concentrações de citocinas foram determinadas na amostra tecidual e do plasma em pool de 2 animais cada. Para tanto, o ventrículo esquerdo foi triturado, centrifugado e o sobrenadante armazenado para a dosagem das citocinas. As citocinas (IL-2, IL-10, INF- γ , TNF, IL-12, MCP-1) foram quantificadas por citometria de fluxo utilizando o citômetro FACS CALIBUR (BD Bioscience, San Diego, CA, USA), através do Kit *Cytometric Bead Array* (CBA). As técnicas foram executadas de acordo com o protocolo de cada kit das citocinas, para este procedimento foram utilizados: *Mouse inflammationn Kit*, *Mouse Th1/Th2 Kit* (BD Bioscience, San Diego, CA, USA). A Citocinas TGF- β e IL-6 foram quantificadas através do método *Enzume Linked Immunosorbant Assay* (ELISA) usando a leitora de placas ASYS Hitech (GmbH modelo Atlantis 4, Eugendorf, Áustria). Para este procedimento foram utilizados o Kit BD OptEIA (BD Bioscience, San Diego, CA, USA).

Análise estatística

Para análise dos dados utilizou-se o programa GraphPad Prism (versão 5.0). A análise estatística foram os Testes não-paramétricos de Kruskall-Wallis para a

comparação dos grupos e para a comparação grupo a grupo o teste não-paramétrico de Mann Whitney. Os valores de $p < 0,05$ indicaram significância.

RESULTADOS

Estudos Ecocardiográficos e Teste de Esforço

Um mês após o procedimento, os animais dos grupos IAM, IAM-PBS, IAM-CTH, IAM-CTH-GCSF e IAM-GCSF apresentaram aumento do perímetro do infarto quando comparado com o grupo SHAM, sendo o p valor $< 0,0001$ (tabela 1). Os animais que receberam implante com CTH, tratados ou não com GCSF (IAM-CTH, IAM-CTH-GCSF) e o grupo infartado, tratado somente com GCSF (IAM-GCSF), apresentaram diminuição significativa do perímetro do infarto quando comparado com os animais infartados (IAM, IAM-PBS), sendo os valores de $p=0,0061$, $0,0046$, $0,0007$ e $0,0263$, $0,0066$ e $0,0021$, respectivamente.

Para avaliar a resistência dos animais após o infarto, aplicou-se um teste de esforço físico, e avaliou-se a distância percorrida por cada animal e o tempo gasto para o percurso (metros/segundo). Como mostra a tabela 2, observou-se que não houve diferença estatística significativa em relação ao tempo tolerado pelos animais dos grupos IAM, IAM-PBS, IAM-CTH, IAM-CTH-GCSF e IAM-GCSF, em relação ao SHAM ($p=0,0597$). No entanto, os animais do grupo IAM-GCSF suportaram menor tempo de corrida, quando comparado com os grupos SHAM ($p=0,0147$), IAM ($p=0,0553$), IAM-PBS ($0,0067$), IAM-CTH ($p=0,1878$) e IAM-CTH-GCSF ($p=0,0232$). Em relação a distância percorrida, observou-se que os animais do grupo IAM-GCSF, percorreram menor distância em relação aos demais grupos, sendo a diferença

estatisticamente significativa ($p= 0,0313$). Esta diferença foi mais clara comparando-se o grupo IAM-GCSF com os grupos SHAM ($p<0,0001$), IAM ($p=0,0250$), IAM-PBS ($p=0,0014$), IAM-CTH ($p=0,1878$) e IAM-CTH-GCSF ($p=0,0342$).

Concentração de TGF- β , IL-6 TNF- α , MCP-1, IL-2, IL-12, IFN- γ e IL-10 no soro e coração, “ex-vivo”

Como após o infarto, o coração inicia um processo de remodelamento, que culmina com um processo inflamatório, nosso próximo objetivo foi caracterizar o perfil de citocinas no sangue e no sobrenadante do homogenizado do ventrículo esquerdo, “ex-vivo”, nos diferentes grupos. No entanto não foi possível quantificar as citocinas do grupo IAM e IAM-CTH, devido ao alto número de morte destes animais durante os experimentos.

Como mostra a figura 1 (A), observou-se que a concentração do TGF- β diminuiu no soro dos grupos experimentais (IAM, IAM-PBS, IAM-CTH-GCSF e IAM-GCSF) quando comparado ao grupo controle (SHAM), sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p=0,0470$). No grupo, infartado, tratado com GCSF que recebeu o implante de CTH (IAM-CTH-GCSF) houve um aumento da concentração desta citocina, porém não houve significância estatística quando comparado aos demais grupos. Por outro lado, observou-se que não houve diferença estatística significativa da concentração de TGF- β no tecido cardíaco entre os grupos estudados ($p=0,4178$). Observou-se um aumento da concentração desta citocina no grupo IAM-PBS em relação aos demais grupos, experimentais e controle. No entanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa, figura 1 (B).

Como demonstra a figura 1 (C e D), a concentração da IL-6, uma citocina pró-inflamatória, no soro e coração apresentou aumento nos grupos IAM-PBS e IAM-CTH-GCSF em relação aos grupos SHAM e IAM-GCSF, no entanto não houve significância estatística ($p=0,6053$).

Em relação ao TNF- α , outra citocina inflamatória, observou-se aumento no soro do grupo IAM-PBS em relação aos demais grupos, figura (2A), no entanto esta diferença não foi estatisticamente significante. Por outro lado, os resultados demonstraram uma maior concentração de TNF- α no grupo SHAM (tecido cardíaco) quando comparado com os demais grupos experimentais, figura 2 (B), mas a diferença não foi estatisticamente significativa.

A figura 2 (C e D) demonstra a dosagem da quimiocina MCP-1 no soro e tecido cardíaco, respectivamente. No soro não foi observado diferença estatística significativa entre os grupos estudados ($p=0,7967$). Por outro lado, foi observado que mesmo não sendo estatisticamente significativo, o MCP-1 está aumentado no tecido cardíaco do grupo IAM-PBS, em relação aos grupos SHAM e IAM-GCSF. Interessantemente, o grupo IAM-CTH-GCSF demonstrou uma baixa concentração desta quimiocina no tecido cardíaco em relação aos demais grupos, no entanto esta diferença não foi estatisticamente significativa.

A análise da IL-2 demonstrou que não houve diferença estatística significativa da concentração desta citocina no soro, entre o grupo SHAM e os demais grupos estudados ($p=0,318$). Assim como no soro, no tecido cardíaco, também não foi observado diferença estatística significativa de IL-2, entre os grupos, SHAM e IAM-PBS, IAM-CTH-GCSF, IAM-GCSF ($p=0,8701$), figura 2 (E e F). O grupo IAM-CTH-

GCSF apresentou-se aumentado em relação aos demais grupos, porém como citado anteriormente não houve diferença estatística significativa.

Com o objetivo de avaliarmos a polarização da resposta imune no soro e tecido cardíaco, o próximo passo foi analisar as concentrações de IL-12, INF- γ e IL-10 nos diferentes grupos estudados. Como mostra a figura 3 (A e B), não foi observada diferença estatística significativa de IL-12 entre os grupos experimentais, tanto no soro quanto no tecido cardíaco. No entanto, observou-se que a IL-12 aumentou no grupo IAM-PBS, no tecido cardíaco em relação aos grupos SHAM, IAM-CTH-GCSF e IAM-GCSF, figura 3 (B).

Em relação ao IFN- γ , foi observado aumento significativo desta citocina no soro do grupo IAM-GCSF em relação ao grupo IAM-CTH-GCSF, ($p=0,0159$). No entanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa em relação aos grupos SHAM e IAM-PBS, figura 3 (C). Quando avaliou-se o perfil desta citocina no tecido cardíaco, observou-se que houve aumento no grupo IAM-PBS em relação aos demais grupos, não sendo estatisticamente significativa, figura 3 (D) . Observou-se ainda, que houve uma redução drástica de IFN- γ , nos grupos IAM-CTH-GCSF e IAM-GCSF, figura 3 (D).

Em relação a IL-10, uma citocina supressora da resposta Th1, não foi observado diferença estatística significativa entre os grupos estudados, no soro ou tecido cardíaco, figura 3 (F).

Análise Histopatológica

Dados da análise histopatológica do grupo SHAM não demonstraram nenhuma área de necrose, fibrose ou cicatrização por colágeno, caracterizando-se como uma histologia normal do tecido cardíaco, figura 4 (A e B). Por outro lado nos grupos infartados, sem nenhum tratamento (IAM) ou que receberam PBS intra-cardíaco, foram identificadas, áreas de ectasia vascular, desorganização no sentido das fibras cardíacas, cicatrização transmural, discretas angiogênese e necrose, com pouco infiltrado inflamatório. Além disso, diferente do observado para o grupo IAM, no IAM-PBS observou-se, o espessamento da parede.

Os grupos IAM-CTH figura 5 (A e B) e IAM-CTH-GCSF figura 5 (C e D) apresentaram angiogênese moderada, áreas de cicatrização, discreta fibrose, infiltrado inflamatório com predomínio de macrófagos, plasmócitos e histiócitos, com discreta fibrose, ectasia vascular e desorganização da matriz extra-celular. No grupo IAM-GCSF figura 5 (F e G), foi observado angiogênese moderada, com acentuado infiltrado inflamatório, característico de plasmócitos, áreas de calcificação e extensas áreas de fibrose.

DISCUSSÃO

A prevalência de doenças do coração tem aumentado significativamente em todo o mundo. A prevenção e tratamento pós-infarto, para evitar o desenvolvimento de falhas cardíacas tem sido alvo de grande preocupação para a saúde pública, como forma de melhorar a qualidade e aumentar a expectativa de vida, além de reduzir gastos públicos com internações hospitalares.

Diversos mecanismos podem desencadear as falhas cardíacas pós-infarto, como a expansão da área do infarto, hipertrofia do miocárdio, fibrose e dilatação ventricular. Estes mecanismos estão relacionados a alterações moleculares, celulares e tissulares. No entanto, muitos destes mecanismos não são completamente entendidos.¹⁵

Muitos estudos utilizando modelos animais de infarto/isquemia tem sido essenciais para análise do processo de remodelamento cardíaco, pós-infarto. No presente estudo, avaliamos o efeito do implante de células tronco no miocárdio de camundongos com infarto induzido, por oclusão da artéria coronária esquerda, associado ou não ao tratamento com o GCSF.

Nos estudos ecocardiográficos observamos aumento no perímetro do infarto, nos grupos experimentais em relação ao grupo SHAM. Estudos desenvolvidos por outros autores demonstram que como resultado da oclusão da artéria coronária, ocorre débito metabólico no tecido cardíaco, causando a hipóxia. Se a isquemia persiste, pode ocorrer uma injúria irreversível, iniciando um processo de morte celular. No coração isquêmico, as células podem morrer por diferentes processos, como por exemplo, necrose ou apoptose.¹⁶ Os cardiomiócitos parecem ser as células mais vulneráveis a apoptose e estes mecanismos apresentam uma ação direta na sobrevida do miocárdio e no desenvolvimento de falhas cardíacas ao longo do tempo.¹⁷

Devido à capacidade de mobilizar as células mononucleares e tendo em vista a eficácia da terapia com GCSF para reparação cardíaca, diversos estudos foram realizados em modelos experimentais de infarto agudo do miocárdio, associado ao tratamento com GCSF. Estudos demonstraram que o uso de GCSF, em diferentes tempos após o infarto, induziu uma melhora funcional do coração, diminuição da mortalidade e da área do infarto, com possível regeneração do tecido lesado.¹⁸

Neste estudo lançamos mão do uso de GCSF para o tratamento de camundongos infartados, implantados ou não com células tronco. Semelhante ao observado por Sanganalmath e colaboradores¹⁸, camundongos que receberam células tronco e foram tratados com GCSF, ou aqueles infartados e tratados somente com GCSF, apresentaram redução do perímetro do infarto, quando comparado com os animais somente infartados, que receberam ou não PBS. Estes dados sugeriram inicialmente, uma melhora no débito cardíaco. No entanto, ao contrário do esperado, quando avaliamos a resistência ao esforço, curiosamente, animais infartados que receberam o tratamento com GCSF apresentaram menor resistência quando comparado aos demais grupos analisados, sugerindo um efeito deletério desta citocina no coração destes animais.

Um processo inflamatório é iniciado após a lesão do miocárdio induzida pelo infarto, este processo ocorre como um mecanismo de reparo tecidual e inclui a mobilização e infiltração de células, assim como deposição de colágeno, que são essenciais para o remodelamento do ventrículo.¹⁹

Muitos mecanismos imunes são iniciados, induzindo uma resposta inflamatória mediada por quimiocinas e citocinas. As quimiocinas estimulam o recrutamento de leucócitos para a área do infarto, enquanto citocinas promovem interações adesivas entre leucócitos e células endoteliais.¹⁹

Dentre as citocinas envolvidas no processo inflamatório, a IL-6 e o TNF- α são detectados no tecido cardíaco logo após o início da isquemia e parecem estar envolvidas no processo de remodelamento tecidual, enquanto o TGF- β desempenha um papel crucial na reparação cardíaca, suprimindo a inflamação e promovendo a modulação fenotípica de miofibroblastos e deposição da matriz extracelular, resultando na formação de angiogênese e tornando o local altamente vascularizado.¹⁹

Estudos clínicos demonstram que altas concentrações de IL-6 e TNF- α na circulação e no coração de indivíduos com insuficiência cardíaca estão relacionadas à progressão da doença.²⁰

Em nosso modelo, não observamos diferença estatística significativa em relação às concentrações de IL-6 no soro ou tecido cardíaco. Os dados demonstram uma redução, não significativa, da concentração desta citocina no grupo IAM-GCSF, em ambos os compartimentos, quando comparado com os demais grupos estudados. Alguns mecanismos podem estar envolvidos nos resultados observados neste estudo. Um deles poderia ser o momento do processo inflamatório em que as amostras foram coletadas, ou seja, 30 dias após o infarto. Alguns estudos demonstram que a síntese da IL-6 é rapidamente induzida em células mononucleares e cardiomiócitos no coração. No entanto, o papel funcional desta citocina na cicatrização tecidual pós infarto permanece desconhecido.²¹

Outro mecanismo seria a regulação da produção desta citocina pelo GCSF. Estudos de terapia com GCSF em modelos animais de infarto agudo do miocárdio demonstram a eficácia desta citocina para o reparo do tecido. Orlic e colaboradores²² demonstraram que a administração de GCSF e SCF (fator de células tronco), 5 dias antes e 3 dias após a oclusão da coronária em ratos, aumentou a sobrevivência, o desempenho dos animais e reduziu o remodelamento pela formação de cardiomiócitos e de novos vasos sanguíneos. No entanto, o efeito do GCSF sobre a produção da IL-6 não está totalmente esclarecido.²²

O TNF- α é uma citocina inflamatória, tendo um papel importante no desenvolvimento da insuficiência cardíaca. Alguns trabalhos sugerem que no início da liberação, esta citocina, pode ter uma função restauradora ou reparadora no processo de

remodelamento pós-infarto, e se mantida ao longo do tempo pode ter um papel deletério sobre o miocárdio.²³ No presente estudo, observamos que não houve diferença estatística significativa em relação à produção de TNF- α , no soro ou tecido cardíaco, 30 dias após o infarto. Os dados demonstraram uma tendência à diminuição desta citocina no tecido cardíaco nos grupos experimentais, infartados e que receberam os diferentes tratamentos. Estes dados sugerem que ocorreu uma supressão da produção desta citocina nestes animais, e este mecanismo parece estar relacionado ao processo de reparação tecidual.

Uma vez que os estudos clínicos e experimentais demonstram que o TGF- β está envolvido no desenvolvimento das doenças cardiovasculares, seria importante compreender as ações biológicas deste, no modelo experimental do presente estudo. O TGF- β tem sido relacionado ao desenvolvimento destas doenças, por apresentar-se aumentado na hipertrofia do miocárdio após o estresse cardíaco.²⁴

Os resultados encontrados no presente estudo demonstraram uma diminuição significativa desta citocina no soro dos animais infartados, tratados somente com PBS, ou com GCSF, ou ainda aqueles que receberam CTH e foram tratados com GCSF, quando comparado ao controle (SHAM). Quando avaliamos a concentração desta citocina no tecido cardíaco, não observamos diferenças estatísticas significativas, mas houve uma tendência ao aumento desta citocina nos grupos IAM-PBS e IAM-CTH-GCSF, quando comparado com os animais SHAM. Estes dados, juntamente aos observados para a IL-6 e TNF- α , sugerem que o GCSF parece modular a produção e liberação de citocinas, que poderiam estar envolvidas no remodelamento do tecido cardíaco pós infarto, levando a um efeito benéfico do GCSF no miocárdio. Dados da literatura demonstram que o TGF- β induz, como citado anteriormente, fibrose cardíaca,

por converter fibroblasto em miofibroblasto e aumentar a deposição de colágeno no local da inflamação.²⁵

As quimiocinas desempenham um papel crítico na inflamação por induzir a locomoção e o tráfico de leucócitos para o local da lesão. Recentes estudos em modelos experimentais de infarto do miocárdio demonstraram forte indução de vários membros da família de quimiocinas na isquemia capazes de promoverem o recrutamento de leucócitos, e atuarem no processo de angiogênese e na deposição de tecido fibroso.¹⁹ Estudos demonstraram que a MCP-1 atua no recrutamento e ativação de macrófagos, síntese de citocinas, como a IL-1 e IL-6, e acúmulo de miofibroblastos em áreas de infarto. Em nosso estudo, não observamos diferenças significativas na concentração desta citocina no soro, nos diferentes grupos experimentais. Além disso, os dados obtidos nos experimentos deste estudo demonstraram que o grupo infartado, tratado com PBS, apresentou um aumento desta quimiocina no tecido cardíaco, quando comparado com os demais grupos. Apesar deste aumento não ter sido significativo, pode-se sugerir que este seria um mecanismo de recrutamento de células para o coração. Dados da literatura corroboram os encontrados no presente estudo e inferem que a MCP-1 tem um papel de sinalização no remodelamento pós-infarto. Estudos utilizando camundongos com deficiência no receptor CCR2, receptor da quimiocina MCP-1 demonstraram uma diminuição da infiltração de macrófagos e um aumento da dilatação ventricular após o infarto.²⁶

Como a IL-2 tem sido descrita como uma citocina que confere cardioproteção contra lesões induzidas por isquemia, nosso próximo passo foi avaliar a produção desta citocina no soro e tecido cardíaco. Os achados deste estudo demonstraram que não houve diferença significativa das concentrações de IL-2 no soro nos diferentes grupos de animais estudados. Ao contrário do observado no soro, a IL-2 apresentou-se

aumentada no grupo IAM-CTH-GCSF no tecido cardíaco, quando comparado aos demais grupos. Estes dados foram interessantes, uma vez que a IL-2 está envolvida com diferenciação e maturação celular. Alguns autores descreveram os efeitos benéficos do pré-tratamento com IL-2 contra a lesão induzida por isquemia no coração isolado de ratos e mostraram que houve melhora dos parâmetros de contração e relaxamento do ventrículo esquerdo nestes animais.²⁷ Nossos dados sugerem que o efeito observado no grupo IAM-CTH-GCSF parece estar relacionado ao implante de células tronco no coração destes animais, uma vez que não foi observado aumento desta citocina nos grupos, IAM-PBS, tratados ou não com GCSF. Mas, o mecanismo pelo qual estas células poderiam interferir nesta modulação não está esclarecido.

Outras citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias também foram analisadas no presente estudo. Como observado em nossos resultados e citados anteriormente, não observamos diferença estatística significativa quanto a IL-12, no soro ou tecido cardíaco. Os dados mostraram uma tendência ao aumento desta citocina no tecido cardíaco, nos grupos IAM-PBS e IAM-CTH-GCSF, sugerindo uma polarização da resposta imune para o perfil Th1 nestes grupos. No entanto, quando avaliamos as concentrações do IFN- γ , observamos que o grupo infartado que recebeu tratamento somente com GCSF apresentou aumento significativo desta citocina no soro destes animais quando comparado com aqueles infartados, implantados com CTH e que foram tratados com GCSF. No tecido cardíaco não foi observado nenhuma diferença estatística em relação a esta citocina nos diferentes grupos estudados. Apesar do IFN- γ , induzir uma resposta do perfil Th1 e aumentar o processo inflamatório local, no presente modelo experimental parece não desempenhar um papel no remodelamento cardíaco.

A IL-10 atua predominante de maneira anti-inflamatória e modulatória na resposta imune e tem sido relacionada com doenças crônicas, como por exemplo a

insuficiência cardíaca.²⁸ Em nosso estudo não foi observado diferença significativa desta citocina no soro ou tecido cardíaco nos diferentes grupos estudados, apesar de se apresentar diminuída nos grupos experimentais em relação SHAM. Estes resultados eram esperados uma vez que no tecido cardíaco pós-infarto ocorre o remodelamento tecidual, o que é depende de um processo inflamatório intenso.

O remodelamento tecidual é um processo que ocorre a nível celular e sub-celular, com muitas alterações nos fenótipos das células no tecido cardíaco, como por exemplo, os cardiomiócitos que sofrem mudanças no seu tamanho e superfície (hipertrofia) e mecanismos moleculares envolvidos na contração e relaxamento.¹⁵ Considerando estes fatores e os achados do presente estudo, o nosso próximo objetivo foi analisar o tecido cardíaco. Os dados demonstraram que, todos os grupos experimentais parecem estar em processo de remodelamento tecidual, por apresentarem características próprias deste processo, como presença de infiltrado celular, deposição de colágeno, fibrose e angiogênese. No entanto, alguns aspectos particulares foram observados nos diferentes grupos. Nos grupos de animais infartados que foram implantados com células tronco, tratados ou não com GCSF, observou-se que além dos aspectos descritos acima, também houve desorganização da matriz extra-celular no tecido cardíaco. Este dado sugere que as células tronco parecem estar em processo de diferenciação celular ou induzindo diferenciação de células locais por potenciarem a produção de citocinas e/ou fatores próprias do coração. Estes achados foram concomitantes com o aumento de IL-2 no grupo IAM-CTH-GCSF, citado anteriormente. Porém, não foi possível avaliar a produção desta citocina nos animais infartados e implantados com CTH e que não receberam GCSF.

Curiosamente o grupo IAM-GCSF apresentou áreas de calcificações, além dos fenômenos observados no processo de remodelamento. Estes dados nos surpreenderam,

uma vez que, como citado anteriormente, estes animais apresentaram menor perímetro de infarto quando comparado com os demais grupos experimentais. No entanto, a baixa resistência ao exercício físico, apresentada por este grupo experimental poderia estar relacionada à calcificação observada. Estes dados nos levam a pensar que a administração do GCSF nos animais infartados parece induzir um processo inflamatório muito intenso, culminando em um remodelamento mais precoce, no entanto, com efeito deletério para o coração. Estes dados corroboram aos observados por Eckman e colaboradores,²⁹ que demonstraram um efeito deletério do uso do GCSF em pacientes com infarto do miocárdio. Por outro lado, assim como observado no presente estudo, outros autores demonstraram que em camundongos tratados com GCSF associado ao SCF antes da indução do infarto e implantados com CTH houve regeneração cardíaca, concomitantemente com o aumento da sobrevivência destes animais.³⁰ Estes dados vão de encontro aos observados em nosso modelo, uma vez que, animais infartados, implantados com CTH e que receberam tratamento com GCSF, apresentaram menor perímetro do infarto e melhor resistência ao esforço físico. Este efeito poderia estar relacionado a uma modulação induzida no coração pelo GCSF. Alguns efeitos do GCSF tem sido descrito na literatura, dentre eles o efeito direto sobre receptores de superfície da membrana de cardiomiócitos e indireto produzido no miocárdio por infiltração de células inflamatórias e células tronco. O GCSF parece acelerar a infiltração de células inflamatórias no miocárdio, através da expressão de moléculas de adesão. No processo de cicatrização do Infarto, as células inflamatórias, principalmente neutrófilos e macrófagos, estimulam a reabsorção do tecido necrosado e acelera a proliferação da matriz extracelular. O equilíbrio desses eventos leva a uma expansão ventricular acentuada, conseqüentemente uma redução da dilatação ventricular e preservação da função cardíaca.

CONCLUSÃO

De acordo com o observado nos resultados obtidos neste estudo conclui-se que o uso do GCSF associado ao implante de CTH parece ter um efeito benéfico no remodelamento cardíaco em camundongos com infarto induzido. Porém, em nosso modelo experimental novos estudos deverão ser feitos para a melhor compreensão dos efeitos do GCSF.

AGRADECIMENTOS

À Fundação HEMOAM, FAPEAM, CAPES, CNPq e as técnicas do laboratório de Histologia da UEA (Glaucinete Mateus Avila, Rosilene Campos Ribeiro e Idenilde de Melo Albuquerque Brito).

REFÊRENCIAS

1. Mota ACA, Soares MBP, Santos RR, Uso da terapia com células tronco da medula óssea em doenças cardiovasculares – perspectivas do hematologista. *Rev.Bras.Hematol.Hemoter.* 2005; 27(2):126-132.
2. Hunt SA, Abraham WT, Chun MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, *et al.* ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): developed in collaboration with the American College of Chest Physicians and the International Society for Heart and Lung Transplantation: endorsed by the Heart Rhythm Society. *Circulation.* 2005;112:e154-235.
3. Gheorghiane M, De Luca L, Fonarow GC, Filippatos G, Metra M, Francis GS. Pathophysiologic targets in the early phase of acute heart failure syndromes. *Am J Cardiol.* 2005;96:11-17.

4. Abbate A, Bussani R, Amin M, Vetovec G, Baldi A. Acute myocardial infarction and heart failure: role of apoptosis. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2006;38:1834-1840.
5. Hasenfuss G. Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy. *Cardiovasc Res*. 1998;39:60-76.
6. Brehm M, Zeus T, Strauer BE. Stem cells and Perspectives. *Herz*. 2002; 7: 611-620.
7. Angeli FS & Oliveira EM. Terapia Celular no Tratamento do Infarto Agudo do Miocárdio. *Rev Bra Cardiol Invas*. 2007;15(2): 145-150.
8. Baldo MP, Rodrugues SL, Mill JG. Granulocyte colony-stimulating factor for ischemic heart failure: should we use it? *Heart Fail Rev*. 2010;15:613-623.
9. Lutz M, Rosenberg M, Kiessling F, Eckstein V, Heger T, Krebs J, *et al*. Local injection of stem cell factor (SCF) improves myocardial homing of systemically delivered c-kit + bone marrow-derived stem cells. *Cardiovascular research*. 2008;77:143-150.
10. Vilas-Boas F, Feitosa GS, Soares MPB, Mota A, Pinho-filho JA, Alemida AJG, Andrade MV, Carvalho HG, Dourado-Oliveria A, Ribeiro dos Santos R. Resultados Iniciais do Transplante de Células de medula óssea para o miocárdio de pacientes com Insuficiência cardíaca de Etiologia Chagásica. *Arq Bras Cardiol*. 2006; 87(2):159-166.
11. Boyum A. Separation of blood leucocytes and lymphocytes. *Tissue Antigens*.1974; 4(4):269-274.
12. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-ye. The ISHAGE Guidelines for CD34⁺ Cell Determination by Flow Cytometry. *Journal of Hemoterapy*. 1996; 5:213 -226.
13. Brofman PR, Carvalho KA, Guarita-Souza LC, Rebellato C, Hansen P, Senegaglia AC, Myague N, Furuta M, Francisco JC, Olandoskim M. Transplante celular: análise funcional, imunocitoquímica e histopatológica em modelo experimental de miocardiopatia isquêmica utilizando diferentes células. *Rev. Bras. Cir Cardiovasc*. 2004; 19(3): 261-266.
14. Ferreira JC, Rolim NP, Bartholomeu JB, Gobatto CA, Kokubun E, Brum PC. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2007;34:760-765.
15. Mill JG, Stefanon I, Dos Santos L, Baldo MP. Remodeling in the ischemic heart: the stepwise progression for heart failure. *Braz.J.Med.Biol.Res*. 2011.
16. Dos Santos L, Santos AA, Goncalves GA, Krieger JE, Tucci PJ. Bone marrow cell therapy prevents infarct expansion and improves border zone remodeling after coronary occlusion in rats. *Int J Cardiol*. 2010; 145: 34-39.

17. Simonis G, Wiedemann S, Schwarz K, Christ T, Sedding DG, Yu X, et al. Chelerythrine treatment influences the balance of pro- and anti-apoptotic signaling pathways in the remote myocardium after infarction. *Mol Cell Biochem.* 2008; 310: 119-128.
18. Sanganalmath S.K., et al. Hematopoietic cytokines for cardiac repair: mobilization of bone marrow cells and beyond. *Basic Res Cardiol.* 2011; 106(5):709-733.
19. Frangogiannis NG. The immune system and cardiac repair. *Pharmacol Res.* 2008; 58(2):88-111.
20. Candia e Cols. Ativação imune-inflamatória na insuficiência cardíaca. *Arq Bras Cardiol.* 2007;89(3):201-208.
21. Liao Z, Brar BK, Cai Q, Stephanou A, O'Leary RM, Pennica D, Yellon DM, Latchman DS. Cardiotrophin-1 (CT-1) can protect the adult heart from injury when added both prior to ischaemia and at reperfusion. *Cardiovasc Res.* 2002;53:902-910.
22. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:10344-10349.
23. Deten A, Volz HC, Briest W, Zimmer HG. Cardiac cytokine expression is upregulated in the acute phase after myocardial infarction. Experimental studies in rats. *Cardiovasc Res.* 2002; 55: 329-340.
24. Aihara K. et al., Transforming Growth Factor β 1 as a Common Target Molecule for Development of Cardiovascular Diseases, Renal Insufficiency and Metabolic Syndrome. *Cardiology Research and Practice.* 2011
25. Dean RG, Balding LC, Candido R, Burns WC, Cao Z, Twigg SM, et al. Connective tissue growth factor and cardiac fibrosis after myocardial infarction. *J Histochem Cytochem.* 2005; 53: 1245-1256.
26. Xia Y, Frangogiannis NG. MCP-1/CCL2 as a therapeutic target in myocardial infarction and ischemic cardiomyopathy. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2007;6:101-107.
27. Cao CM, Xia Q, Tu J, Chen M, Wu S e Wong TM. Cardioprotection of Interleukin-2 Mediated via κ -Opioid Receptors. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics.* 2004; 309:560-567.
28. Batista M L Jr, Lopes RD, Seelaender MCL, et al. Efeito anti-inflamatório do treinamento físico na insuficiência cardíaca: Papel do TNF- α e da IL-10. *Arq Bras Cardiol.* 2009; 93(6):692-700.
29. Eckman PM, Bertorg SC, Wilson FR, Henry TD. Ischemic Cardiac Complications Following GCSF. *Catheterization and Cardiovascular Interventions.* 2010; 76:98-101.

30. Orlic D, Hill JM, Arai AE. Stem Cells for Myocardial Regeneration. *Circ. Res.* 2002;91:1092-1102.

Tabela 1: Análise do Perímetro Total e Perímetro do Infarto nos diferentes grupos estudados

	SHAM (n=11) média±SD	IAM-PBS (n=11) média±SD	IAM (n=7) média±SD	IAM-CTH (n=4) média±SD	IAM-CTH- GCSF (n=10) média±SD	IAM-GCSF (n=09) média±SD	p*
Perímetro Total	1,050±0,1199	1,134±0,2100	1,310±0,2214	1,195±0,1799	1,017±0,1783	1,084±0,1571	0,0738
Perímetro do Infarto	0,0±0,0	0,3455±0,1332	0,3971±0,1634	0,1775±0,0287	0,1960±0,0670	0,1722±0,0547	<0,0001
Área de IAM (%)	0,0±0,0	29,76±7,432	27,44±5,317	14,91±2,240	20,27±5,704	16,12±3,623	<0,0001

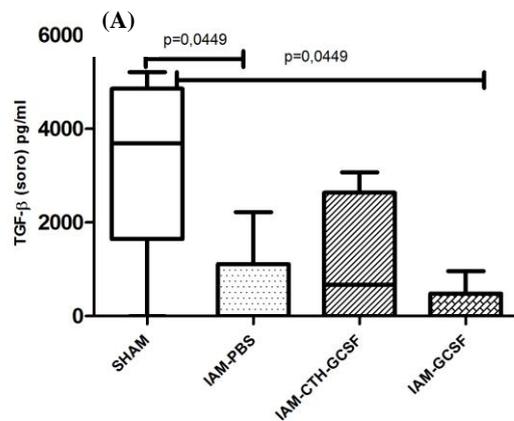
(*) Teste de Kruskal-Wallis

Tabela 2: Teste de Esforço realizado 30 dias após o Infarto

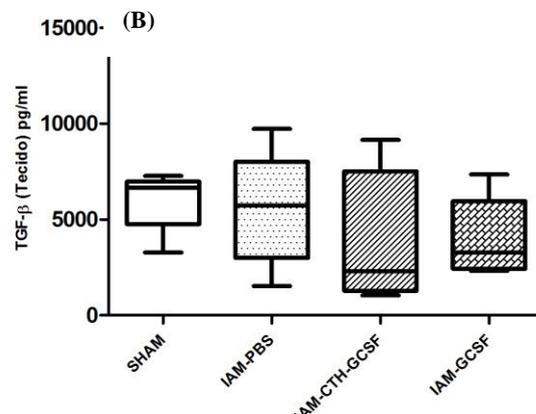
Variável	SHAM (n=10) média±SD	IAM-PBS (n=11) média±SD	IAM (n=7) média±SD	IAM-CTH (n=4) média±SD	IAM-CTH- GCSF (n=10) média±SD	IAM-GCSF (n=10) média±SD	p*
Tempo (segundos)	1021±120,6	1120±199,4	1055± 243,6	1037± 475,1	1023± 390,7	769,1± 329,9	0,0597
Distância (metros)	483,4± 106,9	572,9± 206,0	514,8± 217,6	538,7± 350,7	496,5± 216,5	289,0± 192,8	0,0313

(*) Teste de Kruskal-Wallis

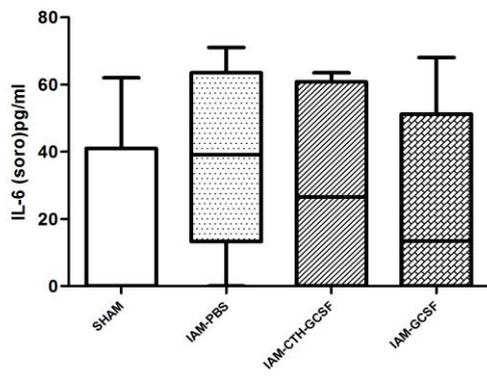
Figura 1



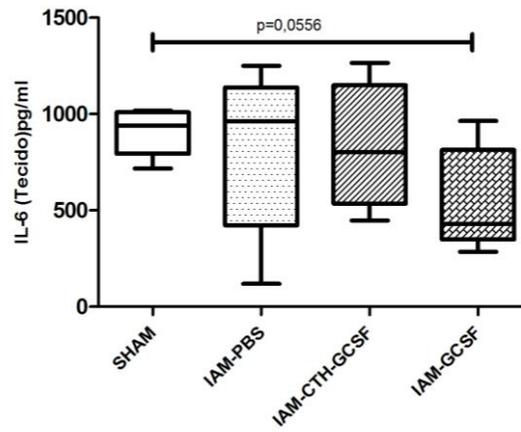
(C)



(D)



P= 0,6053 (Teste de Kruskal-Wallis)

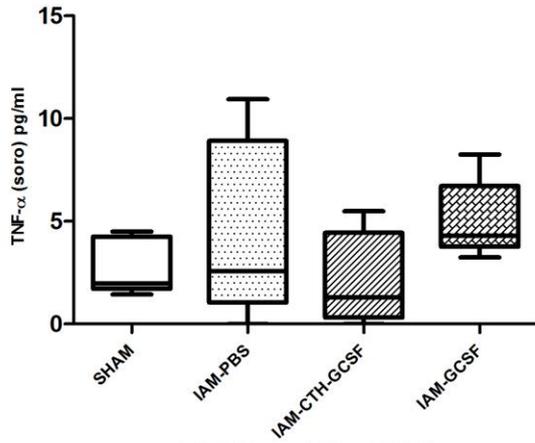


p=0,2691 (Teste de Kruskal-Wallis)

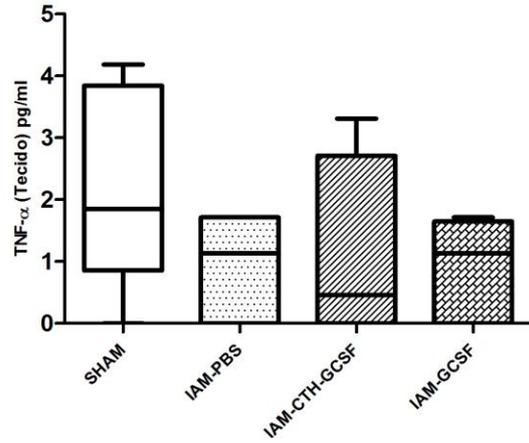
Figura 2

(A)

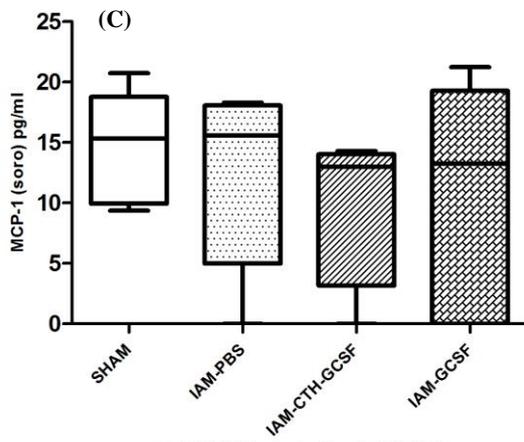
(B)



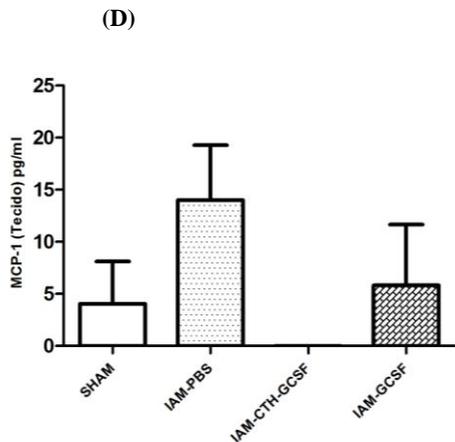
p=0,2221 (Teste de Kruskal-Wallis)



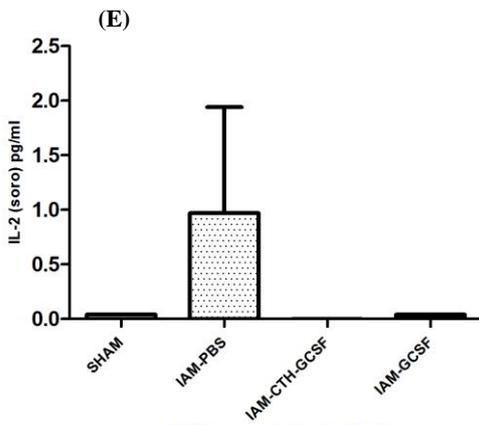
p=0,2766 (Teste de Kruskal-Wallis)



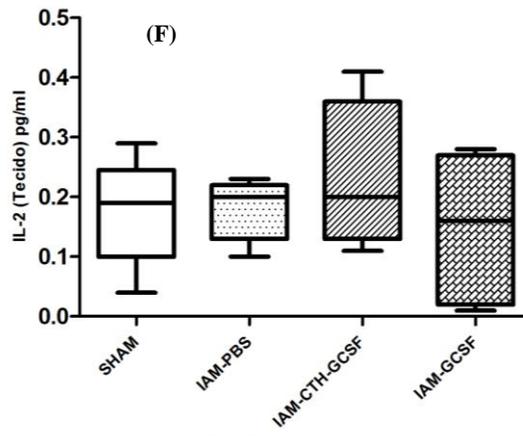
p= 0,7967 (Teste de Kruskal-Wallis)



p=0,5156 (Teste de Kruskal-Wallis)



p= 0,318 (Teste de Kruskal-Wallis)



p=0,8701 (Teste de Kruskal-Wallis)

Figura 3

(A)

(B)

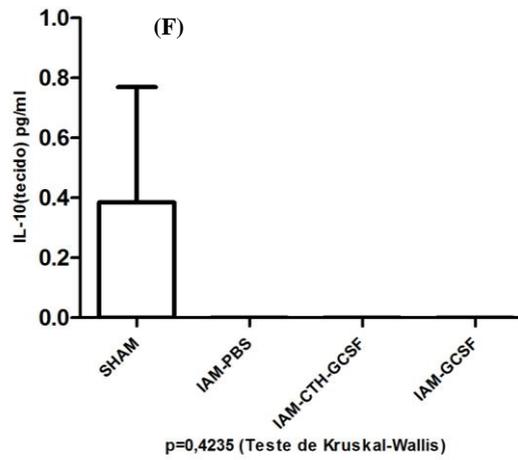
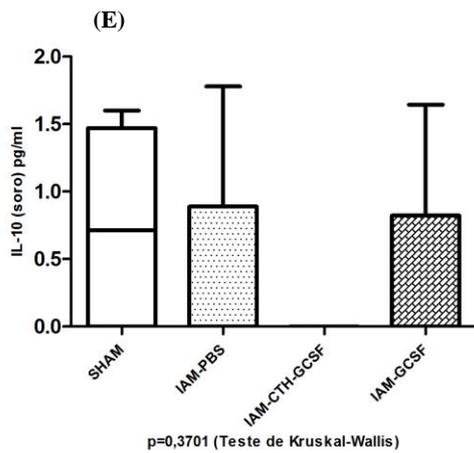
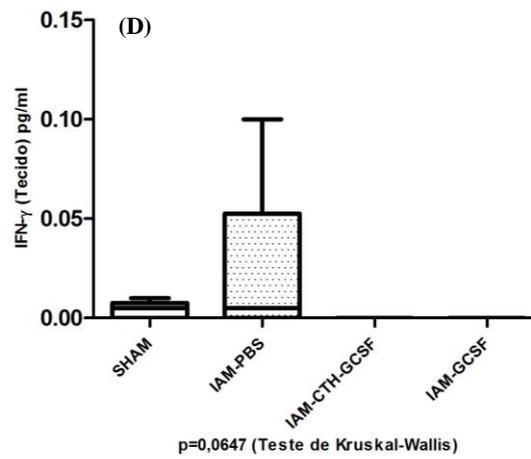
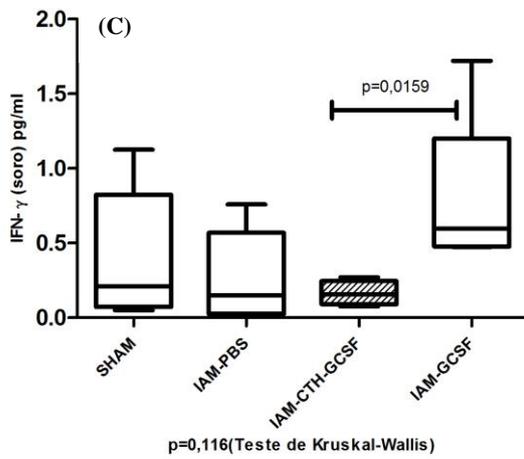
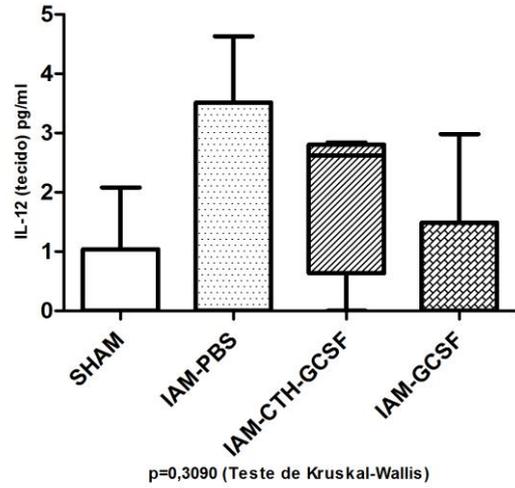
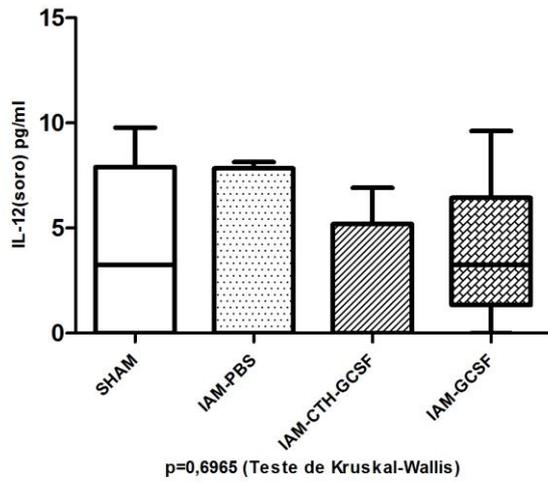


Figura 4

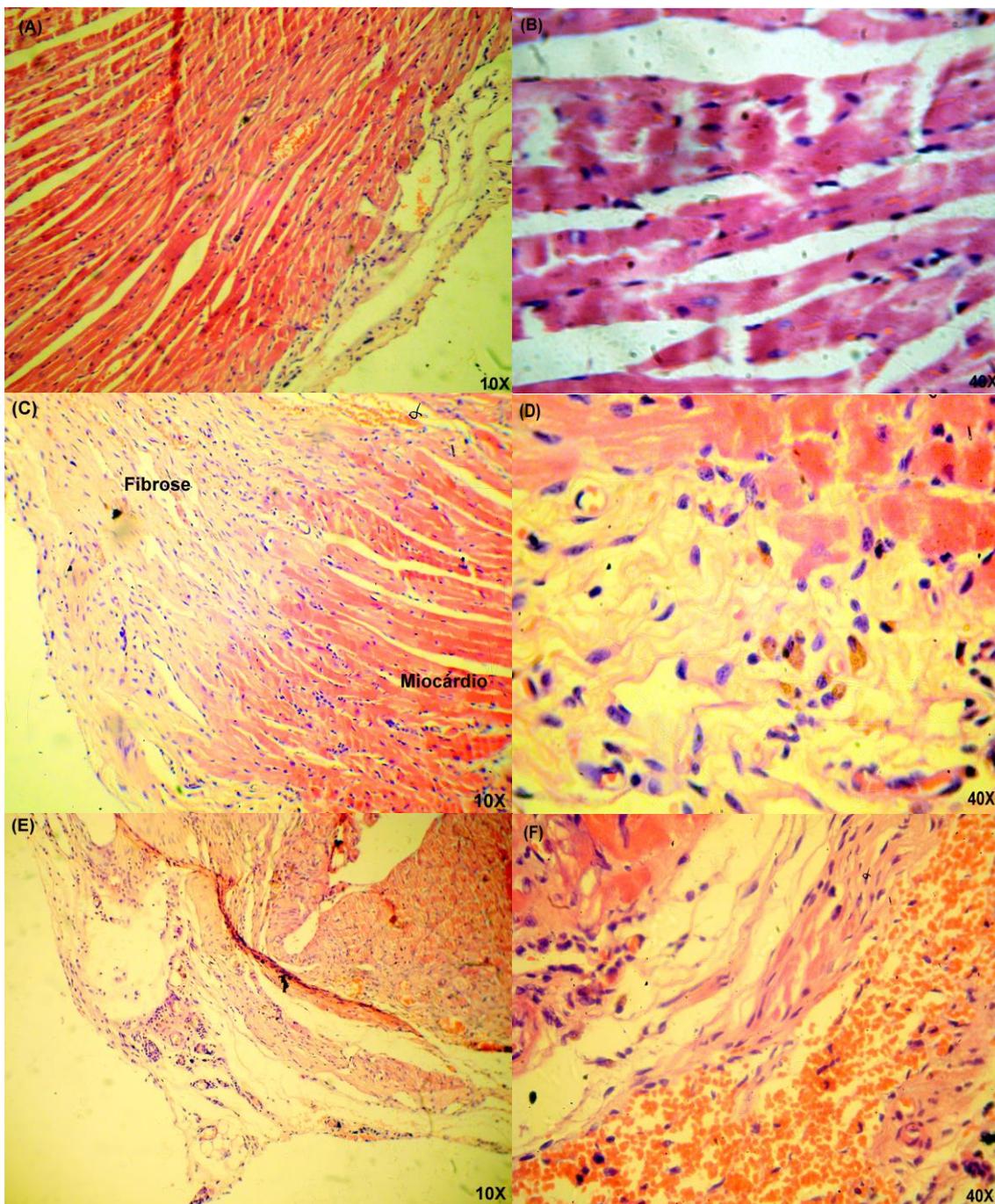


Figure 4

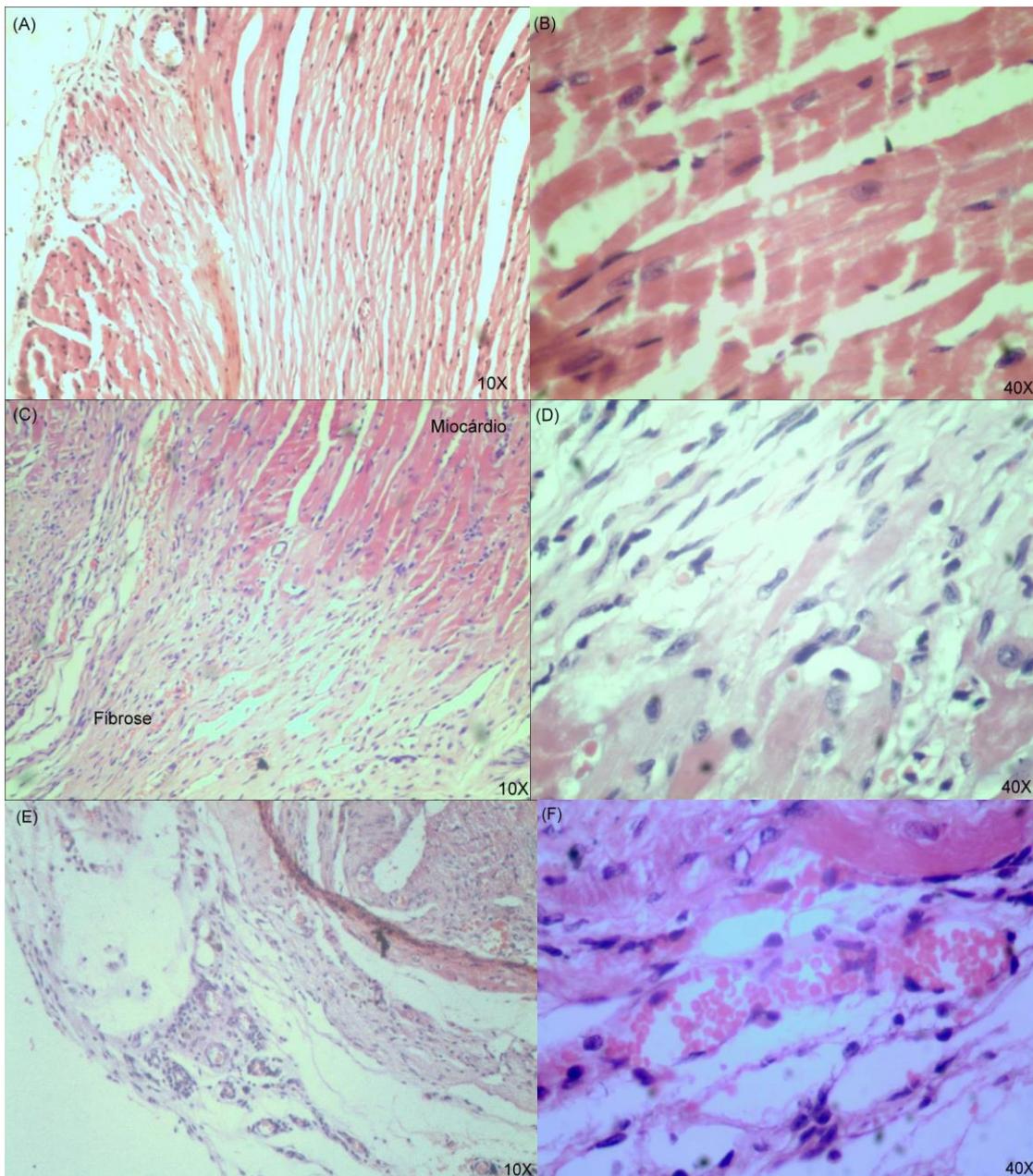


Figure 5

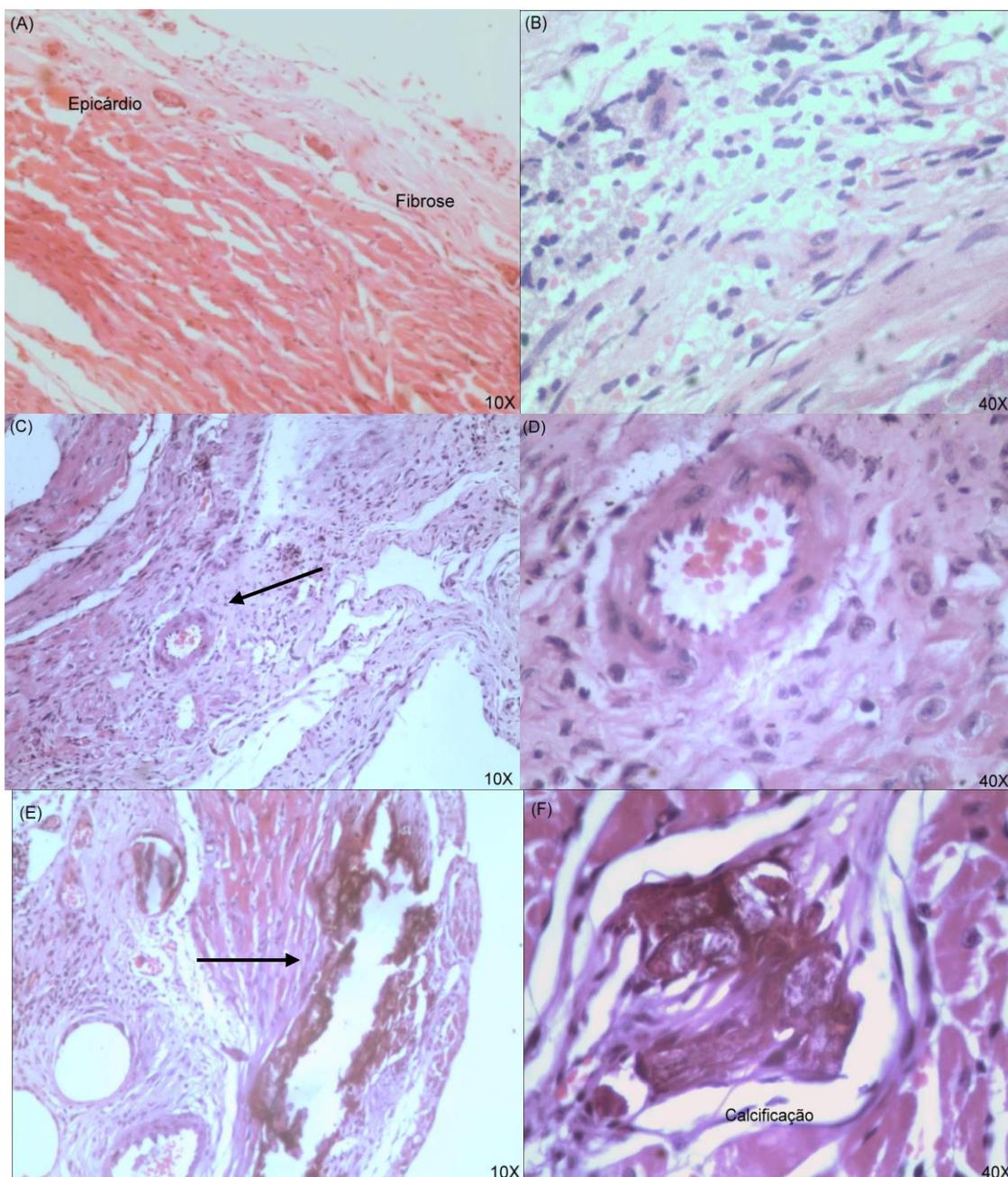


Figura 1: (A) Comparação das concentrações de TGF- β sérico e tecidual (B) entre os grupos de camundongos estudados. (C) Comparação das concentrações de IL-6 sérico e tecidual (D) entre os grupos de camundongos estudados.

Figura 2: (A) Comparação das concentrações de TNF sérico e tecidual (B) entre os grupos de camundongos estudados. (C) Comparação das concentrações de MCP-1 sérico e tecidual (D) entre os grupos de camundongos estudados. (E) Comparação das concentrações de IL-2 sérico e tecidual (F) entre os grupos de camundongos estudados.

Figura 3: (A) Comparação das concentrações de IL-12 sérico e tecidual (B) entre os grupos de camundongos estudados. (C) Comparação das concentrações de IFN- γ sérico e tecidual (D) entre os grupos de camundongos estudados. (E) Comparação das concentrações de IL-10 sérico e tecidual (F) entre os grupos de camundongos estudados.

Figura 4: Cortes Histológicos do Ventrículo Esquerdo dos grupos não tratados - Coloração Hematoxilina-Eosina: Grupo SHAM (A) aumento de 10X; (B) aumento de 40X; Grupo IAM (C) aumento de 10X (área da transição da fibrose); (D) aumento de 40X (área da transição da fibrose e deposição de colágeno); Grupo IAM-PBS (E) aumento de 10X (área infartada com necrose transmural e discreto infiltrado inflamatório); (F) aumento de 40X (fibrose extensa, área de necrose e infiltrado inflamatório discreto).

Figura 5: Cortes Histológicos do Ventrículo Esquerdo dos Grupos tratados - Coloração Hematoxilina-Eosina: Grupo IAM-CTH (A) aumento de 10x (área de infarto não transmural e fibrose); (B) aumento de 40X (desorganização da matriz extracelular, áreas de fibrose e hiper celularidade); Grupo IAM-CTH-GCSF (C) aumento de 10x (discreto infiltrado inflamatório, fibrose extensa e angiogênese - seta); (D) aumento de 40X (alguns miócitos com núcleos); Grupo IAM-GCSF (E) aumento de 10X (área de extensa calcificação com áreas de necrose - seta); (F) aumento de 40X (área de calcificação).