



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA**

**EFEITOS CENTRAIS E PERIFÉRICOS DA IMPLANTAÇÃO DE
CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTICAS ASSOCIADO AO USO DE FATOR
ESTIMULADOR DE COLÔNIA DE GRANULÓCITOS
NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA EXPERIMENTAL**

ELISA BROSINA DE LEON

MANAUS, 2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA**

ELISA BROSINA DE LEON

**EFEITOS CENTRAIS E PERIFÉRICOS DA IMPLANTAÇÃO DE
CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTIAS ASSOCIADO AO USO DE FATOR
ESTIMULADOR DE COLÔNIA DE GRANULÓCITOS
NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas como parte do requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia na área de concentração “Saúde”.

Orientadora: Prof^a. Dra. Adriana Malheiro

Coorientadora: Prof^a. Dra. Maria Cláudia Irigoyen

MANAUS, 2013

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

L579e Leon, Elisa Brosina de
Efeitos centrais e periféricos da implantação de células tronco hematopoéticas associado ao uso de fator estimulador de colônia de granulócitos na insuficiência cardíaca experimental / Elisa Brosina de Leon. 2013
111 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Adriana Malheiro
Coorientadora: Maria Cláudia Irigoyen
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Insuficiência cardíaca. 2. Terapia celular. 4. Colônia de granulócitos. 5. Tecidos periféricos. I. Malheiro, Adriana II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Dedico ao meu grande amor André, pelo amor, carinho e conforto, por somarmos nossas vidas formando uma família linda e abençoada, que me ensina todos os segundos o valor dos pequenos momentos.

Ao meu filhote Lucca, o maior fruto desse doutorado, que me mostra o valor da presença, a necessidade da entrega e o poder do olhar do amor.

Aos meus pais, Leon e Sandra, por mostrarem a intensidade do eterno amor, que vence obstáculos e se renova a cada dia, transparecendo na alegria de viver.

À minha irmã Luciana, pela cumplicidade em dividimos nossas fantasias, pelo que aprendemos e crescemos juntas e pelo carinho apesar da distância.

À minha vó Nina, por me ensinar a força da mulher que não se entrega diante das dificuldades e que continua vivendo do seu jeito, feliz.

AGRADECIMENTOS

À Professora **Adriana Malheiro**, minha sempre orientadora, pela demonstração do amor à pesquisa, pela sua inabalável busca pelo conhecimento, apesar de grandes dificuldades encontradas, por me mostrar a obstinação apesar das adversidades, pela acolhida e por acreditar na minha capacidade. Muito obrigada!

À Professora **Maria Cláudia Irigoyen**, por prover o suporte científico necessário à realização deste estudo.

Ao Professor **Pedro Dall'Ago**, meu também sempre orientador, abrindo-me os caminhos para fazer ciência e orientando-me para minha construção acadêmica.

À Professora **Luciana Botinelly Mendonça Fujimoto**, pelos cuidados dispensados durante a elaboração deste trabalho, pelas palavras de compreensão e carinho durante nossos encontros.

Ao Professor **José Fernando Marques Barcellos**, pelo apoio e por ter aceitado o desafio e acreditar neste trabalho.

Ao Professor **Oscar Tadeu Ferreira da Costa**, por abrir as portas de seu laboratório para a realização deste estudo.

Ao Professor **Olindo de Assis Martins**, pelas valorosas contribuições durante a construção dos resultados.

Às amigas **Nadja Pinto Garcia** e **Liziara Fraporti**, sem vocês não teria sido possível concluir esse estudo, obrigada por terem perseverado sempre comigo, juntas somos invencíveis. Essa conquista é nossa!

Aos colegas **Leandro Eziquiel** e **Diego Figueroa** pela disponibilidade em ajudar.

Agradeço à competência das queridas **Nubiane**, **Elzimar** e **Joelma** da secretaria do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFAM.

Às técnicas de laboratório **Rose**, **Maísa** e **Fátima** da UFAM; **Edenil** e **Glaucinete** da UEA.

Aos alunos de iniciação científica **Gleicy**, **Jaslana**, **Ana Carolina**, **Adélia**, **Danielle** e **Wellington**, que auxiliaram muito na elaboração deste trabalho.

Aos colegas e amigos de laboratório, **João Paulo**, **Andrea**, **Allyson**, **Walter**, **Nilberto**, **Rafael** e **Péricles**, pela ajuda de sempre.

Aos meus sogros, **Risonildo** e **Nália**, que são um pedaço da minha família, alicerce que nos fortalece como pessoas. Muito obrigada!

Aos amigos, **Márcia**, **Toshi**, **Kamila**, **Karine**, **Karen** e **Karla**. Obrigada Família Kubo pelo carinho com minha família e por me socorrer em tantos momentos de aflição.

Ao anjo que Deus colocou na minha vida, **Nágila**.

Ao **Programa de Pós Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas**, representado pelo Professor **Edmar Vaz de Andrade**, coordenador, por possibilitar a realização deste sonho e compreender meus anseios.

Agradeço a todos os **Mestres** que deixaram suas marcas em minha mente ansiosa pelo conhecimento e por transmitirem seus pensamentos com transparência.

À **Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – FHEMOAM**, pela acolhida, com agradecimento especial à **Wilmara**.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM**, ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** e **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo apoio financeiro.

“Se eu fosse esperar que outras pessoas fizessem minhas ferramentas e tudo mais para mim, eu nunca teria feito nada.”

(Isaac Newton)

RESUMO

Introdução: Alterações imunológicas e morfológicas na musculatura esquelética são associadas com piora da capacidade funcional após infarto do miocárdio, somado às modificações centrais. Um melhor entendimento dos mecanismos centrais e periféricos envolvidos na insuficiência cardíaca é necessário para desenvolvimento de estratégias terapêuticas específicas, como a utilização de células tronco (CT) ou fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF) para diminuir ou prevenir atrofia muscular presente nesta síndrome, além das mudanças imunológicas deletérias.

Objetivo: O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da administração de células tronco ou/e fator estimulador de colônia de granulócitos nas modificações cardíacas e mudanças teciduais periféricas após a indução de infarto do miocárdio experimental.

Metodologia: Em camundongos Balb/C foi induzida a ligadura da artéria coronária esquerda. Os animais do grupo Controle foram submetidos ao procedimento cirúrgico sem a ligadura da artéria. Uma semana após o procedimento, os animais foram submetidos a tratamento com PBS (IM+PBS), G-CSF (IM+G-CSF) ou G-CSF associado à CT hematopoética (IM+G-CSF+CT). Os animais foram observados por um período de quatro semanas, sendo então realizada análise ecocardiográfica, teste de esforço e coleta de tecidos (coração, pulmão, diafragma, fígado e músculo periférico) para análise de citocinas e mudanças estruturais.

Resultados: Os resultados demonstram que todos os tratamentos propostos foram capazes de diminuir a área de infarto, de maneira mais evidente após a administração de G-CSF. Por outro lado, o G-CSF induziu a pior resposta no teste de esforço (menor distância total percorrida e velocidade final alcançada). A análise das citocinas teciduais esqueléticas demonstrou aumento da frequência de altos produtores de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6, IL-12, IFN- γ , IL-1- β e IL-4 em camundongos infartados, resultando em desequilíbrio no balanço anti/pró-inflamatório da resposta imune. Os tratamentos propostos apresentaram comprometimento negativo durante o uso de G-CSF isolado e resultados satisfatórios quando associado ao uso das CTs.

Conclusão: Concluiu-se que a utilização de G-CSF sozinho parece ser responsável por ampliar o processo inflamatório em animais infartados conduzindo a uma diminuição da capacidade funcional do músculo esquelético, o qual reflete em desempenho inferior no teste de esforço. Em contraste, a utilização de G-CSF, em associação com CT hematopoiéticas parece ter um efeito benéfico no processo inflamatório modulando a resposta e refletindo em menor efeito deletério na síndrome da insuficiência cardíaca.

Palavras-chaves: insuficiência cardíaca, terapia celular, fator estimulador de colônia de granulócitos, tecidos periféricos.

ABSTRACT

Background: Immunologic and skeletal muscle morphology changes are associated with functional capacity impairment after myocardial infarction (MI), added central modifications. A better understanding of the hemodynamic and peripheral mechanism involved in heart failure is necessary to develop specific therapeutic strategies, as stem cells (SC) or granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) to slow or prevent muscular atrophy present in this syndrome beyond the deleterious immunologic changes.

Aims: Therefore, the purpose of this study was to evaluate the effects of stem cells (SC) or/and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) administration into heart and peripheral tissues after experimental myocardial infarction induction.

Methods: In Balb/C was induced ligation of the left coronary artery. Animals in the control group underwent the surgical procedure without ligation of the artery. One week after the procedure, animals were treated with PBS (IM+PBS), G-CSF (IM+G-CSF) or G-CSF associated with hematopoietic CT (IM+G-CSF+CT). The animals were observed for a period of four weeks and underwent echocardiography, stress testing and collection of tissues (heart, lung, diaphragm, liver and peripheral muscle) for analysis of cytokines and structural changes.

Results: The results demonstrate that all the treatments were able to reduce infarct, more evident following administration of G-CSF. Moreover, G-CSF induced response in the worst stress test (smaller total distance and final velocity achieved). Analysis of cytokines skeletal tissue demonstrated increased frequency of high producers of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-6, IL-12, IFN- γ , IL-1- β and IL-4 in mice infarcted, resulting in imbalance in balance anti/pro-inflammatory immune response. The treatments had impaired negative when using G-CSF alone and satisfactory results when combined with the use of SCs.

Conclusion: We conclude that using G-CSF alone appears to be responsible for amplifying the inflammatory process in infarcted animals leading to reduced functional capacity of skeletal muscle, which reflects in lower performance in exercise stress testing. In contrast, the use of G-CSF in association with hematopoietic CT appears to have a beneficial effect in modulating the inflammatory response and result in lower deleterious effect on the heart failure syndrome.

Keywords: heart failure, cell therapy, colony-stimulating factor granulocyte, peripheral tissues.

SUMÁRIO

1	Introdução	1
1.1	Epidemiologia da Insuficiência Cardíaca	2
1.2	Alterações centrais relacionadas à Insuficiência Cardíaca	2
1.3	Alterações periféricas relacionadas à Insuficiência Cardíaca	2
1.4	Fisiopatologia do modelo de Insuficiência Cardíaca	2
1.5	Células Tronco da Medula Óssea	2
1.6	Células Tronco e Doenças Cardíacas	2
1.7	Implante de Células Tronco e os Fatores de Crescimento	2
2	Objetivos	4
2.1	Geral	5
2.2	Específicos	5
3	Metodologia	4
3.1	Modelo de Estudo	5
3.2	Informações Éticas	5
3.3	População de Estudo	5
3.4	Cirurgia de Indução do Infarto do Miocárdio	5
3.5	Pesagem Corporal	5
3.6	Preparo e Isolamento de Células Tronco Hematopoéticas	5
3.6.1	Administração do Fator de Crescimento (G-CSF) para camundongos doadores e coleta de Células Tronco	6
3.6.2	Isolamento de Células Mononucleares	6
3.6.3	Citometria de Fluxo	6
3.6.4	Implante de Células Tronco	6
3.6.5	Administração do Fator de Crescimento (G-CSF)	6
3.6.6	Avaliação da Capacidade Funcional	6
3.6.7	Avaliação Ecocardiográfica	6
3.6.8	Coleta de Tecidos	6
3.6.9	Determinação da Hipertrofia Cardíaca	6
3.6.10	Determinação da Congestão Pulmonar e Hepática	6
3.6.11	Dosagem de Citocinas	6

3.6.12 Análises anátomo-patológicas	6
3.6.13 Análise estatística	6
3 Metodologia	4
3.1 Modelo de Estudo.....	5
4 Referências Bibliográficas	4
5 Artigo Infarto do miocárdio: estudo do modelo da ligadura da artéria coronária em camundongos Balb/C	4
6 Artigo	4
7 Anexos	4
7.1 Carta de Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa em Animais	5

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Mudanças estruturais celulares reversíveis e irreversíveis resultantes do infarto do miocárdio.....	4
Figura 2 Reparo do tecido cardíaco após o infarto do miocárdio.....	5
Figura 3 Principais alterações centrais e periféricas consequentes da Síndrome da Insuficiência Cardíaca.....	6
Figura 4 Células tronco adultas multipotentes e suas diferenciações.....	11
Figura 5 Nicho osteoblástico e nicho vascular em quiescência, mobilização e homing.....	13
Figura 6 Tipos celulares propostos para a terapia celular em cardiologia visando o reparo cardíaco pós-infarto..	15
Figura 7 Representação esquemática da hematopoese.....	17
Figura 8 Figura esquemática dos efeitos do G-CSF no coração infartado.....	18
Figura 9 Organograma para apresentação dos grupos experimentais... ..	24
Figura 10 Organograma para apresentação do modelo experimental.. ..	26
Figura 11 Secção miocárdica ventricular esquerda de um animal infartado demonstrativa da utilização da técnica de Hematoxilina e Eosina e Tricromico de Gomory.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Caracterização da amostra conforme descrição dos grupos experimentais.

Tabela 2 Caracterização dos eventos avaliados na análise anátomo-patológica.

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ATP	Trifosfato de adenosina
BRDU	Bromodeoxyuridine
CT	Célula tronco
CTH	Célula tronco hematopoética
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPO	Eritropoetina
G-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos
GLUT-4	Transportador de glicose tipo 4
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
H ₂ O	Molécula de água
IC	Insuficiência cardíaca
IL-10	Interleucina-10
IL-6	Interleucina-6
IM	Infarto do miocárdio
ISHAGE	Sociedade Internacional de Hemoterapia e Engenharia Tecidual
K ⁺	Íon potássio
NO	Óxido nítrico
O ₂	Molécula de oxigênio
PBS	Tampão fosfato-salina
PBS	Phosphate buffered saline
pH	Concentração de íons de hidrogênio
SCF	Fator de células tronco
TNF- α	Fator de necrose tumoral - α
VD	Ventrículo direito
VE	Ventrículo esquerdo

VEGF

Fator de crescimento do endotelial vascular

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

DOCTORADO EM BIOTECNOLOGIA

ELISA BROSINA DE LEON

**EFEITOS CENTRAIS E PERIFÉRICOS DA IMPLANTAÇÃO DE
CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTICAS ASSOCIADO AO USO DE FATOR
ESTIMULADOR DE COLÔNIA DE GRANULÓCITOS
NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas como parte do requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia na área de concentração “Saúde”.

Orientadora: Prof^a. Dra. Adriana Malheiro

Coorientadora: Prof^a. Dra. Maria Cláudia Irigoyen

MANAUS, 2013

Dedico ao meu grande amor André, pelo amor, carinho e conforto, por somarmos nossas vidas formando uma família linda e abençoada, que me ensina todos os segundos o valor dos pequenos momentos.

Ao meu filhote Lucca, o maior fruto desse doutorado, que me mostra o valor da presença, a necessidade da entrega e o poder do olhar do amor.

Aos meus pais, Leon e Sandra, por mostrarem a intensidade do eterno amor, que vence obstáculos e se renova a cada dia, transparecendo na alegria de viver.

À minha irmã Luciana, pela cumplicidade em dividimos nossas fantasias, pelo que aprendemos e crescemos juntas e pelo carinho apesar da distância.

À minha vó Nina, por me ensinar a força da mulher que não se entrega diante das dificuldades e que continua vivendo do seu jeito, feliz.

AGRADECIMENTOS

À Professora **Adriana Malheiro**, minha sempre orientadora, pela demonstração do amor à pesquisa, pela sua inabalável busca pelo conhecimento, apesar de grandes dificuldades encontradas, por me mostrar a obstinação apesar das adversidades, pela acolhida e por acreditar na minha capacidade. Muito obrigada!

À Professora **Maria Cláudia Irigoyen**, por prover o suporte científico necessário à realização deste estudo.

Ao Professor **Pedro Dall'Ago**, meu também sempre orientador, abrindo-me os caminhos para fazer ciência e orientando-me para minha construção acadêmica.

À Professora **Luciana Botinelly Mendonça Fujimoto**, pelos cuidados dispensados durante a elaboração deste trabalho, pelas palavras de compreensão e carinho durante nossos encontros.

Ao Professor **José Fernando Marques Barcellos**, pelo apoio e por ter aceitado o desafio e acreditar neste trabalho.

Ao Professor **Oscar Tadeu Ferreira da Costa**, por abrir as portas de seu laboratório para a realização deste estudo.

Ao Professor **Olindo de Assis Martins**, pelas valorosas contribuições durante a construção dos resultados.

Às amigas **Nadja Pinto Garcia** e **Liziara Fraporti**, sem vocês não teria sido possível concluir esse estudo, obrigada por terem perseverado sempre comigo, juntas somos invencíveis. Essa conquista é nossa!

Aos colegas **Leandro Eziquiel** e **Diego Figueroa** pela disponibilidade em ajudar.

Agradeço à competência das queridas **Nubiane**, **Elzimar** e **Joelma** da secretaria do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFAM.

Às técnicas de laboratório **Rose**, **Maísa** e **Fátima** da UFAM; **Edenil** e **Glaucinete** da UEA.

Aos alunos de iniciação científica **Gleicy**, **Jaslana**, **Ana Carolina**, **Adélia**, **Danielle** e **Wellington**, que auxiliaram muito na elaboração deste trabalho.

Aos colegas e amigos de laboratório, **João Paulo**, **Andrea**, **Allyson**, **Walter**, **Nilberto**, **Rafael** e **Péricles**, pela ajuda de sempre.

Aos meus sogros, **Risonildo** e **Nália**, que são um pedaço da minha família, alicerce que nos fortalece como pessoas. Muito obrigada!

Aos amigos, **Márcia**, **Toshi**, **Kamila**, **Karine**, **Karen** e **Karla**. Obrigada Família Kubo pelo carinho com minha família e por me socorrer em tantos momentos de aflição.

Ao anjo que Deus colocou na minha vida, **Nágila**.

Ao **Programa de Pós Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas**, representado pelo Professor **Edmar Vaz de Andrade**, coordenador, por possibilitar a realização deste sonho e compreender meus anseios.

Agradeço a todos os **Mestres** que deixaram suas marcas em minha mente ansiosa pelo conhecimento e por transmitirem seus pensamentos com transparência.

À **Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – FHEMOAM**, pela acolhida, com agradecimento especial à **Wilmara**.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM**, ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** e **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo apoio financeiro.

“Se eu fosse esperar que outras pessoas fizessem minhas ferramentas e tudo mais para mim, eu nunca teria feito nada.”

(Isaac Newton)

RESUMO

Introdução: Alterações imunológicas e morfológicas na musculatura esquelética são associadas com piora da capacidade funcional após infarto do miocárdio, somado às modificações centrais. Um melhor entendimento dos mecanismos centrais e periféricos envolvidos na insuficiência cardíaca é necessário para desenvolvimento de estratégias terapêuticas específicas, como a utilização de células tronco (CT) ou fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF) para diminuir ou prevenir atrofia muscular presente nesta síndrome, além das mudanças imunológicas deletérias.

Objetivo: O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da administração de células tronco ou/e fator estimulador de colônia de granulócitos nas modificações cardíacas e mudanças teciduais periféricas após a indução de infarto do miocárdio experimental.

Metodologia: Em camundongos Balb/C foi induzida a ligadura da artéria coronária esquerda. Os animais do grupo Controle foram submetidos ao procedimento cirúrgico sem a ligadura da artéria. Uma semana após o procedimento, os animais foram submetidos a tratamento com PBS (IM+PBS), G-CSF (IM+G-CSF) ou G-CSF associado à CT hematopoética (IM+G-CSF+CT). Os animais foram observados por um período de quatro semanas, sendo então realizada análise ecocardiográfica, teste de esforço e coleta de tecidos (coração, pulmão, diafragma, fígado e músculo periférico) para análise de citocinas e mudanças estruturais.

Resultados: Os resultados demonstram que todos os tratamentos propostos foram capazes de diminuir a área de infarto, de maneira mais evidente após a administração de G-CSF. Por outro lado, o G-CSF induziu a pior resposta no teste de esforço (menor distância total percorrida e velocidade final alcançada). A análise das citocinas teciduais esqueléticas demonstrou aumento da frequência de altos produtores de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6, IL-12, IFN- γ , IL-1- β e IL-4 em camundongos infartados, resultando em desequilíbrio no balanço anti/pró-inflamatório da resposta imune. Os tratamentos propostos apresentaram comprometimento negativo durante o uso de G-CSF isolado e resultados satisfatórios quando associado ao uso das CTs.

Conclusão: Concluiu-se que a utilização de G-CSF sozinho parece ser responsável por ampliar o processo inflamatório em animais infartados conduzindo a uma diminuição da capacidade funcional do músculo esquelético, o qual reflete em desempenho inferior no teste de esforço. Em contraste, a utilização de G-CSF, em associação com CT hematopoiéticas parece ter um efeito benéfico no processo inflamatório modulando a resposta e refletindo em menor efeito deletério na síndrome da insuficiência cardíaca.

Palavras-chaves: insuficiência cardíaca, terapia celular, fator estimulador de colônia de granulócitos, tecidos periféricos.

ABSTRACT

Background: Immunologic and skeletal muscle morphology changes are associated with functional capacity impairment after myocardial infarction (MI), added central modifications. A better understanding of the hemodynamic and peripheral mechanism involved in heart failure is necessary to develop specific therapeutic strategies, as stem cells (SC) or granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) to slow or prevent muscular atrophy present in this syndrome beyond the deleterious immunologic changes.

Aims: Therefore, the purpose of this study was to evaluate the effects of stem cells (SC) or/and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) administration into heart and peripheral tissues after experimental myocardial infarction induction.

Methods: In Balb/C was induced ligation of the left coronary artery. Animals in the control group underwent the surgical procedure without ligation of the artery. One week after the procedure, animals were treated with PBS (IM+PBS), G-CSF (IM+G-CSF) or G-CSF associated with hematopoietic CT (IM+G-CSF+CT). The animals were observed for a period of four weeks and underwent echocardiography, stress testing and collection of tissues (heart, lung, diaphragm, liver and peripheral muscle) for analysis of cytokines and structural changes.

Results: The results demonstrate that all the treatments were able to reduce infarct, more evident following administration of G-CSF. Moreover, G-CSF induced response in the worst stress test (smaller total distance and final velocity achieved). Analysis of cytokines skeletal tissue demonstrated increased frequency of high producers of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-6, IL-12, IFN- γ , IL-1- β and IL-4 in mice infarcted, resulting in imbalance in balance anti/pro-inflammatory immune response. The treatments had impaired negative when using G-CSF alone and satisfactory results when combined with the use of SCs.

Conclusion: We conclude that using G-CSF alone appears to be responsible for amplifying the inflammatory process in infarcted animals leading to reduced functional capacity of skeletal muscle, which reflects in lower performance in exercise stress testing. In contrast, the use of G-CSF in association with hematopoietic CT appears to have a beneficial effect in modulating the inflammatory response and result in lower deleterious effect on the heart failure syndrome.

Keywords: heart failure, cell therapy, colony-stimulating factor granulocyte, peripheral tissues.

SUMÁRIO

1	Introdução	1
1.1	Epidemiologia da Insuficiência Cardíaca	2
1.2	Alterações centrais relacionadas à Insuficiência Cardíaca	2
1.3	Alterações periféricas relacionadas à Insuficiência Cardíaca	2
1.4	Fisiopatologia do modelo de Insuficiência Cardíaca	2
1.5	Células Tronco da Medula Óssea	2
1.6	Células Tronco e Doenças Cardíacas	2
1.7	Implante de Células Tronco e os Fatores de Crescimento	2
2	Objetivos	4
2.1	Geral	5
2.2	Específicos	5
3	Metodologia	4
3.1	Modelo de Estudo	5
3.2	Informações Éticas	5
3.3	População de Estudo	5
3.4	Cirurgia de Indução do Infarto do Miocárdio	5
3.5	Pesagem Corporal	5
3.6	Preparo e Isolamento de Células Tronco Hematopoéticas	5
3.6.1	Administração do Fator de Crescimento (G-CSF) para camundongos doadores e coleta de Células Tronco	6
3.6.2	Isolamento de Células Mononucleares	6
3.6.3	Citometria de Fluxo	6
3.6.4	Implante de Células Tronco	6
3.6.5	Administração do Fator de Crescimento (G-CSF)	6
3.6.6	Avaliação da Capacidade Funcional	6
3.6.7	Avaliação Ecocardiográfica	6
3.6.8	Coleta de Tecidos	6
3.6.9	Determinação da Hipertrofia Cardíaca	6
3.6.10	Determinação da Congestão Pulmonar e Hepática	6
3.6.11	Dosagem de Citocinas	6

3.6.12 Análises anátomo-patológicas	6
3.6.13 Análise estatística	6
3 Metodologia	4
3.1 Modelo de Estudo.....	5
4 Referências Bibliográficas	4
5 Artigo Infarto do miocárdio: estudo do modelo da ligadura da artéria coronária em camundongos Balb/C	4
6 Artigo	4
7 Anexos	4
7.1 Carta de Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa em Animais	5

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Mudanças estruturais celulares reversíveis e irreversíveis resultantes do infarto do miocárdio.....	4
Figura 2 Reparo do tecido cardíaco após o infarto do miocárdio.....	5
Figura 3 Principais alterações centrais e periféricas consequentes da Síndrome da Insuficiência Cardíaca.....	6
Figura 4 Células tronco adultas multipotentes e suas diferenciações.....	11
Figura 5 Nicho osteoblástico e nicho vascular em quiescência, mobilização e homing.....	13
Figura 6 Tipos celulares propostos para a terapia celular em cardiologia visando o reparo cardíaco pós-infarto..	15
Figura 7 Representação esquemática da hematopoese.....	17
Figura 8 Figura esquemática dos efeitos do G-CSF no coração infartado.....	18
Figura 9 Organograma para apresentação dos grupos experimentais... ..	24
Figura 10 Organograma para apresentação do modelo experimental.. ..	26
Figura 11 Secção miocárdica ventricular esquerda de um animal infartado demonstrativa da utilização da técnica de Hematoxilina e Eosina e Tricromico de Gomory.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Caracterização da amostra conforme descrição dos grupos experimentais.

Tabela 2 Caracterização dos eventos avaliados na análise anátomo-patológica.

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ATP	Trifosfato de adenosina
BRDU	Bromodeoxyuridine
CT	Célula tronco
CTH	Célula tronco hematopoética
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPO	Eritropoetina
G-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos
GLUT-4	Transportador de glicose tipo 4
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
H ₂ O	Molécula de água
IC	Insuficiência cardíaca
IL-10	Interleucina-10
IL-6	Interleucina-6
IM	Infarto do miocárdio
ISHAGE	Sociedade Internacional de Hemoterapia e Engenharia Tecidual
K ⁺	Íon potássio
NO	Óxido nítrico
O ₂	Molécula de oxigênio
PBS	Tampão fosfato-salina
PBS	Phosphate buffered saline
pH	Concentração de íons de hidrogênio
SCF	Fator de células tronco
TNF- α	Fator de necrose tumoral - α
VD	Ventrículo direito
VE	Ventrículo esquerdo

VEGF

Fator de crescimento do endotelial vascular

1. Introdução

1.1 Epidemiologia da Insuficiência Cardíaca

As doenças crônicas não transmissíveis, incluindo as doenças cardiovasculares, doenças crônicas respiratórias, diabetes, câncer e doenças renais, entre outras, são consideradas as principais causas de óbitos no mundo (SCHMIDT et al., 2011). Elas têm sido responsáveis por elevado número de mortes prematuras, perda de qualidade de vida com alto grau de limitação nas atividades de trabalho e de lazer, além de resultar em impacto econômico para as famílias, comunidades e a sociedade em geral, agravando as iniquidades e aumentando a pobreza (MALTA; NETO; JUNIOR, 2011).

Em 2005, foi gerado um relatório pela Organização Mundial de Saúde, o qual demonstra uma ação global em busca da prevenção de doenças crônicas (WHO, 2005). O relatório aborda que aproximadamente 17 milhões de pessoas morrem prematuramente, a cada ano vítimas da epidemia global de doenças crônicas. Em 2009, aproximadamente 72% das mortes no Brasil foram atribuídas a doenças crônicas não transmissíveis. Sendo que as principais causas foram: doenças cardiovasculares, câncer, doença respiratória e diabetes (DUNCAN et al., 2010; BRASIL, 2011; SCHMIDT et al., 2011).

Dentre as doenças cardiovasculares, destaca-se a insuficiência cardíaca (IC), que além de ser uma importante epidemia clínica, também representa um importante problema social e econômico. Esta síndrome é a primeira causa de hospitalizações em idosos, elevando os custos com cuidados em saúde nos Estados Unidos e na Europa. Aproximadamente 2% do total dos valores destinados para a saúde são gastos no tratamento da IC. Devido a sua frequência e gravidade, as hospitalizações representam 60-74% do total dos custos destinados a mesma (ALLA; ZANNAD; FILIPPATOS, 2007; FLAHERTY et al., 2009).

Além disso, o fator sócio-econômico parece ter importante impacto no prognóstico dessa síndrome. Pacientes que necessitaram dos cuidados oferecidos pelo sistema público de saúde fazem parte de uma estatística que está associada a uma maior mortalidade e a resultados menos favorecidos na recuperação de cirurgias de revascularização miocárdica (DE CAMPOS LOPES et al., 2006; ROGER et al., 2011).

1.2 Alterações centrais relacionadas à Insuficiência Cardíaca

A IC é uma síndrome complexa que tem emergido como uma das maiores questões de saúde pública e a maior causa de morbidade e mortalidade em adultos velhos nos países ocidentais (NIEMINEN; HARJOLA, 2005; OLIVA et al., 2012). Esta síndrome é resultado de alterações estruturais ou funcionais cardíacas que prejudicam a habilidade do ventrículo esquerdo (VE) de ejetar sangue (HUNT et al., 2005; AGVALL; ALEHAGEN; DAHLSTROM, 2012), gerando aumento da pressão capilar pulmonar e 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 neurohormonal e aumento das pressões ventriculares o que representa a piora da função cardíaca (GHEORGHIADÉ et al., 2005; ABBATE et al., 2006; FRANGOIANNIS, 2008).

O coração de pacientes com IC tende a ser dilatado ao máximo, não podendo recorrer aos ganhos adicionais alcançados por uma adaptação dos miócitos para aumento do volume através do princípio de Starling (DUSCHA et al., 2008). Associado à dilatação, a hipertrofia do VE acarreta em aumento da necessidade sanguínea para o miocárdio mesmo em uma

situação de repouso (LUND et al., 2003). Além disso, a lesão do VE leva à disfunção sistólica que compromete a contratilidade ventricular, este fato, associado a uma incompetência da resposta cronotrópica, resulta em incapacidade do coração de aumentar a fração de ejeção durante o exercício (FANG; MARWICK, 2003; KITZMAN, D W; GROBAN, 2011). Estes corações, portanto, apresentam limitações cronotrópicas e inotrópicas.

As manifestações clínicas clássicas são a dispneia e a fadiga, as quais acarretam limitação e/ou intolerância ao exercício (HUNT et al., 2005; KITZMAN, D W; GROBAN, 2011), sendo esse o primeiro sintoma relacionado com a disfunção sistólica da IC (ADAMOPOULOS et al., 2002; HAYKOWSKY et al., 2011) que resulta em incapacidade funcional e afeta a qualidade de vida dos indivíduos (HUNT et al., 2005; HAYKOWSKY et al., 2011). A intolerância ao exercício constitui parte da definição desta síndrome e está intimamente relacionada com sua fisiopatologia (KITZMAN, D. W.; GROBAN, 2008).

A capacidade máxima ao exercício apresenta-se reduzida em torno de 50% ou mais, dependendo do grau de comprometimento da função ventricular e isso ocorre devido à resposta hemodinâmica anormal ao exercício (DALL'AGO; STEIN; RIBEIRO, 2005; KITZMAN, D W; GROBAN, 2011). Esta alteração possui relação direta com a disfunção ventricular esquerda e com o próprio remodelamento cardíaco após o infarto do miocárdio (IM) (VENTURA-CLAPIER; DE SOUSA; VEKSLER, 2002; PHAN et al., 2012).

A fisiopatologia do infarto inicia após a diminuição de oxigênio dentro da célula, que leva à perda da capacidade de fosforilação oxidativa, por diminuição de oxigênio, e diminuição da energia proveniente da geração de ATP (trifosfato de adenosina); com isso ocorre falência da bomba de sódio, diminuição do potássio e aumento do influxo de sódio e água, acarretando no intumescimento celular (FRANGOGIANNIS, 2008). Os eventos celulares subsequentes são apresentados resumidos na figura 1.

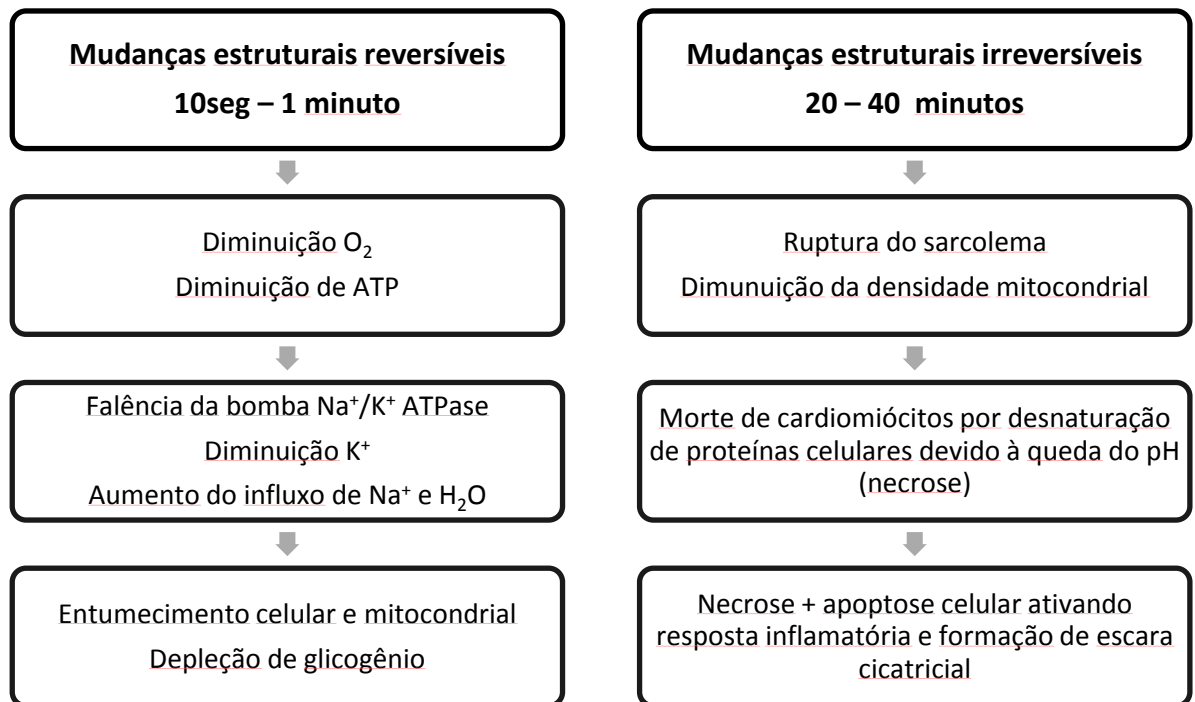


Figura 1 – Mudanças estruturais celulares reversíveis e irreversíveis resultantes do infarto do miocárdio. (Modelo elaborado baseado em artigo apresentado por FRANGOIANNIS, 2008).

A morte celular inicia uma reação inflamatória, ativando mecanismos de reparação que finalmente resultam na formação de escara cicatricial. A cicatrização pós-infarto pode ser dividida em 3 fases: fase inflamatória, fase proliferativa e fase de maturação (Figura 2) (FRANGOIANNIS, 2008).

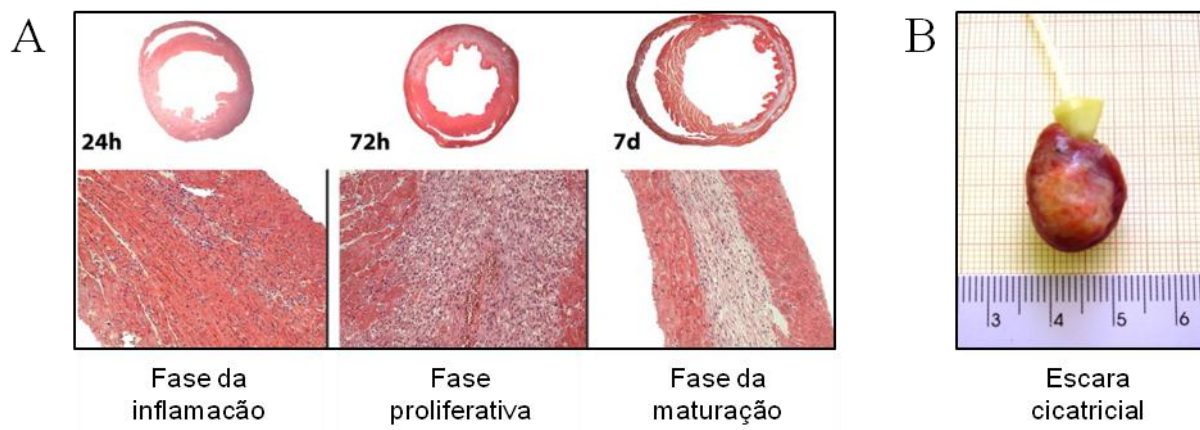


Figura 2 – Reparo do tecido cardíaco após o infarto do miocárdio. (A): etapa de cicatrização tecidual dividida em 3 etapas: fase da inflamação, fase proliferativa e fase da maturação experimental do infarto do miocárdio via ligadura da artéria coronária esquerda em ratos (Modificado de FRANGOGIANNIS, 2008). (B): aparência macroscópica do ventrículo esquerdo após 30 dias de indução em camundongo (LEON, 2008).

Sintetizando, pode-se afirmar que o remodelamento cardíaco após o infarto do miocárdio é caracterizado por apoptose dos miócitos, deposição de tecido fibrótico como substituição dos cardiomiócitos na parede ventricular, expansão progressiva da área inicial infartada e dilatação do ventrículo esquerdo (ITESCU; SCHUSTER; KOCHER, 2003; PHAN et al., 2012). Porém, devido à insignificante capacidade de regeneração do coração humano, a lesão miocárdica induz a grandes mudanças nos mecanismos de reparo que resultam na formação da escura cicatricial (FRANGOGIANNIS, N. G., 2008).

Além disso, ocorre um processo de angiogênese na área miocárdica infartada após o evento isquêmico. Porém, essa formação de novos vasos não é capaz de suprir a necessidade de aporte de oxigênio necessária para a manutenção dos cardiomiócitos adjacentes à lesão, o que resulta em apoptose dos mesmos (ITESCU; KOCHER; SCHUSTER, 2003; PHAN et al., 2012).

Estas alterações estruturais ventriculares e as alterações nas variáveis hemodinâmicas em pacientes com IC contribuem para o início precoce do metabolismo anaeróbico durante o exercício, resultando em reduzida capacidade ao exercício. Porém, ainda há algumas questões não esclarecidas quando se aborda sobre a incapacidade funcional de bombeamento sanguíneo e os sintomas apresentados nos pacientes com IC, relacionados somente aos mecanismos centrais decorrentes da lesão miocárdica (DUSCHA et al., 2008).

1.3 Alterações periféricas relacionadas à Insuficiência Cardíaca

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 (PHAN et al., 2012). As principais alterações relacionadas à insuficiência cardíacas são apresentadas na figura 3.

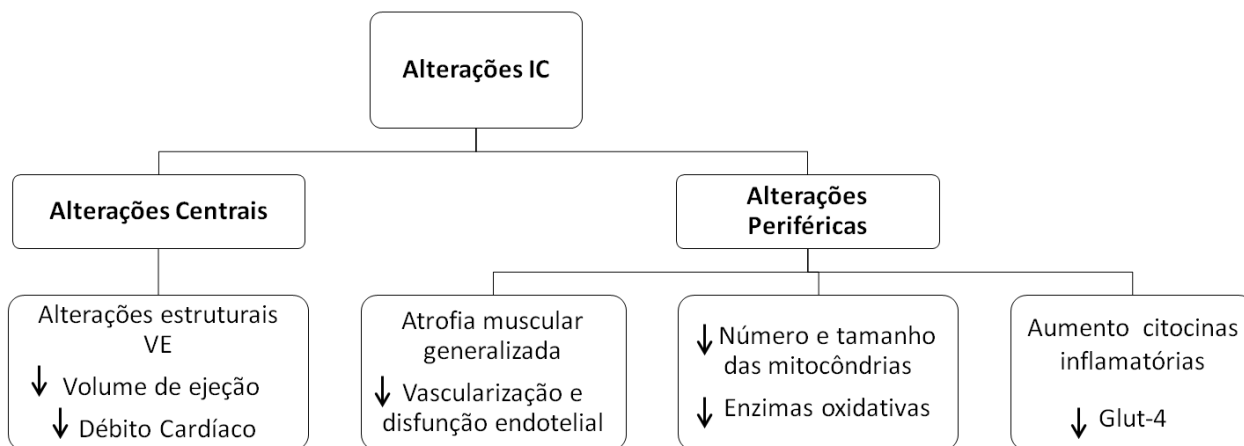


Figura 3 - Principais alterações centrais e periféricas consequentes da fisiopatologia da Síndrome da Insuficiência Cardíaca (LEON; DALL'AGO, 2008).

A aparente discordância entre a fração de ejeção e a limitação funcional apresentada pelos pacientes com IC não está bem esclarecida, mas parece ter associação com alterações

periféricas importantes. A existência destes fatores não-cardíacos explica porque a melhora produzida por agentes terapêuticos farmacológicos não são imediatos quando acontecem ou então, em muitas situações, explica por que a melhora clínica não aparece em resposta a este tratamento (HUNT et al., 2005; DE LEON et al., 2011;).

A intolerância ao exercício na IC é causada não somente pelas anormalidades do coração. Entre os efeitos sistêmicos da IC temos o impacto no fluxo de sangue para a musculatura esquelética (WU et al., 2008). Além disso, a diminuição da densidade capilar (WILLIAMS et al., 2004), do aporte de oxigênio, bem como as mudanças na utilização deste aporte pelo músculo associam-se com a intolerância ao exercício (DUSCHA et al., 2008).

Essa redução do fluxo sanguíneo está presente no repouso e durante a contração muscular devido a prejuízos nos mecanismos da função de bomba do coração e também pela disfunção da resposta vasodilatadora (RICHARDSON et al., 2003). Estes achados resultam em diminuição da velocidade e fluxo de eritrócitos e, conseqüentemente, na redução da condução e difusão do O₂ para o músculo periférico durante o processo de contração muscular (KINDIG et al., 1999; RICHARDSON et al., 2003; POOLE et al., 2012).

A redução do fluxo sanguíneo periférico leva à disfunção endotelial, a qual resulta em vasoconstrição e aumento da resistência vascular e que contribui para uma diminuição ainda mais importante do aporte sanguíneo para a musculatura ativa (FANG; MARWICK, 2003; POOLE et al., 2012). Esta disfunção está relacionada também ao aumento da atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) (ZHU et al., 2004; GARNIER et al., 2009), ativação de citocinas inflamatórias, aumento do estresse oxidativo e redução da síntese de óxido nítrico (NO) (FANG; MARWICK, 2002). Em indivíduos com IC, a associação entre disfunção endotelial e mortalidade pode estar relacionada também com alterações na

microcirculação cardíaca, o que contribui para a progressão da doença por induzir a isquemia e/ou necrose no coração (CANETTI et al., 2003; KATZ et al., 2005).

As citocinas inflamatórias também estão alteradas na patogênese desta síndrome. Em pacientes com IC, as lesões no miocárdio são, em parte, resultantes da ativação do sistema inflamatório, com a produção de citocinas pró-inflamatórias, ativação do sistema complemento, produção de anticorpos e expressão de moléculas de adesão que irão perpetuar o crônico estado inflamatório (SETA et al., 1996; CHEN et al., 2008; NIEBAUER, 2000; LOPES et al., 2010; FRANGOIANNIS, 2012).

Diversos estudos têm demonstrado associação entre a intolerância ao exercício, os níveis de fatores neurohormonais e as citocinas pró-inflamatórias na IC (ADAMOPOULOS et al., 2002; LARSEN et al., 2004; ITOH et al., 2005; NIEBAUER et al., 2005; FRANGOIANNIS, 2008). E, além disso, têm-se mostrado correlação positiva entre o aumento de citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e a gravidade da doença (ITOH et al., 2005).

Mudanças no balanço entre as citocinas anti-inflamatórias como a interleucina-10 (IL-10) e pró-inflamatórias como TNF- α causam desregulação do sistema imune. Estas mudanças afetam também a transcrição de outras citocinas inflamatórias (KAUR; SHARMA; SINGAL, 2006; LOPES et al., 2010). O aumento de TNF- α induz a intolerância ao exercício, depressão da função do ventrículo esquerdo, apoptose do músculo cardíaco e periférico (DALLA LIBERA et al., 2001), além de induzir à translocação de um dos principais transportadores de glicose, o GLUT-4, para a superfície celular (ROHER et al., 2008). O aumento da concentração de TNF- α na IC parece ser revertido com o treinamento físico através da diminuição da hipóxia local (LARSEN et al., 2004).

1.4 Fisiopatologia no modelo de Insuficiência Cardíaca

O modelo experimental de infarto do miocárdio após a ligação da artéria coronária em roedores tem sido o modelo animal de insuficiência cardíaca mais amplamente utilizado. A oclusão parcial da artéria coronária esquerda leva à isquemia miocárdica crônica e, conseqüentemente à insuficiência cardíaca (HASENFUSS, 1998; CHORRO; SUCH-BELENGUER; LÓPEZ-MERINO, 2009). Este modelo de indução de IC resulta em alterações hemodinâmicas semelhantes às apresentadas em humanos, como diminuição da frequência cardíaca, pressão arterial média (MANIKANDAN et al., 2004) e aumento da pressão diastólica final do VE (FRANCIS et al., 2001).

Além das alterações centrais, o modelo resulta em modificações sistêmicas na regulação neurohormonal (FRANCIS et al., 2001), alterações na capilarização periférica (THOMAS; HUDLICKA, 1999; REHN et al., 2009) e demais alterações periféricas inclusive em relação a estresse oxidativo e metabolismo.

1.5 Células Tronco da Medula Óssea

As células tronco (CT) são definidas como células indiferenciadas e não especializadas, capazes de auto-renovação em múltiplas linhagens (MORALES, 2007). Essa capacidade caracteriza-se como divisões simétricas e assimétricas. Da primeira, originam-se duas novas CTs (indiferenciadas) que podem assim permanecer por sucessivas divisões celulares, mantendo o “pool” ou lote de células não especializadas. Da segunda forma de divisão celular, originam-se duas células distintas: uma indiferenciada, como descrito anteriormente e outra diferenciada (especializada). Essas células filhas, especializadas, são dotadas de funções específicas que variam de acordo com o tecido que essas novas células

irão formar (SANTOS; SOARES; CARVALHO, 2004; EMERICK; MONTENEGRO; DEGRAVE, 2007).

As CTs podem ser 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; c) são capazes de se diferenciar em diversos tipos de células especializadas quando submetidas a certas condições fisiológicas ou experimentais (MOTA; SOARES; SANTOS, 2005). Essa última característica, denominada de plasticidade ou transdiferenciação, destaca a importância das CTs em estudos que buscam a cura de doenças crônico-degenerativas (ORLIC et al., 2001).

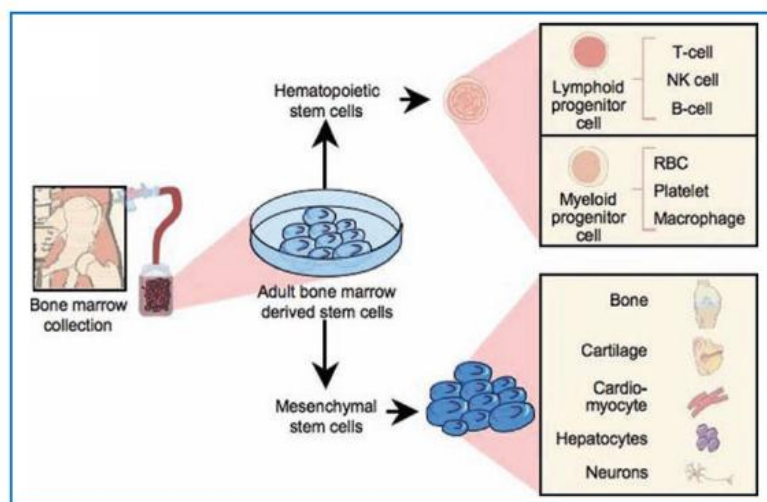


Figura 4 – Células Tronco Adultas Multipotentes e suas diferenciações. (NELSON et al., 2009).

As CT adultas, incluindo as células tronco hematopoiéticas (CTH), são células embrionárias preservadas no tecido adulto, sendo aceito, portanto, que - similarmente ao modelo de desenvolvimento embrionário - estas células estão sujeitas à regulação extrínica por uma variedade de citocinas, fatores de crescimento e múltiplas vias de sinalização. No sistema hematopoiético, muitas dessas moléculas de adesão e superfície interligam as CTHs à seus nichos (LI; LI, 2006). Estes nichos, conhecidos como microambiente de CTs, são

espaços específicos na medula óssea localizados na região endosteal e associadas ao endotélio sinusoidal, o que permite uma comunicação adequada entre as células hematopoéticas e seu microambiente (EHNINGER; TRUMPP, 2011). O nicho age regulando a autorrenovação e diferenciação celular e desempenha papel fundamental na regulação do número de células sanguíneas e também protegem as CTs contra proliferação excessiva (KAUR-BOLLINGER; GOTZE; OOSTENDORP, 2012).

O conceito de nicho para descrever o microambiente fisiológico das CTHs foi proposto primeiramente em 1978. Este microambiente mantém as CTs em estado quiescente para a auto-renovação na maior parte do tempo e, ativa as CTs permitindo a proliferação e reparo tecidual. Assim, para manter a homeostasia das CTs, o nicho não somente fornece um ambiente de proteção de outros estresses fisiológicos ou mudanças, mas também restringe a diferenciação (o que esgotaria o *pool* de CTs) e acarretar em produção excessiva – *over production* -, o que resultaria em formação tumoral (LI; LI, 2006).

Após o desenvolvimento, as células são capazes de deixar o microambiente medular, mas, uma pequena porção de células indiferenciadas acaba migrando da medula óssea durante a vida do organismo e retornam ao microambiente medular (*homing*), conforme figura 5. O tráfico das CTs e progenitoras hematopoéticas entre a medula óssea e sangue periférico contribui para a manutenção da hematopoese (PAPAYANNOPOULOU; SCADDEN, 2008).

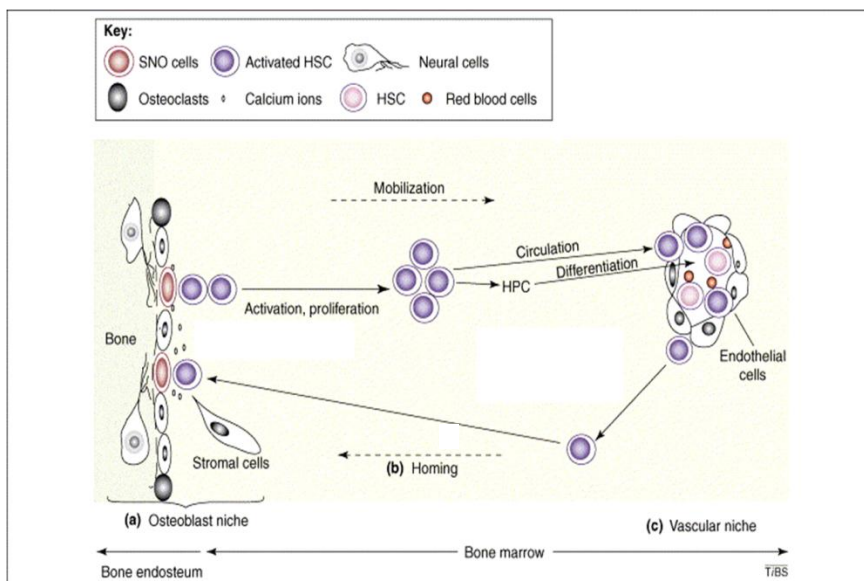


Figura 5 – Nicho osteoblástico e nicho vascular em quiescência, mobilização e homing. (a) Os osteoblastos que revestem a superfície endosteal (na interface do osso e sistema hematopoiético) compreendem o microambiente fisiológico –“nicho”, para CTHs em quiescência. Íons de cálcio mantêm fisiologicamente as CTHs neste nicho osteoblástico. (b) Ativação de CTHs para mobilização e homing (volta par o nicho) é iniciada por fatores de crescimento e citocinas, incluindo moléculas de adesão e superfície, enzimas e íons. (c) CTHs são ativadas para a mobilização e diferenciação no nicho vascular, guiadas pela demanda fisiológica. Abreviações: HPC, células hematopoéticas progenitoras; HSC, células tronco hematopoéticas (LI; LI, 2006).

A localização, sobrevivência, proliferação e diferenciação das CTHs na medula óssea são dependentes da interação com o microambiente medular. Essas células ficam em estado quiescente, isto é, não estão em processo de divisão celular, mas mantêm interação dinâmica com o microambiente, permitindo a expansão e migração da medula óssea, dependendo da demanda fisiológica (CARVALHO, 2008).

A capacidade de migração, por demanda, e a plasticidade das CT adultas pode provavelmente gerar linhagens de células diferentes de seu órgão original. Assim as células após a diferenciação podem ser utilizadas para regeneração parcial de órgãos e reparo celular em várias espécies, assim como nos humanos (ORLIC et al., 2001). A administração dessas

células visa a recuperar a função de órgãos lesados por mecanismos que envolvem a secreção de vários fatores, como citocinas e fatores de crescimento (MORALES, 2007).

No infarto agudo do miocárdio, evidências têm mostrado que CTs da medula óssea autólogas podem se regenerar dentro do miocárdio infartado e melhorar a perfusão da zona isquêmica (ORLIC et al., 2001; BARBASH; CHOURAQUI; BARON, 2003; SEGERS; LEE, 2008; SANGANALMATH et al., 2011). O crescimento e destino das CTs, dependente da via de implantação, e os mecanismos pelos quais o meio influencia na diferenciação ainda não estão totalmente determinados (STRAUER; KORNOWSKI, 2003).

1.6 Células Tronco e Doenças Cardíacas

O coração humano foi considerado, por longo tempo, como tecido inábil em regenerar frente a um evento lesivo, incapaz de reparar ou regenerar cardiomiócitos em processo de morte celular (RUBART; FIELD, 2006), sendo esse conceito errôneo. Porém, apesar de possuir capacidade regenerativa, a magnitude desta autorreparação seria muito limitada para compensar a enorme perda de cardiomiócitos resultante de um grande infarto (MENASCHÉ, 2003), e, somado a esse fenômeno fisiológico, o manejo médico recorrente tem se mostrado limitado em amenizar as consequências de um processo cicatricial pós-infarto (LAFLAMME et al., 2007). Sendo assim, a única opção viável é uma fonte exógena de células para efetuar o repovoamento de áreas lesadas (MENASCHÉ, 2003). Atualmente, o uso de CT predomina em estudos experimentais em cardiologia (LAFLAMME; MURRY, 2005).

Idealmente, as células exógenas devem satisfazer os seguintes critérios: (a) ser de fácil obtenção e expandir; (b) ter capacidade de formar enxertos intramiocárdicos estáveis; (c) ter capacidade de união eletromecânica com os cardiomiócitos hospedeiros e sincronizar-se

funcionalmente (batimento cardíaco) com eles; (d) serem desprovido de efeitos arritmogênicos e/ou oncogênicos (MENASCHE, 2003). Em modelos experimentais, diversos tipos celulares têm sido utilizados como propostas para o reparo cardíaco, entre elas: células embrionárias, células mononucleares de medula espinhal (hematopoéticas e mesenquimais) e CT cardíacas residentes (KALIL et al., 2008), conforme figura 6.

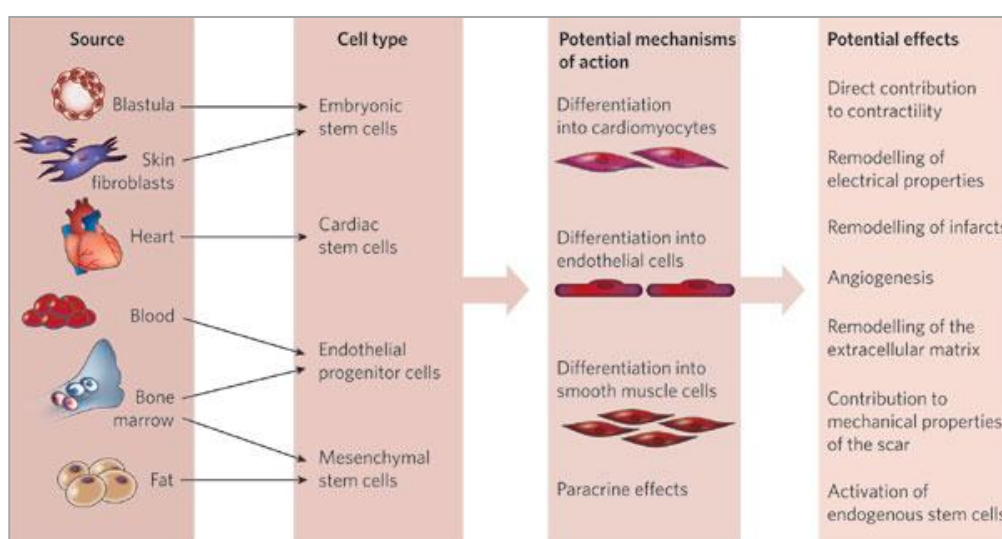


Figura 6 – Tipos celulares propostos para a terapia celular em cardiologia visando o reparo cardíaco pós-infarto. Diferentes tipos de células tronco e progenitores têm demonstrado melhorar a função cardíaca por vários mecanismos, incluindo a formação de novos cardiomiócitos, células endoteliais e células musculares lisas de tecido vascular (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 permita a restauração da função cardíaca através da geração de força sistólica (LAFLAMME et al., 2007). Alguns trabalhos da literatura demonstraram que a melhora funcional foi associada a uma diminuição da área de fibrose, à formação de novos cardiomiócitos e a neovascularização (ORLIC et al., 2001; PAYNE et al., 2007; GERSH et al., 2009).

1.7 Implante de Células Tronco e os Fatores de Crescimento

Os fatores de crescimento hematopoéticos são citocinas que atuam na formação e regulação de várias atividades funcionais das células hematopoéticas progenitoras e maduras como quimiotaxia, degranulação, ativação e citotoxicidade (BARREDA; HANINGTON; BELOSEVIC, 2005). Este tem sido um foco para o tratamento de doenças cardiovasculares, visto que o processo inflamatório criado em relação à lesão isquêmica desencadeia a liberação de citocinas das mais diversas variedades, que servirão de sinalização para a proliferação e atração das células do sistema imune (CASTRO, 2006).

Fatores estimuladores de colônias vêm sendo estudados como potentes estimuladores da resposta imune e catalisadores da proliferação celular, os quais incluem: (a) fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF); (b) fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), (c) fator de células tronco (SCF) e (d) eritropoetina (EPO). Há evidências de que algumas citocinas estão relacionadas com o remodelamento cardíaco pós-infarto e mobilização de células precursoras da medula óssea para a circulação periférica, sendo que as de maior repercussão são: o G-CSF (MINATOBUCHI et al., 2004) e o SCF (LUTZ et al., 2008), conforme figura 7.

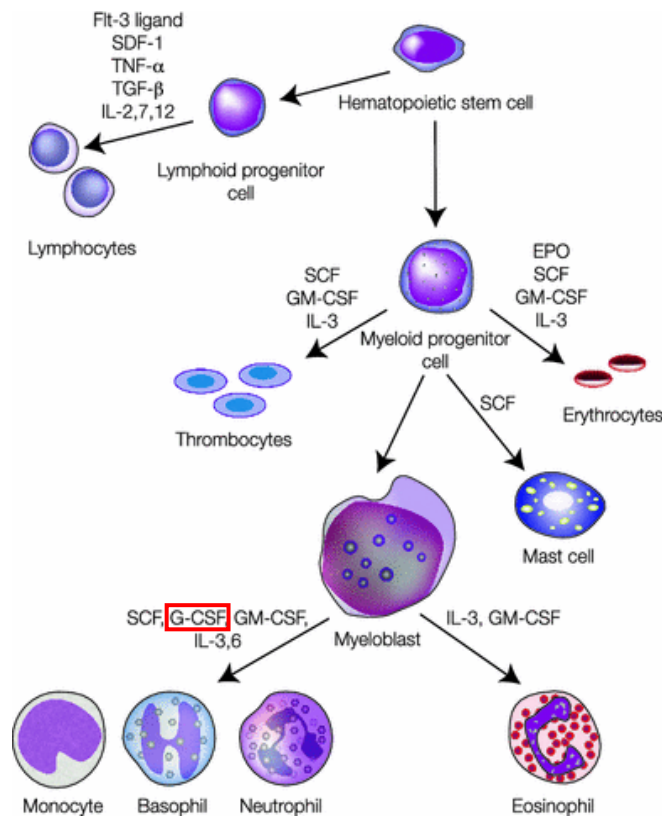


Figura 7 – Representação esquemática da hematopoese. Células pluripotentes e células progenitoras da medula óssea dividem-se e diferenciam-se formando as hemácias, plaquetas e leucócitos. O papel específico das citocinas hematopoéticas é demonstrado na figura. Destaque para o fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF), o qual foi utilizado em nosso estudo (SANGANALMATH et al., 2011).

Alguns estudos têm buscado elucidar os efeitos positivos do G-CSF no modelo experimental de infarto do miocárdio. Minatoguchi et al (2004) encontraram novos cardiomiócitos na área isquêmica subsequente à administração de G-CSF cinco dias após infarto. Neste mesmo estudo, o tratamento com G-CSF acelerou o reparo cardíaco não somente pela regeneração tecidual, mas também pelo aumento de infiltrado de células inflamatórias e alteração da dinâmica da matriz extracelular na borda isquêmica do infarto, diminuindo o remodelamento prejudicial (MINATOGUCHI et al., 2004; KHAN et al., 2009) e melhorando a função contrátil cardíaca pós-infarto (ORLIC et al., 2001; MIKI et al., 2004).

Portanto, a regeneração tecidual, não é o único mecanismo pelo qual o G-CSF atua na lesão miocárdica. O G-CSF pode ter um efeito terapêutico pleiotrópico, através do

recrutamento de CT para o local da injúria, colaborando para a transdiferenciação das CTs em cardiomiócitos, sendo este um mecanismo benéfico citoprotetor (KHAN et al., 2009).

Em resumo, além dos efeitos regenerativos, dois outros efeitos são esperados no processo de cicatrização cardíaca após o tratamento com G-CSF: (a) efeito direto no receptor de superfície na membrana do cardiomiócito e (b) efeito indireto produzido no miocárdio proveniente do infiltrado inflamatório e CT (BALDO; RODRIGUES; MILL, 2010), como representado na figura 8.

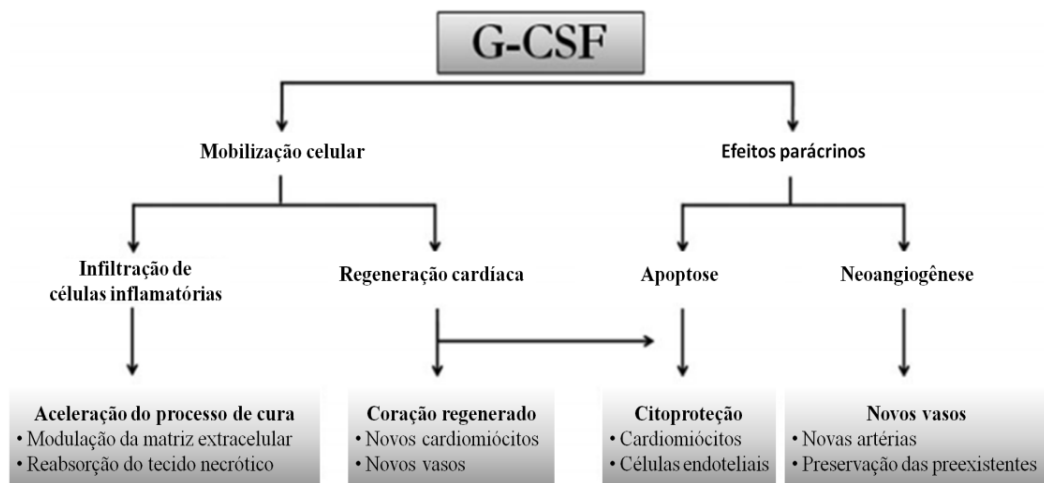


Figura 8 – Figura esquemática dos efeitos do G-CSF no coração infartado. O G-CSF pode ter um efeito terapêutico pleiotrópico, através do recrutamento de CT para o local da injúria, promovendo a formação de novos cardiomiócitos, age como modulador da formação da escara cicatricial através da matriz extracelular e colágeno, além de possuir efeito citoprotetor e neovascularizante (BALDO et al., 2010).

A despeito dos estudos demonstrarem que a administração de G-CSF possui capacidade de prevenir o remodelamento e disfunção ventricular esquerda (FUKUHARA et al., 2004; TAKANO et al., 2006; KHAN et al., 2009), prejudiciais ao funcionamento do coração, resultados controversos também são descritos na literatura. Dados demonstram que, embora ocorra capacidade de mobilização de CT para a periferia sob o uso do G-CSF, esse efeito não acarreta em melhora da função cardíaca (RIPA, 2012), prevenção de hipertrofia ou diminuição da zona de infarto (ZOHLNHOFFER et al., 2006; LOUZADA et al., 2010). Sendo

assim, apesar das evidências que embasam o potencial benéfico da terapia com G-CSF, estudos são necessários para fomentar o conhecimento do uso de citocinas no reparo cardíaco de pacientes com doença isquêmica do coração.

2. Objetivos

2.1 Geral

Avaliar os efeitos centrais e periféricos da implantação de células tronco hematopoéticas em camundongos com insuficiência cardíaca induzida por infarto do miocárdio associado ou não ao uso de G-CSF.

2.2 Específicos

- Avaliar os efeitos do modelo de insuficiência cardíaca em camundongos submetidos à cirurgia de ligadura da artéria coronária esquerda sobre as características morfológicas teciduais centrais e funcionais, comparando-as aos animais que foram submetidos ao procedimento cirúrgico sem obstrução da artéria.
- Avaliar o perímetro de infarto do miocárdio em camundongos com insuficiência cardíaca implantados com células tronco hematopoéticas, associado ou não ao uso de G-CSF.
- Avaliar a velocidade final e distância total percorrida por cada animal durante o teste progressivo escalonado em camundongos com insuficiência cardíaca implantados com células tronco hematopoéticas, associado ou não ao uso de G-CSF.
- Determinar o perfil de citocinas teciduais (diafragma e músculo esquelético) após implante de células tronco hematopoéticas em camundongos com insuficiência cardíaca, associado ou não ao uso de G-CSF.

- Analisar a existência de alterações microscópicas nos tecidos cardíacos (ventrículo esquerdo e direito) e pulmão após implante de células tronco hematopoéticas em camundongos com insuficiência cardíaca, associado ou não ao uso de G-CSF.
- Correlacionar os resultados obtidos em teste progressivo até a exaustão e perímetro de infarto observado em avaliação ecocardiográfica em camundongos submetidos à cirurgia de indução de infarto do miocárdio.

3. Metodologia

3.1 Modelo de Estudo

Esse estudo se caracteriza por uma pesquisa básica, com experimentação em modelo animal de laboratório, pelo qual foram avaliados os efeitos centrais e periféricos da implantação de células tronco por vias intracardíaca, associada ou não à administração de Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos (G-CSF).

3.2 Informações Éticas

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Amazonas (CEEA-UFAM), sob protocolo nº017/2010 em reunião de 07/05/2010 (Anexo1), por concordar com os princípios de cuidados com animais de laboratório de acordo com a lei nº 6.638 da República Federativa do Brasil de 08 de maio de 1979, que trata de normas para as práticas didático-científico da vivisseção de animais.

3.3 População de estudo

Neste estudo foram utilizados camundongos fêmeas BALB/c, com 4-6 semanas de idade, provenientes do Biotério da Universidade Estadual Paulista de Botucatu (UNESP). Esses camundongos foram mantidos em gabinetes específicos para animais de laboratório, com isolamento de ambiente, controle automático de luz (ciclos claros e escuros de 12 horas),

temperatura (22°C) e umidade constante (Gabinete para Biotério/Insight Ltda.), alimentados com ração padrão e água *ad libitum*.

O experimento é constituído pelos seguintes grupos experimentais, conforme apresentado na figura 10:

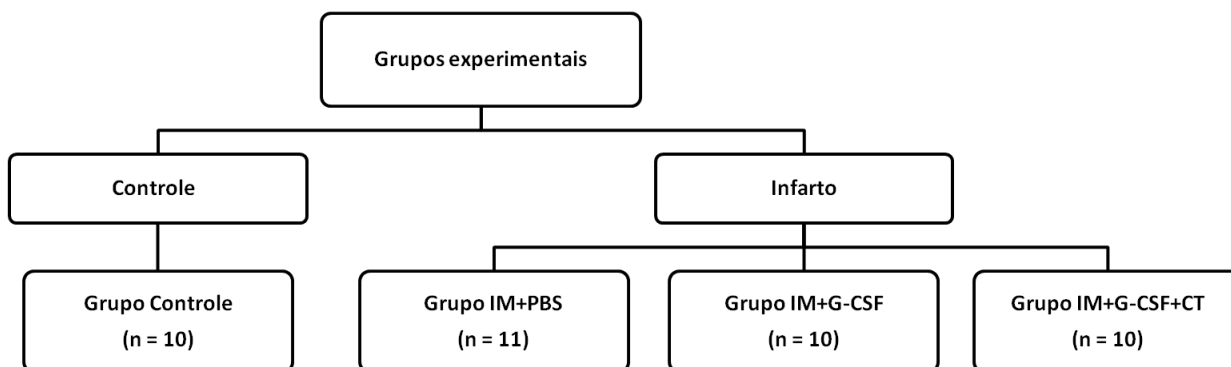


Figura 9 - Organograma para apresentação dos grupos experimentais.

3.4 Cirurgia de Indução do Infarto do miocárdio

Os animais foram inicialmente anestesiados por via inalatória utilizando anestésico sevoflurano com fluxo contínuo de mistura com oxigênio, intubados e ventilados artificialmente (Rodent Ventilator modelo 683 – Harvard). A técnica utilizada para indução do infarto foi o modelo de ligadura da artéria coronária esquerda (LUTZ et al., 2008). A técnica consistiu na exposição do ventrículo esquerdo através de uma toracotomia esquerda, entre a quarta e quinta costelas. Nos animais em que o infarto do miocárdio foi induzido, foi realizada uma sutura permanente (fio mononylon 7.0) na artéria coronária descendente principal esquerda, em um ponto entre 1 e 2 mm distalmente ao bordo do átrio esquerdo. O espaço intercostal foi suturado, o pneumotórax drenado, a musculatura peitoral foi reposicionada e a pele foi suturada com fio mononylon 6.0. A temperatura do animal foi

mantida entre 36,8° e 37°C em cama cirúrgica aquecida (Cama aquecedora/Insight Ltda) durante o procedimento cirúrgico.

Animais grupo Controle: Os camundongos do grupo Controle foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, mas sem a ligadura da artéria coronária.

A tabela 1 apresenta a descrição dos grupos experimentais segundo os procedimentos metodológicos realizados.

Tabela 1. Caracterização da amostra conforme descrição dos grupos experimentais.

Grupo	Caracterização dos Grupos
Grupo Controle	Os animais foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos citados na seção 4.4 de indução do infarto do miocárdio, porém, não houve obstrução da artéria coronária.
Grupo infarto do miocárdio + solução tampão fosfato 0,9% (IM+PBS)	Os animais foram submetidos à cirurgia de infarto do miocárdio, e injetados com solução tampão fosfato 0,9% (PBS) intracardíaca após 7 dias de indução do infarto.
Grupo infarto do miocárdio + G-CSF (IM+G-CSF)	Os animais foram submetidos à cirurgia de indução de infarto do miocárdio, após 7 dias de pós-operatório, foi administrado G-CSF durante 5 dias, na dose de 200 µg/kg (ROBERTS et al., 1997) via intraperitoneal.
Grupo Infartado + células tronco hematopoéticas via intracardíaca + G-CSF (IM+G-CSF+CT)	Os animais foram submetidos à cirurgia de indução de infarto do miocárdio, foram implantados com CT hematopoéticas isoladas de camundongos doadores de CT hematopoéticas e foram tratados com fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF) na dose de 200 µg/kg (ROBERTS et al., 1997) durante 5 dias após procedimento cirúrgico.

3.5 Pesagem corporal

A evolução do peso corporal de todos os animais foi acompanhada semanalmente, em balança semi-analítica (SF-400, Marca Electronic) durante o período do experimento até a conclusão do mesmo.

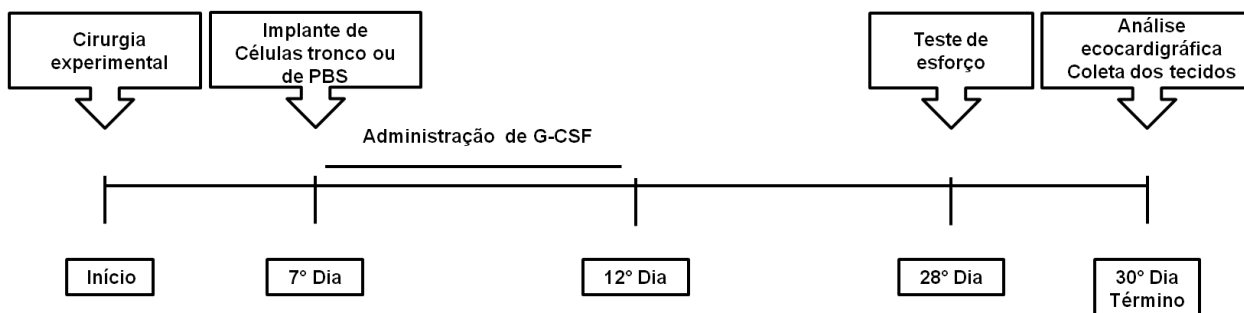


Figura 10- Organograma para apresentação do modelo experimental.

3.6 Preparo e isolamento das células tronco hematopoéticas

3.6.1 Administração do Fator de Crescimento (G-CSF) para camundongos doadores e coleta de Células Tronco

O Fator de Estimulação de Colônias de Granulócitos (G-CSF) (Filgrastine®/Blausiegel Ind. e Com. Ltda), na dose de 200 µg/kg, foi administrado por via intraperitoneal por um período de quatro dias prévios à coleta das CT. Os camundongos doadores de CT receberam G-CSF via intraperitoneal. A coleta foi realizada no 4º dia de administração de G-CSF, 24h após a 3ª dose de G-CSF segundo protocolo estabelecido em experimento prévio (GARCIA, 2011). O sangue foi coletado pelo plexo ocular através de pipeta Pasteur heparinizada (1mL de cada animal) e armazenado em pool de 4 animais em tubos de coleta de sangue com EDTA de 4mL. O material foi encaminhado ao Laboratório de Terapia Celular da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) e as células foram implantadas nos animais dos grupos células tronco previamente infartados.

3.6.2 Isolamento das Células Mononucleares

O material coletado, conforme citado no item 3.6.1, foi processado dentro de capela de fluxo laminar nível II, previamente esterilizada por 20 minutos com luz ultra-violeta. O sangue periférico obtido (3 mL) foi separado por gradiente de Ficoll-Hypaque (HISTOPAQUE[®]-1077/Sigma-Aldrich[®]/St.Louis,MO EUA) - volume a volume (sangue/Ficoll) - com centrifugação a 0,6g por 25 minutos, à temperatura ambiente e sem freio. Em seguida, foi coletado o anel formado (creme de leucócitos), transferido para outro tubo e o volume foi completado para 15 mL e novamente centrifugado à 0,6g por 15 minutos, em temperatura de 15° C. O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuscitado em 10 mL de solução tampão fosfato com soro autólogo. Posteriormente, as células foram novamente centrifugadas e ressuscitadas em 1 mL de solução tampão fosfato com soro autólogo a 5%.

A contagem celular foi realizada 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 hematopoéticas foi determinado pela análise fenotípica dos marcadores anti-CD34^{+high}/CD45^{+low}, obedecendo ao Protocolo do ISHAGE (SUTHERLAND DR, 1996) sendo implantados $2,584 \times 10^3$ CTH em 0,06 mL.

3.6.3 Citometria de Fluxo

A caracterização morfológica e imunofenotípica das células tronco hematopoéticas mobilizadas para o sangue periférico dos camundongos foram feitas por citometria de fluxo. A primeira etapa da citometria consistiu na marcação das células com anticorpos monoclonais que se fixaram nas moléculas de superfície das células tronco. Esses anticorpos são marcados com fluorescência e estas são captadas pelo citômetro de fluxo. Para a realização da esta análise foi utilizado 100µL da suspensão celular, sendo acrescentados os anticorpos monoclonais anti-CD34 e anti-CD45. Após a homogeneização, foi procedida uma nova centrifugação dos tubos na rotação de 0,3g por cinco minutos. O sobrenadante foi descartado

e o material ressuspenso em um 1 mL de PBS (PhosphateBuffered Saline) e homogeneizado novamente, realizando-se a leitura no citômetro. Coletou-se 100.000 eventos de cada tubo para realização das análises. A leitura foi feita no Citômetro de Fluxo Becton Dickinson (BD) – FACSCalibur® da Fundação De Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - FHEMOAM. Os dados obtidos foram adquiridos no software CELL QUEST e a identificação morfométrica e imunofenotípica das CTHs foi realizada utilizando-se o programa FlowJo (versão 9.4).

3.7 Implante das células tronco

O implante das células mononucleares via intracardíaca foi realizado sete dias após a indução do infarto, por meio de esternotomia mediana, em uma única injeção com agulha de insulina, no local da lesão, sob as mesmas técnicas anestésicas e ventilatórias descritas anteriormente (BROFMAN et al., 2004), sendo implantado um volume total de 0,06mL.

3.8 Administração do Fator de crescimento (G-CSF)

Para o grupo IM+G-CSF, foi administrado o G-CSF na dose de 200 µg/kg, por via intraperitoneal por um período de cinco dias posteriores ao procedimento de infarto. O grupo IM+G-CSF+CT recebeu a mesma dosagem de G-CSF durante 5 dias após o procedimento de implantação das CT.

3.9 Avaliação da Capacidade Funcional

O teste de esforço físico foi realizado após 2 dias de adaptação do animal com a esteira rolante, através de teste progressivo escalonado até a exaustão do mesmo (FERREIRA et al., 2007), com velocidade inicial de 11 m/min, sem inclinação, após 28 dias da indução do

infarto. A cada três minutos, a velocidade foi aumentada em 5 m/min, até a exaustão total do animal, ou seja, o teste terminava quando o animal não conseguia manter o padrão da corrida. As variáveis avaliadas foram: a velocidade final (m/s) e a distância total percorrida (m) por cada animal durante o teste.

3.10 Avaliação Ecocardiográfica

Após um período de 30 dias, os animais foram anestesiados e ventilados, conforme descrito anteriormente para o estudo ecocardiográfico (FARAHMAND et al., 2008). Para a análise, foi realizada a tricotomia da região anterior do tórax e colocação dos animais em decúbito dorsal na cama cirúrgica aquecida para o posicionamento apropriado do transdutor no hemitórax esquerdo do animal. Foi utilizado o equipamento GE® VIVID 5 (Highland Park Dr. Bloomfield, USA), com transdutor de 8 MHz. A área de infarto foi estimada pela determinação do perímetro interno da região infartada em relação ao perímetro total do coração (PAYNE et al., 2007). Em cada exame ecocardiográfico foi coletado um total de três medidas, sendo calculados, posteriormente, a média e o desvio padrão da média. Foi mensurado o perímetro total do ventrículo esquerdo e o perímetro de escara cicatricial nos grupos infartados.

3.11 Coleta de tecidos

Após a coleta de sangue, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, conforme normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA¹). A seguir, foram coletados os seguintes tecidos: coração, pulmão, diafragma, fígado, baço e músculo estriado esquelético isquiotibial bilateral. Os corações foram retirados e dissecados, separando-se os átrios, os ventrículos esquerdo e direito, sendo o septo ventricular considerado integrante do ventrículo esquerdo.

Após pesagem de todos os tecidos em balança analítica (Adventurer, modelo Ohaus), os tecidos foram divididos em duas partes: (1) fixado em solução de formol a 10%, utilizada para análise histopatológica; (2) armazenada em pool de 2 animais, em solução de 300µL de RPMI-1640 (Sigma-Aldrich®/St.Louis,MO EUA), para a análise das citocinas teciduais. A tíbia direita foi retirada e medida com régua milimetrada para a normalização dos pesos do coração e ventrículos.

3.12 Determinação de hipertrofia cardíaca

A presença de hipertrofia cardíaca foi determinada utilizando o peso de cada ventrículo

¹ COBEA – www.cobea.org.br

esquerdo e direito isolados para cada animal. Para análise desses dados, foi corrigido o peso de cada tecido pelo peso da tíbia do animal (mg). O resultado será apresentado em mg/mg (VANZELLI, 2009).

3.13 Determinação de congestão pulmonar e hepática

A presença de congestão pulmonar e hepática foi determinada utilizando-se o peso de cada órgão (pulmão esquerdo e fígado) de cada animal. Para a análise desta medida, o peso de cada tecido foi corrigido pelo peso da tíbia do animal (mg). O resultado é apresentado em mg/mg (VANZELLI, 2009).

3.14 Dosagem de citocinas circulantes e teciduais

As concentrações de citocinas foram determinadas em pool de 2 animais cada. Para tanto, o sangue foi coletado após 48hs do teste de esforço, centrifugado e o sobrenadante armazenado para a dosagem das citocinas. Os tecidos (ventrículo esquerdo e direito, diafragma e ísquiotibiais) foram triturados manualmente, centrifugados e o sobrenadante armazenado para a dosagem das citocinas. As citocinas inflamatórias analisadas foram: IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-4, IL-12 e IFN- γ , TGF- β e IL-10, as quais foram quantificadas através do método *Enzyme Linked Immunosorbant Assay* (ELISA) usando a leitora de placas ASYS Hitech (GmbH modelo Atlantis 4, Eugendorf, Austria). Para este procedimento foram utilizados os Kit BD OptEIA (BD Bioscience, San Diego, CA, USA).

3.15 Análise anátomo-patológica

As amostras conservadas em formol foram encaminhadas para a Universidade Estadual do Amazonas –UEA, Laboratório de Histopatologia. As amostras foram depositadas em cassetes plásticos histológicos, individualmente, e numeradas. Uma vez realizada esta identificação, as amostras foram colocadas no histotécnico, passando pelos processos de desidratação e hidratação por meio de substâncias químicas (álcool, xilol,) com o objetivo de realizar emblocamento das amostras em parafina. O processo durou cerca de nove horas, e obedeceu ao seguinte ciclo: para a desidratação, as amostras foram colocadas em álcool 70% (1 hora), 80% (1 hora), 90% (1 hora), 100% (2 horas). O processo de clarificação é a segunda etapa, as amostras são colocadas em dois banhos de xilol cada um por 1 hora. O pré-embecimento em parafina foi realizado com dois banhos em parafina cada um por cerca de 1 hora.

Após a retirada do material do histotécnico, os tecidos foram incluídos em blocos de parafina para então realização do corte e coloração. Os cortes com espessura de 5 micra foram

obtidos através de micrótomo (SLEE MAIZ modelo CUT 4055), e posicionados em lâmina de vidro previamente identificada. Após a obtenção de todas as lâminas, estas foram colocadas em uma estufa por cerca de 30 minutos para desparafinização dos tecidos e posterior coloração dos mesmos. Os cortes histológicos foram corados pela coloração de Hematoxilina-Eosina (FISCHER et al., 2008), para avaliação dos achados citoarquiteturais. Quando necessário, foram realizadas colorações auxiliares, como o Tricrômico de Gomori (WICK, 2008), para a melhor visualização de fibras colágenas.

A análise anátomo-patológica visou a analisar os parâmetros, conforme tabela abaixo:

Tabela 2. Caracterização dos eventos avaliados na análise anátomo-patológica.

Tecidos	Eventos observados pela análise anátomo-patológica
Ventrículos esquerdo e direito	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Desorganização de fibras ✓ Hialinização ✓ Calcificação ✓ Espessamento endocárdico ✓ Adelgaçamento ✓ Infiltrado inflamatório ✓ Angiogênese
Pulmão	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Distensão alveolar ✓ Congestão ✓ Infiltrado inflamatório

A figura 11 ilustra cortes transversais do ventrículo esquerdo após coloração pela técnica de Hematoxilina e Eosina (A) e pelo Tricrômico de Gomori (B), onde pode ser evidenciada área de adelgaçamento com substituição por colágeno subsequente à cirurgia experimental. O ensaio histopatológico foi realizado no modelo simples-cego.

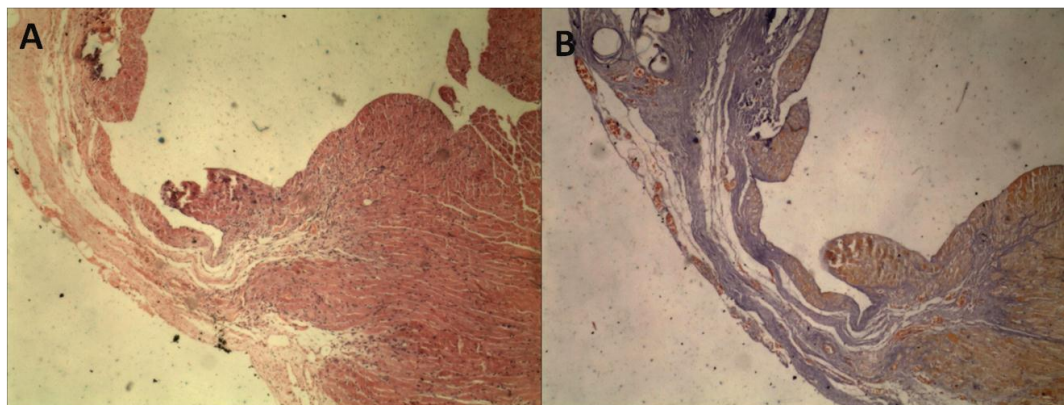


Figura 11. Secção miocárdica ventricular esquerda de um animal infartado, demonstrativa da utilização da técnica de Hematoxilina e Eosina (A) e técnica de coloração de Tricrômico de Gomori (B). A imagem representa área de adelgaçamento do miocárdio com substituição por colágeno (azul) formando a escara cicatricial subsequente ao infarto do miocárdio.

3.16 Análise estatística

Os resultados obtidos, até o presente momento, foram armazenados no programa Excel[®] 2007 para Windows7[®]. Para a análise dos dados e confecção dos gráficos foi utilizado o programa GraphPadPrism[®] versão 5. Os resultados numéricos foram expressos como média \pm desvio padrão da média. Previamente à aplicação dos testes estatísticos apropriados para a comparação entre os grupos experimentais, a normalidade da distribuição amostral e a homogeneidade da variância foram avaliadas pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e de Bartlett, respectivamente.

A comparação das médias entre os grupos experimentais foi realizada empregando-se o teste de ANOVA de dois fatores, seguido de teste de TUKEY para dados paramétricos ou o teste de Mann-Whitney para os dados não paramétricos. As diferenças entre as comparações efetuadas foram consideradas estatisticamente significantes quando a probabilidade estatística foi menor que 5% ($p < 0,05$). Para análise de correlação foi utilizado teste chi-quadrado (χ^2) de Pearson. O nível de significância utilizado em todas as análises foi inferior a 5% ($p < 0,05$).

4. Referências

ABBATE, A. et al. Acute myocardial infarction and heart failure: role of apoptosis. **Intern J Biochem and Cell Biol**, v. 38, p. 1834-40, 2006.

ADAMOPOULOS, S. et al. Physical training modulates proinflammatory cytokines and the soluble Fas/soluble Fas ligand system in patients with chronic heart failure. **J Am Coll Cardiol**, v. 39, n. 4, p. 653-63, 2002.

AGVALL, B.; ALEHAGEN, U.; DAHLSTROM, U. The benefits of using a heart failure management programme in Swedish primary healthcare. **Eur J Heart Fail**, 2012.

ALLA, F.; ZANNAD, F.; FILIPPATOS, G. Epidemiology of acute heart failure syndromes. **Heart Fail Rev**, v. 12, n. 2, p. 91-5, 2007.

BALDO, M. P.; RODRIGUES, S. L.; MILL, J. G. Granulocyte colony-stimulating factor for ischemic heart failure: should we use it? **Heart Fail Rev**, v. 15, n. 6, p. 613-23, 2010.

BARBASH, I. M.; CHOURAQUI, P.; BARON, J. Systemic delivery of bone marrow stem cells to the infarcted myocardium. **Circulation**, v. 108, p. 863-868, 2003.

BARREDA, D. R.; HANINGTON, P. C.; BELOSEVIC, M. Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. **Develop Comper Immunol**, v. 28, p. 509-554, 2005.

BRASIL. **Plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) no Brasil 2011-2022**. SAÚDE., S. D. V. E. S. D. D. A. D. S. D. Brasília: Ministério da Saúde: 148 p. 2011.

BROFMAN, P. et al. Transplante celular: análise funcional, imunocitoquímica e histopatológica em modelo experimental de miocardiopatia isquêmica utilizando diferentes células. **Rev Brasil Cirur Cardiovasc** v. 19, n. 3, p. 261-266, 2004.

CANETTI, M. et al. Evaluation of myocardial blood flow reserve in patients with chronic congestive heart failure due to idiopathic dilated cardiomyopathy. **Am J Cardiol**, v. 92, n. 10, p. 1246-9, 2003.

CARVALHO, A. C. S. R. **Estudo da proliferação e diferenciação de células tronco hematopoéticas provenientes de sangue de cordão umbilical na presença e ausência de mitógenos**. 2008. Instituto Butantan/IPT, Universidade de São Paulo, São Paulo.

CASTRO, J. P. S. W. D. **Mobilização de células-tronco da medula óssea é suficiente para a melhora funcional de corações de ratos infartados?** . 2006. Ciências Biológicas Univerdade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

CHEN, D. et al. Cytokines and acute heart failure. **Crit Care Med**, v. 36, n. 1 Suppl, p. S9-16, 2008.
CHORRO, F. J.; SUCH-BELENGUER, L.; LÓPEZ-MERINO, V. Modelos animales de enfermedad cardiovascular. **Rev Esp Cardiol**, v. 62, n. 1, p. 69-84, 2009.

DALL'AGO, P.; STEIN, R.; RIBEIRO, J. Exercício em pacientes com insuficiência cardíaca: Do dogma às evidências. **Rev Socied Cardiol do Rio Grande do Sul**, v. 4, p. 1-6, 2005.

DALLA LIBERA, L. et al. Apoptosis in the skeletal muscle of rats with heart failure is associated with increased serum levels of TNF-alpha and sphingosine. **J Mol Cell Cardiol**, v. 33, n. 10, p. 1871-8, 2001.

DE CAMPOS LOPES, C. B. et al. Socioeconomic factors in the prognosis of heart failure in a Brazilian cohort. **Int J Cardiol**, v. 113, n. 2, p. 181-7, 2006.

DE LEON, E. B. et al. Neuromuscular electrical stimulation improves GLUT-4 and morphological characteristics of skeletal muscle in rats with heart failure. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 201, n. 2, p. 265-73, 2011.

DUNCAN, B. B. et al., Eds. **Saúde Brasil 2010: Uma análise da situação de saúde e de evidências selecionadas de impacto de ações de vigilância em saúde**. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde/MSed. 2010.

DUSCHA, B. D. et al. Implications of chronic heart failure on peripheral vasculature and skeletal muscle before and after exercise training. **Heart Fail Rev**, v. 13, n. 1, p. 21-37, 2008.

EHNINGER, A.; TRUMPP, A. The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in. **J Exp Med**, v. 208, n. 3, p. 421-8, 2011.

EMERICK, M. C.; MONTENEGRO, K. B. M.; DEGRAVE, W., Eds. **Novas tecnologias na genética humana: avanços e impactos para a saúde**. Rio de Janeiro: GESTEC-Fiocruz. 2007.

FANG; MARWICK. Vascular dysfunction and heart failure: epiphenomenon or etiologic agent? **Am Heart J**, v. 143, n. 3, p. 383-90, 2002.

_____. Mechanisms of exercise training in patients with heart failure. **Am Heart Journal**, v. 145, n. 5, p. 904-11, 2003.

FARAHMAND, P. et al. Skeletal myoblasts preserve remote matrix architecture and global function when implanted early or late after coronary ligation into infarcted or remote myocardium. **Circulation**, v. 118, n. 14 Suppl, p. S130-7, 2008.

FERREIRA, J. C. et al. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 34, n. 8, p. 760-5, 2007.

FISCHER, A. H. et al. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. **CSH Protoc**, 2008.

FLAHERTY, J. D. et al. Acute heart failure syndromes in patients with coronary artery disease early assessment and treatment. **J Am Coll Cardiol**, v. 53, n. 3, p. 254-63, 2009.

FRANCIS, J. et al. Progression of heart failure after myocardial infarction in the rat. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 281, n. 5, p. R1734-45, 2001.

FRANGOIANNIS. The immune system and cardiac repair. **Pharmacol Res**, v. 58, n. 2, p. 88-111, 2008.

_____. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. **Circ Res**, v. 110, n. 1, p. 159-73, 2012.

FRANGOIANNIS, N. G. The immune system and cardiac repair. **Pharmacological Research**, v. 58, p. 88-111, 2008.

FUKUHARA, S. et al. G-CSF promotes bone marrow cells to migrate into infarcted mice heart, and differentiate into cardiomyocytes. **Cell Transplantation**, v. 13, n. 7-8, p. 741-8, 2004.

GARCIA, N. P. **Influência do G-CSF na mobilização de células tronco mesenquimais e hematopoéticas e na produção de citocinas em cultura primária** 2011. Programa de Pós-Graduação de Mestrado em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Amazonas Manaus.

GARNIER, A. et al. Control by circulating factors of mitochondrial function and transcription cascade in heart failure: a role for endothelin-1 and angiotensin II. **Circ Heart Fail**, v. 2, n. 4, p. 342-50, 2009.

GERSH, B. J. et al. Cardiac Cell Repair Therapy: A Clinical Perspective. **Mayo Clin Proc**, v. 84, n. 10, p. 876-892, 2009.

GHEORGHIADE, M. et al. Pathophysiologic targets in the early phase of acute heart failure syndromes. **Am J Cardiol**, v. 96, n. 6A, p. 11G-17G, 2005.

HASENFUSS, G. Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy. **Cardiovascular Research**, v. 39, n. 1, p. 60-76, 1998.

HAYKOWSKY, M. J. et al. Determinants of exercise intolerance in elderly heart failure patients with preserved ejection fraction. **J Am Coll Cardiol**, v. 58, n. 3, p. 265-74, 2011.

HUNT, S. A. 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**, v. 112, n. 12, p. e154-235, 2005.

ITESCU, S.; KOCHER, A. A.; SCHUSTER, M. D. Myocardial neovascularization by adult bone marrow-derived angioblasts: strategies for improvement of cardiomyocyte function. **Heart Fail Rev**, v. 8, n. 3, p. 253-8, 2003.

ITESCU, S.; SCHUSTER, M. D.; KOCHER, A. A. New directions in strategies using cell therapy for heart disease. **J Mol Med**, v. 81, n. 5, p. 288-96, 2003.

ITOH, K. et al. Relationship between exercise intolerance and levels of neurohormonal factors and proinflammatory cytokines in patients with stable chronic heart failure. **Int Heart J**, v. 46, n. 6, p. 1049-59, 2005.

KALIL, R. A. et al. Autologous transplantation of bone marrow mononuclear stem cells by mini-thoracotomy in dilated cardiomyopathy: technique and early results. **Sao Paulo Med J**, v. 126, n. 2, p. 75-81, 2008.

KATZ, S. D. et al. Vascular endothelial dysfunction and mortality risk in patients with chronic heart failure. **Circulation**, v. 111, n. 3, p. 310-4, 2005.

KAUR-BOLLINGER, P.; GOTZE, K. S.; OOSTENDORP, R. A. Role of secreted factors in the regulation of hematopoietic stem cells by the bone marrow microenvironment. **Front Biosci**, v. 17, p. 876-91, 2012.

KAUR, K.; SHARMA, A. K.; SINGAL, P. K. Significance of changes in TNF-alpha and IL-10 levels in the progression of heart failure subsequent to myocardial infarction. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 291, n. 1, p. H106-13, 2006.

KHAN, M. et al. IGF-1 and G-CSF complement each other in BMSC migration towards infarcted myocardium in a novel in vitro model. **Cell Biol Int**, v. 33, n. 6, p. 650-7, 2009.

KINDIG, C. A. et al. Impaired capillary hemodynamics in skeletal muscle of rats in chronic heart failure. **J Appl Physiol**, v. 87, n. 2, p. 652-60, 1999.

KITZMAN, D. W.; GROBAN, L. Exercise intolerance. **Heart Fail Clin**, v. 4, n. 1, p. 99-115, 2008.

_____. Exercise intolerance. **Cardiol Clin**, v. 29, n. 3, p. 461-77, 2011.

LAFLAMME, M. A.; MURRY, C. E. Regenerating the heart. **Nat Biotechnol**, v. 23, n. 7, p. 845-56, 2005.

LAFLAMME, M. A. et al. Cell-based therapy for myocardial ischemia and infarction: pathophysiological mechanisms. **Annu Rev Pathol**, v. 2, p. 307-39, 2007.

LARSEN, A. I. et al. Effect of exercise training in patients with heart failure: a pilot study on autonomic balance assessed by heart rate variability. **Eur J Cardiovasc Prev Rehabil**, v. 11, n. 2, p. 162-7, 2004.

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

LEON, E. B. D.; DALL'AGO, P. Repercussões das alterações musculares periféricas na insuficiência cardíaca. **Diálogo**, v. 12, 2008.

LI, Z.; LI, L. Understanding hematopoietic stem-cell microenvironments. **Trends Biochem Sci**, v. 31, n. 10, p. 589-95, 2006.

LOPES, R. D. et al. Changes in the production of IL-10 and TNF- α in skeletal muscle of rats with heart failure secondary to acute myocardial infarction. **Arq Brasil Cardiol**, v. 94, p. 313-320, 2010.

LOUZADA, R. A. et al. Granulocyte-colony stimulating factor treatment of chronic myocardial infarction. **Cardiovasc Drugs Ther**, v. 24, n. 2, p. 121-30, 2010.

LUND, G. K. et al. Chronic heart failure: global left ventricular perfusion and coronary flow reserve with velocity-encoded cine MR imaging: initial results. **Radiology**, v. 227, n. 1, p. 209-15, 2003.

LUTZ, M. et al. Local injection of stem cell factor (SCF) improves myocardial homing of systemically delivered c-kit + bone marrow-derived stem cells. **Cardiovasc Res**, v. 77, n. 1, p. 143-50, 2008.

MALTA, D. C.; NETO, O. L. D. M.; JUNIOR, J. B. D. S. Apresentação do plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis no Brasil, 2011 a 2022. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 4, p. 425-438, 2011.

MANIKANDAN, P. et al. Time course studies on the functional evaluation of experimental chronic myocardial infarction in rats. **Mol Cell Biochem**, v. 267, n. 1-2, p. 47-58, 2004.

MENASCHÉ, P. Stem cells: where we stand. **Dialogues in Cardiovascular Medicine** v. 8, n. 3, 2003.

MIKI, T. et al. Granulocyte colony stimulating factor/macrophage colony stimulating factor improves postinfarct ventricular function by suppression of border zone remodeling in rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 31, n. 12, p. 873-82, 2004.

MINATOGUCHI et al. Acceleration of the healing process and myocardial regeneration may be important as a mechanism of improvement of cardiac function and remodeling by postinfarction granulocyte colony-stimulating factor treatment. **Circulation**, v. 109, n. 21, p. 2572-80, 2004.

MORALES, M., Ed. **Terapias avançadas: células tronco, terapia gênica e nanotecnologia aplicada à saúde**. São Paulo: Atheneu, 2007.

MOTA; SOARES; SANTOS. Uso de terapia regenerativa com células-tronco da medula óssea em doenças cardiovasculares: perspectiva do hematologista. **Rev Brasil Hematol Hemoter**, v. 27, n. 2, p. 126-132, 2005.

MOTA AUGUSTO C. A., S. M. B. P., SANTOS RICARDO R. . Uso de terapia regenerativa com células-tronco da medula óssea em doenças cardiovasculares: perspectiva do hematologista. **Rev Brasil Hematol Hemoter**, v. 27, n. 2, p. 126-132, 2005.

NELSON, T. J. et al. Stem cell platforms for regenerative medicine. **Clin Transl Sci**, v. 2, n. 3, p. 222-7, 2009.

NIEBAUER, J. Inflammatory mediators in heart failure. **Int J Cardiol**, v. 72, n. 3, p. 209-13, 2000.

NIEBAUER, J. et al. Home-based exercise training modulates pro-oxidant substrates in patients with chronic heart failure. **Eur J Heart Fail**, v. 7, n. 2, p. 183-8, 2005.

NIEMINEN, M. S.; HARJOLA, V. P. Definition and epidemiology of acute heart failure syndromes. **Am J Cardiol**, v. 96, n. 6A, p. 5G-10G, 2005.

OLIVA, F. et al. Acute heart failure patient profiles, management and in-hospital outcome: results of the Italian Registry on Heart Failure Outcome. **Eur J Heart Fail**, v. 14, n. 11, p. 1208-17, 2012.

ORLIC, D. et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 18, p. 10344-9, 2001.

PAPAYANNOPOULOU, T.; SCADDEN, D. T. Stem-cell ecology and stem cells in motion. **Blood**, v. 111, n. 8, p. 3923-30, 2008.

PAYNE, T. R. et al. A relationship between vascular endothelial growth factor, angiogenesis, and cardiac repair after muscle stem cell transplantation into ischemic hearts. **J Am Coll Cardiol**, v. 50, n. 17, p. 1677-84, 2007.

- PHAN, T. T. et al. The pathophysiology of heart failure with preserved ejection fraction: from molecular mechanisms to exercise haemodynamics. **Int J Cardiol**, v. 158, n. 3, p. 337-43, 2012.
- POOLE, D. C. et al. Muscle oxygen transport and utilization in heart failure: implications for exercise (in)tolerance. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 302, n. 5, p. H1050-63, 2012.
- REHN, T. A. et al. Temporary fatigue and altered extracellular matrix in skeletal muscle during progression of heart failure in rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 297, n. 1, p. R26-33, 2009.
- RICHARDSON, T. E. et al. Effects of chronic heart failure on skeletal muscle capillary hemodynamics at rest and during contractions. **J Appl Physiol**, v. 95, n. 3, p. 1055-62, 2003.
- RIPA, R. S. Granulocyte-colony stimulating factor therapy to induce neovascularization in ischemic heart disease. **Dan Med J**, v. 59, n. 3, p. B4411, 2012.
- ROBERTS, A. W. et al. Genetic influences determining progenitor cell mobilization and leukocytosis induced by granulocyte colony-stimulating factor. **Blood**, v. 89, n. 8, p. 2736-44, Apr 15 1997.
- ROGER, V. L. et al. Heart disease and stroke statistics--2011 update: a report from the American Heart Association. **Circulation**, v. 123, n. 4, p. e18-e209, 2011.
- ROHER, N. et al. The Proinflammatory Cytokine Tumor Necrosis Factor- α Increases the Amount of Glucose Transporter-4 at the Surface of Muscle Cells Independently of Changes in Interleukin-6. **Endocrinology**, v. 149, n. 4, p. 1880-9, 2008.
- RUBART, M.; FIELD, L. J. Cell-based approaches for cardiac repair. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1080, p. 34-48, 2006.
- SANGANALMATH, S. K. et al. Hematopoietic cytokines for cardiac repair: mobilization of bone marrow cells and beyond. **Basic Res Cardiol**, v. 106, n. 5, p. 709-33, 2011.
- SANTOS, R. R. D.; SOARES, M. B. P.; CARVALHO, A. C. C. D. Transplante de células da medula óssea no tratamento da cardiopatia chagásica crônica. **Rev Soc Brasil Med Tropical**, v. 37, n. 6, p. 490-495, 2004.
- SCHMIDT, M. I. et al. Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. **Lancet**, v. 377, n. 9781, p. 1949-61, 2011.
- SEGERS, V.; LEE, R. Stem-cell therapy for cardiac disease. **Nature**, v. 451, n. 21, 2008.
- SETA, Y. et al. Basic mechanisms in heart failure: the cytokine hypothesis. **J Card Fail**, v. 2, n. 3, p. 243-9, 1996.
- STRAUER, B. E.; KORNOWSKI, R. Stem Cell Therapy in Perspective. **Circulation**, v. 107, p. 929-934, 2003.

SUTHERLAND DR, A. L., KEENEY M, NAYAR R, CHIN-YEE I. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. **J Hematotherapy**, v. 5, n. 3, p. 213-26, 1996.

TAKANO, H. et al. Effects of G-CSF on left ventricular remodeling and heart failure after acute myocardial infarction. **J Molecular Medicine**, v. 84, n. 3, p. 185-93, 2006.

THOMAS, D. P.; HUDLICKA, O. Arteriolar reactivity and capillarization in chronically stimulated rat limb skeletal muscle post-MI. **J Appl Physiol**, v. 87, n. 6, p. 2259-65, 1999.

VANZELLI, A. S. **Efeitos da associação entre treinamento físico e tratamento farmacológico com Beta-bloqueadores sobre a cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática em camundongos**. 2009. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo.

VENTURA-CLAPIER, R.; DE SOUSA, E.; VEKSLER, V. Metabolic myopathy in heart failure. **News Physiol Sci**, v. 17, p. 191-6, 2002.

WHO. **Prevenção de doenças crônicas: um investimento vital**. Brasília: Organização Mundial de Saúde 2005.

WICK, M., Ed. **Diagnostic Histochemistry**. New York: Cambridge University, 1 ed. 2008.

WILLIAMS, A. D. et al. Reduced exercise tolerance in CHF may be related to factors other than impaired skeletal muscle oxidative capacity. **J Card Fail**, v. 10, n. 2, p. 141-8, 2004.

WU, G. F. et al. Effects of B-type natriuretic peptide (nesiritide) on coronary epicardial arteries, systemic vasculature and microvessels. **J Invasive Cardiol**, v. 20, n. 2, p. 76-80, Feb 2008.

ZHU, G. Q. et al. ANG II in the paraventricular nucleus potentiates the cardiac sympathetic afferent reflex in rats with heart failure. **J Appl Physiol**, v. 97, n. 5, p. 1746-54, 2004.

ZOHLNHOFFER, D. et al. Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: a randomized controlled trial. **JAMA**, v. 295, n. 9, p. 1003-10, 2006.

Artigo 1

Título

Infarto do miocárdio: Modelo da ligadura da artéria coronária em camundongos Balb/C

Title

Myocardial infarction: The model of coronary artery ligation in Balb/C mice

Título resumido

Infarto do miocárdio pela ligadura da artéria

Palavras-chave: Modelo experimental, insuficiência cardíaca, camundongos, oclusão coronária.

Key Words: Keywords: Experimental model, heart failure, mice, coronary occlusion.

Resumo

Fundamento: O modelo experimental de infarto do miocárdio após a ligadura da artéria coronária em roedores tem sido o modelo de insuficiência cardíaca mais amplamente utilizado em cardiologia. Porém, este modelo apresenta diversas características que devem ser consideradas durante o desenvolvimento de pesquisas experimentais.

Objetivo: Avaliar os efeitos do modelo de insuficiência cardíaca em camundongos submetidos à cirurgia de ligadura da artéria coronária esquerda sobre as características morfológicas teciduais centrais e funcionais, comparando-as aos animais que foram submetidos ao procedimento cirúrgico sem obstrução da artéria.

Métodos: A cirurgia de ligadura da artéria coronária esquerda foi realizado em camundongos fêmeas isogênicas Balb/C (grupo IM+PBS). Os animais controle foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos, porém, sem ligadura da artéria coronária (grupo Controle). Após 30 dias foi realizada avaliação da capacidade funcional pelo teste de esforço, análise ecocardiográfica e coleta de tecidos.

Resultados: Após 30 dias de indução do infarto, todos os animais do grupo infartado apresentaram alterações contráteis segmentares do ventrículo decorrentes, refletidas pelo perímetro de infarto (30%) e na análise anátomo-patológica, a qual demonstrou processo de hialinização em 45% dos animais. Foi identificado processo de infiltrado inflamatório importante, na análise anátomo-patológica pulmonar, em 5 camundongos controles e 5 animais IM+PBS.

Conclusão: Nossos resultados nos permitem concluir que o modelo de infarto decorrente da ligadura da artéria coronária esquerda é um bom modelo experimental, demonstrado pelas avaliações ecocardiográficas o qual contribui para o entendimento dos mecanismos fisiopatológico da síndrome da insuficiência cardíaca.

Introdução

O modelo experimental de infarto do miocárdio após a ligadura da artéria coronária em roedores tem sido o modelo animal de insuficiência cardíaca mais amplamente utilizado na pesquisa em cardiologia experimental ¹, o qual contribui para análise da fisiopatologia e terapêutica desta síndrome ². O modelo foi descrito inicialmente por Heimbürger em 1946 ³, em animais pequenos, sendo modificado progressivamente por Johns & Olson, em 1954 ⁴. Esse procedimento consiste na abertura do tórax após toracotomia à esquerda, com o animal entubado e ventilado mecanicamente; o pericárdio é aberto para exposição do coração e a artéria coronária esquerda obstruída pela passagem de fio de sutura ⁵.

A oclusão parcial da artéria coronária esquerda, leva à isquemia miocárdica que inicia uma reação inflamatória, ativando mecanismos de reparação que finalmente resulta na formação de escara cicatricial ⁶ e, conseqüentemente, a insuficiência cardíaca ^{1,7}, conforme ilustração da figura 1. O método descrito acima possui várias vantagens. Em primeiro lugar, os animais podem ser criados especificamente para os protocolos e com menor custo do que em animais maiores. Em segundo lugar, a cirurgia é extremamente rápida, com duração variando de 2 a 5 minutos ⁸.

Este modelo de indução de IC, semelhantemente em ratos e camundongos ⁹, acarreta em alterações hemodinâmicas análogas às apresentadas em humanos, como diminuição da frequência cardíaca, pressão arterial média ¹⁰⁻¹¹ e aumento da pressão diastólica final do VE ¹¹⁻¹³. Além das alterações centrais, o modelo resulta em modificações sistêmicas na regulação neuro-hormonal ¹², alterações na capilarização periférica ¹⁴⁻¹⁵ e demais alterações periféricas em relação a estresse oxidativo e metabolismo ¹⁶.

Apesar de ser um modelo amplamente utilizado para o estudo das alterações fisiopatológicas decorrentes da oclusão coronariana, o mesmo apresenta diversas

características peculiares que podem dificultar seu manuseio. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos do modelo de insuficiência cardíaca em camundongos submetidos à cirurgia de ligadura da artéria coronária esquerda sobre as características morfológicas teciduais centrais e funcionais, comparando-as aos animais que foram submetidos ao procedimento cirúrgico sem obstrução da artéria.

Métodos

Animais

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Amazonas (CEEA-UFAM), sob protocolo nº017/2010 em reunião realizada em 07/05/2010, por estar de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Cobea) (<http://www.cobea.org.br>).

Neste estudo foram utilizados camundongos, fêmeas BALB/c, com 4-6 semanas de idade, provenientes do Biotério da Universidade Estadual Paulista de Botucatu (UNESP). Esses camundongos foram mantidos em gabinetes específicos para animais de laboratório, com isolamento de ambiente, controle automático de luz (ciclos claros e escuros de 12 horas), temperatura (22°) e umidade constante (Gabinete para Biotério/Insight Ltda, Ribeirão Preto, Brasil), alimentados com ração padrão e água *ad libitum*.

Indução do infarto agudo do miocárdio

Os animais foram inicialmente anestesiados por via inalatória utilizando anestésico sevoflurano (Baxter Ind. & Com. Ltd, Deerfield, USA) com fluxo contínuo de mistura com oxigênio, intubados e ventilados artificialmente (Rodent Ventilator modelo 683 – Harvard, Massachusetts, USA). A técnica utilizada para indução do infarto foi o modelo de ligadura da artéria coronária esquerda ⁴⁻⁵. A temperatura do animal foi mantida entre 36,8° e 37°C em cama cirúrgica aquecida (Cama aquecedora/Insight Ltda, Ribeirão Preto, Brasil) durante o procedimento cirúrgico. Animais grupo Controle: Os camundongos do grupo Controle foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, mas sem a ligadura da artéria coronária. A evolução do peso corporal de todos os animais foi acompanhada semanalmente, em balança semi-analítica (SF-400, Marca Electronic, SP, Brasil) durante o período do experimento até a conclusão do mesmo.

Desenho experimental

Após o procedimento cirúrgico, os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais: falso operado (Controle, n = 10) e infarto do miocárdio, o qual foi administrado solução tampão fosfato-salino 0,9% para manutenção dos volumes (IM+PBS, n = 11). Os animais controle foram submetidos a todos os procedimentos cirúrgicos, com exceção da ligadura da artéria coronária. Todos os animais foram mantidos durante quatro semanas em observação.

Avaliação da Capacidade Funcional

O teste de esforço físico foi realizado após dois dias de adaptação do animal em esteira rolante, através de teste progressivo escalonado, até a exaustão do animal ¹⁷, com

velocidade inicial de 11 m/s, sem inclinação, após 28 dias da indução do infarto. A cada três minutos, a velocidade foi aumentada em 5 m/s, até a exaustão total do animal, ou seja, o teste terminava quando o animal não conseguia manter o padrão da corrida. As variáveis avaliadas foram: a velocidade final (m/s) e a distância total percorrida (m) por cada animal durante o teste.

Exame Ecocardiográfico

Após um período de 30 dias os animais foram anestesiados e ventilados, conforme descrito anteriormente, para o exame ecocardiográfico, de acordo com o descrito por Farahmand e cols.¹⁸. Após a tricotomia da região anterior do toráx, os animais foram posicionados em decúbito dorsal em cama cirúrgica aquecida para o posicionamento apropriado do transdutor no hemitórax esquerdo do animal. Para este exame foi utilizado o equipamento GE® VIVID 5 (Highland Park Dr. Bloomfield, USA), com transdutor de 8 MHz. A porcentagem de infarto foi estimada pela determinação do perímetro interno da região infartada em relação ao perímetro total do coração¹⁹. Em cada exame ecocardiográfico foi coletado um total de três medidas, sendo calculados, posteriormente, a média e o desvio padrão.

Coleta de tecidos

Após a coleta de sangue, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. Os corações foram retirados e dissecados, separando-se os átrios e os ventrículos, esquerdo e direito, sendo o septo ventricular, considerado integrante do ventrículo esquerdo. Após pesagem de em balança analítica (Adventurer, modelo Ohaus, Col. Lindavista, México), os

ventrículos e pulmões esquerdos foram fixados em solução de formol a 10% para análise histopatológica. A tíbia esquerda foi retirada e pesada para a normalização dos pesos teciduais. A presença de hipertrofia cardíaca foi determinada utilizando o peso do coração e o peso de cada ventrículo esquerdo e direito, isolados para cada animal. A presença de congestão pulmonar e hepática foi determinada utilizando-se o peso de cada órgão (pulmão esquerdo e fígado) de cada animal. Para analisarmos esses dados, foi corrigido o peso de cada tecido pelo peso da tíbia do animal (mg), sendo o resultado apresentado em mg/mg²⁰.

Análise anátomo-patológica

As amostras foram conservadas em formol 10% e incluídas em blocos de parafina para realização do corte e coloração. Os cortes com espessura de 5 micra foram obtidos através de micrótomo modelo CUT 4055 (SLEE Technik GmbH, Mainz, Alemanha) e foram corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina²¹, para avaliação dos achados citoarquiteturais. Quando necessário, foram realizadas colorações auxiliares, como o Tricrômico de Gomori²², para a melhor visualização de fibras colágenas. O ensaio histopatológico foi realizado no modelo simples-cego, visando a avaliar os seguintes parâmetros: nos ventrículo esquerdo e ventrículo direito, (1) desorganização de fibras, (2) hialinização, (3) calcificação, (4) espessamento endocárdico, (5) adelgaçamento, (6) infiltrado inflamatório e (6) angiogênese; no pulmão, (1) distensão alveolar, (2) congestão e (3) infiltrado inflamatório.

Análise estatística

Os resultados obtidos foram armazenados no programa Excel[®] 2007 para Windows7[®]. Para a análise dos dados e confecção dos gráficos foi utilizado o programa GraphPadPrism[®]

versão 5. Os resultados numéricos foram expressos como média \pm DPM. Para análise das variáveis obtidas foi utilizado teste t-Student não pareado. Para análise de correlação foi utilizado teste chi-quadrado (χ^2) de Pearson. O nível de significância utilizado em todas as análises foi inferior a 5% ($p < 0,05$).

Fontes de Financiamento

O presente estudo foi financiado pela FAPEAM, CNPq e CAPES.

Resultados

Mortalidade

No total, 24 animais foram utilizados no estudo, sendo que desses, 12 foram submetidos à cirurgia de indução de infarto com obstrução da artéria coronária esquerda e 12 camundongos foram submetidos à cirurgia controle. A taxa de mortalidade perioperatória, a qual inclui 24h após o procedimento foi maior no grupo Controle (2 animais) do que no grupo IM+PBS (1 animal). Nenhuma morte envolveu ruptura cardíaca em nenhum dos grupos.

Características gerais dos grupos experimentais

O grupo estudado foi considerado homogêneo já que os camundongos não apresentaram diferença significativa do peso corporal no início do estudo. Da mesma forma, o peso corporal mensurado no final do estudo não divergiu entre os grupos, conforme tabela 1. O peso dos corações, assim como, o peso dos ventrículos esquerdos apresentaram aumento de 18% e 20%, respectivamente, quando comparado ao grupo controle, sendo esses sinais

compatíveis com cardiomegalia pós-infarto. O peso corrigido dos pulmões e do fígado, não foi diferente em nenhum dos grupos avaliados.

Função do ventrículo esquerdo

Conforme descrito anteriormente, a ligadura da coronária esquerda é um procedimento eficiente na indução do infarto do miocárdio. No presente estudo, avaliou-se o perímetro do infarto ventricular esquerdo dos camundongos utilizando o exame ecocardiográfico. Observamos na figura 2 que, após 30 dias de indução do infarto, todos os animais do grupo infartado que receberam PBS (IM+PBS) apresentaram alterações contráteis segmentares do ventrículo em estudo anátomo-patológico relativo aos achados de discinesia e acinesia. Nenhum animal do grupo controle apresentou alteração ecocardiográfica do ventrículo esquerdo sugestiva de infarto do miocárdio. O perímetro de infarto no grupo IM+PBS foi de ~30%, demonstrando a eficácia do procedimento experimental.

Avaliação da capacidade funcional

O teste de esforço foi realizado com o intuito de verificar a resistência ao exercício induzida pelo modelo experimental em teste progressivo até a exaustão do camundongo. Os resultados obtidos no teste de avaliação da resistência ao exercício não demonstraram diferença significativa na distância total percorrida (Figura 3) e velocidade final alcançada (Figura 4) pelos animais do grupo controle, quando comparado ao grupo IM+PBS (Controle = 510,3m±137,3; IM+PBS = 572,9m±206,0) e (Controle = 0,66m/s±0,06; IM+PBS = 0,69m/s±0,09), respectivamente.

A análise de correlação entre o teste funcional e os dados ecocardiográficos nos animais submetidos ao procedimento cirúrgico com obstrução da artéria coronária (grupo IM+PBS) demonstrou que quanto maior a disfunção cardíaca determinada pelo perímetro de infarto, maior a intolerância dos camundongos no teste de esforço ($p < 001$), tanto na avaliação da distância total percorrida (Figura 5) quanto na velocidade final alcançada (Figura 6).

Análise anátomo-patológica

Os resultados de achados morfológicos observados nos ventrículos esquerdo e direito e pulmões, após 30 dias da experimentação, são apresentados nas figuras 7 e 8. Os dados referentes ao grupo de camundongos controle e IM+PBS são apresentados a seguir: no ventrículo esquerdo do grupo controle, conforme figura 7 e 9A, não foi observada desorganização das fibras musculares, sendo que as células musculares estriadas cardíacas apresentaram-se organizadas, contendo um ou dois núcleos e citoplasma que se ramifica, dando aspecto de rede contínua. A figura 8 demonstra a presença deste achado em 36% dos animais que foram infartados. Os camundongos do grupo controle não apresentaram evidência de processo de hialinização no ventrículo esquerdo, todavia, 45% dos camundongos IM+PBS apresentaram esse evento. De maneira controversa, 1 animal do grupo controle demonstrou presença de calcificação no ventrículo esquerdo após a cirurgia controle e 2 animais apresentaram no grupo IM+PBS. Não foi observado espessamento miocárdico ou adelgaçamento da parede no grupo controle, o qual foi observado em 36% e 45%, dos animais IM+PBS, respectivamente. Cortes histológicos do ventrículo esquerdo dos animais do grupo controle demonstraram a presença de infiltrado inflamatório em 1 camundongo desse grupo e 2 animais do grupo IM+PBS. Não foi observada angiogênese no grupo controle, a qual foi relatada em 1 animal do grupo IM+PBS.

A análise tecidual do ventrículo direito demonstrou a presença de fibras musculares cardíacas em disposição habitual, parcialmente revestidas com endocárdio sem particularidade, entremeada com vasos sanguíneos, no grupo controle, porém 1 camundongo apresentou alteração no grupo IM+PBS. Nenhum camundongo do grupo controle apresentou hialinização no ventrículo direito, e 1 animal apresentou no grupo IM+PBS. Achados histológicos relativos à calcificação, espessamento endocárdico e adelgaçamento foram encontrados nas seguintes proporções: grupo Controle: 20%, 10% e 10%; e grupo IM+PBS, 18%, 9% e 27%, respectivamente. Não foram observadas alterações diferentes da normalidade quanto à presença de infiltrado inflamatório no VD em nenhum camundongo, assim como angiogênese.

Cortes histológicos obtidos dos pulmões de camundongos do grupo Controle demonstraram histoarquitetura lobular preservada, reconhecendo-se bronquíolo terminal, bronquíolo respiratório e tecido alveolar adjacente. A análise do ácinopulmonar evidenciou hiperdistensão alveolar em 1 camundongo deste grupo. Evento não relatado no grupo IM+PBS. A presença de congestão alveolar moderada em 2 animais do grupo controle e em 45% dos IM+PBS. Identificamos processo de infiltrado inflamatório importante em 5 camundongos controles e 5 animais IM+PBS.

Discussão

O presente estudo demonstrou que a cirurgia de indução do infarto miocárdico após a ligadura da artéria coronária esquerda implica em alterações fisiopatológicas que correspondem à caracterização da síndrome em humanos, permitindo a utilização desse ensaio como recurso para o melhor conhecimento em cardiologia experimental. Porém, salienta-se que os animais denominados de controle, que passam pelo procedimento experimental sem a

obstrução da artéria, também apresentam alterações centrais e periféricas decorrentes da manipulação, que podem, por ventura, comprometer os resultados finais observados.

Os dados ecocardiográficos demonstraram a formação da escara cicatricial após a cirurgia experimental, a qual foi visualizada em todos os camundongos submetidos ao infarto, sendo esta de aproximadamente 30%, de forma semelhante ao que foi anteriormente observado por outros autores ²³. Este resultado corrobora com os resultados encontrados referentes ao aumento de peso do coração e dos ventrículos em camundongos do grupo IM+PBS, os quais indicam hipertrofia miocárdica. Esses dados estão de acordo com os encontrados por de Leon et. al (2011) onde foi observado hipertrofia cardíaca após 30 dias em ratos submetidos à infarto do miocárdio experimental associado à congestão pulmonar e congestão hepática, sinais clínicos de insuficiência cardíaca ¹¹. Porém, em nosso estudo, não observamos diferença significativa entre os grupos em relação aos pesos dos órgãos pulmão e fígado. Sendo assim, optamos por classificar o grupo IM como animais com disfunção ventricular pós-IM e não com IC, conforme Lopes et al. (2009) ²⁴.

Dados da literatura demonstram que existem dois importantes fatores que devem ser considerados no modelo de infarto decorrente da ligadura da artéria coronária que são: a mortalidade elevada nas primeiras 24 h que se seguem à oclusão coronária e a expressiva diversidade dos tamanhos dos infartos obtidos ². A diversidade dos perímetros de infarto reflete-se nos resultados apresentados em nosso estudo, no qual observamos uma variabilidade entre 15 a 40% da taxa entre o perímetro de infarto pelo perímetro total do ventrículo esquerdo.

Outra característica fundamental desse modelo é que as alterações funcionais guardam estreita relação com o tamanho do infarto. Estudos demonstram ^{8,25} que animais com infartos menores que 30% não apresentaram anormalidades hemodinâmicas. Animais com infartos

moderados (31-46%) apresentaram valores hemodinâmicos basais normais, mas reduzida capacidade de gerar pressão. Por outro lado, animais com infartos grandes (>46%) apresentaram insuficiência cardíaca, com elevadas pressões de enchimento e redução do débito cardíaco. Dados semelhantes foram demonstrados no presente estudo no qual foi observado uma correlação negativa entre os valores mensurados no teste de esforço – distância total percorrida e velocidade final alcançada – e o perímetro de infarto nos animais que foram submetidos à operação de infarto produzido pela ligadura da artéria, conforme figuras 5 e 6.

A análise histopatológica do ventrículo esquerdo dos camundongos do grupo IM+PBS apresentou elevada presença de eventos lesivos teciduais produzidos pela cirurgia experimental, incluindo a presença de hialinização, com formação de escara cicatricial decorrente da morte celular e a presença de calcificação. Esse achado sugere uma possível exacerbação da resposta imune ao evento lesivo, acarretando em prejuízo da capacidade de funcionamento da bomba cardíaca. Trabalhos demonstram ²⁶⁻²⁷ uma correlação entre os índices de disfunção cardíaca e os testes funcionais, corroborando aos encontrados em nosso estudo. Resultado controverso foi visualizado no ventrículo esquerdo de camundongos controle, sendo que 1 animal apresentou processo de calcificação decorrente da manipulação cirúrgica. Esses achados também foram relatados no ventrículo direito, que apresentou alterações referentes à calcificação (2 animais), espessamento endocárdico e adelgaçamento da parede nesse grupo (grupo controle).

O modelo experimental em camundongo permite também a avaliação ventricular direita, já que uma das principais características do infarto do miocárdio relaciona-se ao fato de que a morte celular desencadeia processo adaptativo no tecido não infartado, nas regiões adjacentes e distantes da cicatriz ²⁸. No ventrículo direito, também pode ocorrer hipertrofia

correlacionada a elevações da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo e da pressão sistólica ventricular direita ^{25,29}, podendo chegar a 30% ³⁰. Em nosso estudo observamos alterações em 9% dos camundongos relacionadas a espessamento endocárdico e 27% relacionada a adelgaçamento da parede ventricular direita. Outro aspecto que deve ser considerado é que, em animais com grandes infartos, as áreas não infartadas do ventrículo esquerdo e do ventrículo direito exibem aumento da expressão de RNAm para pré-colágeno tipo I e III ³¹, podendo resultar em acúmulo de colágeno progressivo. Dessa forma, grandes infartos frequentemente acompanham-se de diferentes graus de fibrose nas áreas não infartadas ^{8,32}. O evento de hialinização analisado no ventrículo direito por avaliação anátomo-patológica, em nosso estudo, foi observado em 9% dos camundongos do grupo IM+PBS e em nenhum animal do grupo Controle.

Finalmente, foram demonstradas em nosso estudo alterações pulmonares na análise anátomo-patológica, decorrentes da manipulação cirúrgica. Esta observação foi concluída a partir dos resultados referentes à congestão e infiltrado inflamatório nos animais que foram submetidos ao procedimento cirúrgico no qual a artéria coronária esquerda não foi obstruída (grupo Controle).

Conclusão

Apesar dos cuidados referentes à mobilização do animal durante todo o procedimento, o próprio modelo experimental é extremamente invasivo para o animal e mesmo sem a obstrução da artéria e indução do infarto, ocorre um elevado processo inflamatório e produção de fibrose na tentativa de reparo tecidual. No entanto, nossos resultados nos permitem

concluir que o modelo de infarto decorrente da ligadura da artéria coronária esquerda é um bom modelo experimental de indução do infarto.

Potencial Conflito de Interesses

Todos os autores declaram não haver conflito de interesses pertinentes.

Vinculação Acadêmica

Este artigo é parte de tese de Doutorado de Elisa Brosina de Leon pelo Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas.

Legendas para figuras

Tabela 1: Peso corporal e tecidual corrigido pelo peso da tibia de camundongos que foram submetidos à operação controle, e à operação de infarto do miocárdio induzido pela ligadura da artéria coronária após 4 semanas. Os resultados expressos representam média \pm DPM de 21 animais. *Diferença significativa entre o grupo Controle (teste t-Student).

Figura 1: Secção miocárdica ventricular esquerda de um animal infartado, demonstrativa da utilização da técnica de Hematoxilina e Eosina (A) e técnica de coloração de Tricrômico de Gomory (B). A imagem representa área de adelgaçamento do miocárdio com substituição por colágeno (azul) formando a escara cicatricial subsequente ao infarto do miocárdio.

Figura 2: Perímetro de infarto do ventrículo esquerdo. Grupos controle e IM+PBS (Infarto + solução tampão fosfato-salino 0,9%). Os resultados são apresentados em porcentagem referente ao perímetro de infarto/perímetro total do ventrículo esquerdo mensurado na análise ecocardiográfica, após um período de 4 semanas de indução do infarto experimental.

* Diferença estatística significativa entre os grupos IM+PBS e controle ($p < 0,0001$) por teste t-Student.

Figura 3: Distância total percorrida obtida e velocidade final alcançada em teste progressivo até a exaustão realizado após 4 semanas em camundongos foram submetidos à cirurgia controle e à operação de infarto do miocárdio por ligadura da artéria coronária esquerda (IM+PBS). Análise realizada por teste t-Student ($p > 0,05$).

Figura 4: Correlação entre distância total percorrida (A) e velocidade final alcançada (B) obtida em teste progressivo até a exaustão e perímetro de infarto observado em avaliação ecocardiográfica em camundongos submetidos à cirurgia de indução de infarto do miocárdio após 4 semanas (IM+PBS). Análise estatística realizada utilizando teste chi-quadrado (χ^2) de Pearson.

Figura 5: Resultados de frequência de achados morfológicos dos ventrículos esquerdo (VE) e direito (VD) e pulmão nos animais do grupo controle após 30 dias da experimentação. Os dados referentes aos achados histopatológicos estão apresentados a partir da frequência de aparecimento de cada evento, sendo que cada linha representa um camundongo de cada grupo.

Figura 6: Resultados de frequência de achados morfológicos dos ventrículos esquerdo (VE) e direito (VD) e pulmão nos animais do grupo IM+PBS após 30 dias da experimentação. Os dados referentes aos achados histopatológicos estão apresentados a partir da frequência de aparecimento de cada evento, sendo que cada linha representa um camundongo de cada grupo.

Figura 7: Aspecto morfológico dos ventrículos esquerdo e direito de camundongos do grupo controle e IM+PBS após 30 dias da cirurgia de indução do infarto do miocárdio. Aspecto morfológico de alinhamento normal das fibras cardíacas nos animais Controle em (A) ventrículos esquerdo e (B) ventrículo direito; (C) e (D): ventrículo esquerdo dos animais após

indução de infarto demonstrando área de desorganização de fibras cardíacas, com evidente interposição de colágeno. (E) e (F): ventrículo direito demonstrando presença de calcificação (*) Evento de hialinização. Seta indica focos de calcificação (HE, 40x).

Figura 8: Aspecto morfológico dos pulmões de camundongos do grupo controle após 30 dias da cirurgia de indução do infarto do miocárdio. (A) imagem representativa do tecido pulmonar apresentando estruturas brônquicas preservadas e ausência de congestão. (B) Parênquima apresentando distensão dos espaços alveolares e (*) presença de áreas de acúmulo de células perivascularares e peribrônquicas interpretadas como infiltrado inflamatório.

Tabela 1. Peso corporal e tecidual corrigido pelo peso da tíbia de camundongos que foram submetidos à operação controle, e à operação de infarto do miocárdio induzido pela ligadura da artéria coronária após 4 semanas.

Grupos	Controle (n = 10)	IM+PBS (n = 11)	<i>p</i>
Peso			
Corporal inicial (g)	21,44 ± 2,35	20,83 ± 1,32	0,28
Corporal final (g)	23,9 ± 1,91	23,91 ± 1,3	0,98
Coração (mg/mg)	2,28 ± 0,28	2,71 ± 0,51*	0,01
Ventrículo esquerdo (mg/mg)	1,58 ± 0,24	1,91 ± 0,34*	0,01
Ventrículo direito (mg/mg)	0,38 ± 0,06	0,46 ± 0,15	0,07
Pulmão (mg/mg)	1,5 ± 0,24	1,79 ± 1,08	0,19
Fígado (mg/mg)	22,1 ± 3,51	22,94 ± 4,24	0,2

Referências

1. Hasenfuss G. Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy. *Cardiovascular research*. 1998 Jul;39(1):60-76.
2. Tucci P. Pathophysiological characteristics of the post-myocardial infarction heart failure model in rats. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2011;96(5):420-24.
3. Heimbürger RF. Injection into pericardial sac and ligation of coronary artery of the rat. *Arch Surg*. 1946 Jun;52:677-89.
4. Johns TN, Olson BJ. Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals. *Ann Surg*. 1954 Nov;140(5):675-82.
5. 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. *Cardiovasc Res*. 2008 Jan;77(1):143-50.
6. Frangogiannis. The immune system and cardiac repair. *Pharmacol Res*. 2008 Aug;58(2):88-111.
7. Chorro FJ, Such-Belenguer L, López-Merino V. Modelos animales de enfermedad cardiovascular. *Revista Española de Cardiología*. 2009;62(1):69-84.
8. Zornoff L, Paiva S, Minicucci M, Spadaro J. Experimental myocardium infarction in rats: analysis of the model. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2009;93(4):434-40.
9. Lutgens E, Daemen MJ, de Muinck ED, Debets J, Leenders P, Smits JF. Chronic myocardial infarction in the mouse: cardiac structural and functional changes. *Cardiovasc Res*. 1999 Mar;41(3):586-93.
10. Manikandan P, Sumitra M, Nayeem M, Manohar BM, Lokanadam B, Vairamuthu S, et al. Time course studies on the functional evaluation of experimental chronic myocardial infarction in rats. *Mol Cell Biochem*. 2004 Dec;267(1-2):47-58.
11. de Leon EB, Bortoluzzi A, Rucatti A, Nunes RB, Saur L, Rodrigues M, et al. Neuromuscular electrical stimulation improves GLUT-4 and morphological characteristics of skeletal muscle in rats with heart failure. *Acta Physiol (Oxf)*. 2011 Feb;201(2):265-73.
12. Francis J, Weiss RM, Wei SG, Johnson AK, Felder RB. Progression of heart failure after myocardial infarction in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001 Nov;281(5):R1734-45.
13. Phan TT, Shivu GN, Abozguia K, Sanderson JE, Frenneaux M. The pathophysiology of heart failure with preserved ejection fraction: from molecular mechanisms to exercise haemodynamics. *Int J Cardiol*. 2012 Jul 26;158(3):337-43.

14. Thomas DP, Hudlicka O. Arteriolar reactivity and capillarization in chronically stimulated rat limb skeletal muscle post-MI. *J Appl Physiol*. 1999 Dec;87(6):2259-65.
15. Rehn TA, Borge BA, Lunde PK, Munkvik M, Sneve ML, Grondahl F, et al. Temporary fatigue and altered extracellular matrix in skeletal muscle during progression of heart failure in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009 Jul;297(1):R26-33.
16. Jennings RB, Reimer KA. The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu Rev Med*. 1991;42:225-46.
17. Ferreira JC, Rolim NP, Bartholomeu JB, Gobatto CA, Kokubun E, Brum PC. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007 Aug;34(8):760-5.
18. Farahmand P, Lai TY, Weisel RD, Fazel S, Yau T, Menasche P, et al. Skeletal myoblasts preserve remote matrix architecture and global function when implanted early or late after coronary ligation into infarcted or remote myocardium. *Circulation*. 2008 Sep 30;118(14 Suppl):S130-7.
19. 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 Oct 23;50(17):1677-84.
20. Vanzelli AS. Efeitos da associação entre treinamento físico e tratamento farmacológico com Beta-bloqueadores sobre a cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática em camundongos. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2009.
21. Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *CSH Protoc*. 2008;2008:pdb prot4986.
22. Wick M, editor. *Diagnostic Histochemistry*. 1 ed. New York: Cambridge University; 2008.
23. Ferreira JC, Boer BN, Grinberg M, Brum PC, Mochly-Rosen D. Protein quality control disruption by PKCbetaII in heart failure; rescue by the selective PKCbetaII inhibitor, betaIV5-3. *PLoS One*. 2012;7(3):e33175.
24. Lopes RD, Batista Júnior ML, Rosa JC, Lira FSd, Martins Jr E, Shimura AY, et al. Changes in the production of IL-10 and TNF- α in skeletal muscle of rats with heart failure secondary to acute myocardial infarction. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2010;94:313-20.

25. Pfeffer M, Pfeffer J, Fishbein M, Fletcher P, Spadaro J, Kloner R, et al. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circulation Research*. 1979;44(4):503-12.
26. Bacurau AV, Jardim MA, Ferreira JC, Bechara LR, Bueno CR, Jr., Alba-Loureiro TC, et al. Sympathetic hyperactivity differentially affects skeletal muscle mass in developing heart failure: role of exercise training. *J Appl Physiol*. 2009 May;106(5):1631-40.
27. Pina IL, Apstein CS, Balady GJ, Belardinelli R, Chaitman BR, Duscha BD, et al. Exercise and heart failure: A statement from the American Heart Association Committee on exercise, rehabilitation, and prevention. *Circulation*. 2003 Mar 4;107(8):1210-25.
28. Olivetti G, Capasso JM, Meggs LG, Sonnenblick EH, Anversa P. Cellular basis of chronic ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *Circ Res*. 1991 Mar;68(3):856-69.
29. Ratliff NB, Hackel DB. Combined right and left ventricular infarction: pathogenesis and clinicopathologic correlations. *Am J Cardiol*. 1980 Feb;45(2):217-21.
30. Goldman S, Raya TE. Rat infarct model of myocardial infarction and heart failure. *J Card Fail*. 1995 Mar;1(2):169-77.
31. Ertl G, Frantz S. Healing after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2005 Apr 1;66(1):22-32.
32. Sun Y, Weber KT. Infarct scar: a dynamic tissue. *Cardiovasc Res*. 2000 May;46(2):250-6.

Artigo 2

Granulocyte-colony stimulating factor alone decreases exercise tolerance, but stem cells G-CSF associated revert this process in mice myocardial infarction experimental model

Elisa Brosina de Leon^{1,2}, Nadja Pinto Garcia^{2,3}, Liziara Fraporti^{2,4}, Allyson Guimarães da Costa^{2,4}, Gleicy Francisca Lima Almeida², Jaslana Antônia Silva da Cunha², Leandro Eziquiel de Souza⁵, Diego Mendrot Taboas Figueroa⁵, Olindo de Assis Martins⁶, Maria Claudia Irigoyen⁵, Adriana Malheiro^{1,2,4}.

¹. Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil; ². Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, Manaus, Brasil; ³. Programa de Pós-Graduação em Ciência da Saúde, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil; ⁴. Programa de Pós-graduação em Imunologia, Universidade Federal do Amazonas, AM, Brasil; ⁵. Unidade de Hipertensão, Instituto do Coração (InCOOr), Escola de Medicina da Universidade de São Paulo, SP, Brasil; ⁶. Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ-Minas, Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração, MG, Brasil.

Summary

Experiment: In the present study, we measured exercise intolerance by functional analysis and muscle cytokines in diaphragm and hamstring muscles from animals submitted into heart failure experimental surgery treated with granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) alone or associated with hematopoietic stem cells. This led us to hypothesize that despite proven stem cell mobilization into the periphery, the treatment with G-CSF alone implies an exacerbated systemic inflammatory response, resulting in decrease in functional capacity and increased intolerance to exercise, accompanied by important alterations in skeletal muscle, which may be modulated by association of SC implantation into treatment.

Methods and Results: Ligation of the left coronary artery was performed in Female isogenic BALB/C mice. The sham-operated animals underwent the same procedure without ligation of the coronary artery (Sham group). At seven days after ligation operation, the HF mice were received PBS (HF+PBS group) or G-CSF (HF+G-CSF) or G-CSF associated with SC (HF+G-CSF+SC group). After 30 days it was performed functional capacity evaluation, echocardiographic measurement and tissue collection for cytokines analysis. The results demonstrate that all the treatments were able to reduce infarct, more evident following administration of G-CSF. Moreover, G-CSF induced response in the worst stress test (smaller final velocity reached and maximal distance run). Analysis of cytokines skeletal tissue demonstrated increased frequency of high producers of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-6, IL-12, IFN- γ , IL-1- β and IL-4 in mice infarcted, resulting in imbalance in balance anti/pro-inflammatory immune response. The treatments had impaired negative when using G-CSF alone and satisfactory results when combined with the use of SCs.

Conclusion: We conclude that using G-CSF alone appears to be responsible for amplifying the inflammatory process in infarcted animals leading to reduced functional capacity of skeletal muscle, which reflects in lower performance in exercise stress testing. In contrast, the use of G-CSF in association with hematopoietic CT appears to have a beneficial effect in modulating the inflammatory response and result in lower deleterious effect on the heart failure syndrome.

Keywords: hematopoietic stem cell, granulocyte colony stimulating, myocardial infarction, cytokines

INTRODUCTION

Heart failure (HF) is a complex clinical syndrome that can result from structural or functional cardiac disorder that impairs the ability of the ventricle to fill or eject blood ¹. The capacity to exercise presents reduced by around 50% or more, depending on the degree of impairment of ventricular function and this occurs due to abnormal hemodynamic response to exercise ²⁻³. This change has a direct relationship with left ventricular dysfunction and cardiac remodeling itself after myocardial infarction ⁴⁻⁵, beyond decreased aortic distensibility ⁶, relative chronotropic incompetence ⁷ and skeletal muscle remodeling components, figure 1.

However, is already known that respiratory and peripheral muscles are differently affected by HF, and both of which affect the quality of life of patients and prognosis, but its underlying mechanisms are not well understood ⁸⁻⁹. The weak correlation between the hemodynamic (cardiac function indices) with symptoms confirms the importance of muscle and peripheral changes in the pathophysiology of HF ⁵. The existence of these non-cardiac factors explains why the improvement produced by pharmacological therapeutic agents are not immediate when they happen or, in many situations, explains why clinical improvement does not appear in response to this treatment ¹.

Various treatments have been proposed to mitigate the consequences of cardiac insufficiency, as well as surgical treatment, drugs and cell therapy, which may be associated with other therapies, as well as hematopoietic growth factors. Hematopoietic growth factors are cytokines that act in the formation, regulation and various functional activities of hematopoietic progenitor cells and mature as chemotaxis, activation and cytotoxicity ¹⁰, whereas those with higher impact is granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF). This has been a focus for the treatment of cardiovascular diseases, aiming to the inflammatory process created in relation to ischemic injury triggers cytokine release from different varieties which will be the signal for the proliferation of and attract cells of the immune system ¹¹.

A better understanding of the hemodynamics and peripheral mechanism involved in heart failure is necessary to develop specific therapeutic strategies, as G-CSF and stem cells (SC), to slow or prevent muscular atrophy present in this syndrome beyond the deleterious immunologic changes. Thus, the objective of this study was to characterize the impact of G-CSF and associated with hematopoietic stem cells on exercise intolerance by functional analysis and muscle cytokines in diaphragm and hamstring muscles.

METHODS

Experimental animals. This study was in accordance with ethical principles in animal research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (<http://www.cobea.org.br>). All animal procedures were approved by Animal Ethics Committee of the Amazonas Federal University (protocol n° 017/2010). Adult female Balb/C mice (~20g; n=9) were used. All mice were housed under identical conditions and given food and water ad libitum.

Experimental protocol. The mice were anesthetized by inhalation of an isoflurane-oxygen mixture (Baxter Ind. & Com. Ltd, Deerfield, USA), intubated, and mechanically ventilated (HSE-HÁ Mini Vent Ventilador for mice – Harvard Massachusetts, USA). Ligation of the left coronary artery was performed as described previously¹². The sham-operated animals underwent the same procedure without ligation of the coronary artery (Sham group). At seven days after ligation operation, the HF mice were received PBS (HF+PBS group) or 200mg/kg; i.p. of G-CSF¹³ (filgrastim® /Blausiegel Ind. & Com. Ltd) (HF+G-CSF group) or G-CSF associated with SC (HF+G-CSF+SC group), figure 2. G-CSF administration was made during 5 days in both groups, HF+G-CSF and HF+G-CSF+SC. After 30 days it was performed functional capacity evaluation, echocardiographic measurements (GE® VIVID 5/Highland Park Dr. Bloomfield, USA) and tissue collection (heart, lung, diaphragm and hamstring muscles). After weighing all tissues were stored in pool 2 animals in 300µL solution of RPMI-1640 solution (Sigma-Aldrich®/ St. Louis, MO USA) at -20 °C for analysis of cytokine tissue. The right tibia was removed and weighed for standardization of tissue's weights. Heart and lung weights were weighed aiming to detect cardiomegaly and pulmonary congestion, respectively; right hemi-diaphragm and right hamstring muscles, aiming to detect hypertrophy.

Preparation and isolation of hematopoietic stem cells. We administered G-CSF (filgrastim® /Blausiegel Ind. & Com. Ltd, SP, Brasil) at a dose of 200 mg/kg subcutaneously for a period of 3 days prior to the collection of hematopoietic stem cells from the donor animals, as described by Vilas-Boas et al., 2006¹⁰. Peripheral blood was collected 3 days after the beginning of treatment in a heparinized syringe via the ocular plexus, and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated using Ficoll gradient separation (Histopaque® -

1077/Sigma-Aldrich/St. Louis, USA) and a method modified from Boyum¹¹. The percentage of hematopoietic stem cells was determined by analysis of the phenotypic markers anti-CD34^{+high} /CD45^{low}, according to the ISHAGE protocol¹²; being that 2.58 x 10³ hematopoietic SC was implanted through a single injection¹³ using the same anesthetic and ventilatory techniques.

Functional Capacity Evaluation. Exercise capacity, estimated by total distance run, correlates with skeletal muscle work capacity, and it is a method used for detecting exercise intolerance in HF¹⁴. The exercise test was performed after 2 days of adaptation of the animal with the treadmill, stepped through progressive test to exhaustion of the animal¹⁵, with initial velocity of 0.2 m/s without inclination. Every three minutes, the speed was increased by 0.1 m/s, up to total exhaustion of the animal. The test ended when the animal could not maintain the standard of the race. The variables evaluated were: final velocity reached (meters/seconds) and total distance run (meters) for each animal during the test.

Cytokines analysis. The cytokine concentrations were determined in tissue, hamstring muscles and diaphragms, pooled from two animals. To this end, the tissue were minced and centrifuged, and the supernatant was stored (-80 °C) for further analysis. The cytokines tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-6, IL-12, interferon (IFN)- γ , IL-10, IL-1 β and IL-4 were quantified using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with an ASYS Hitech plate reader (4 Atlantis model GmbH, Eugendorf, Austria). For this procedure, the BD OptEIA Kit (BD Bioscience, San Diego, CA, USA) was used and the data of cytokines are shown as mean fluorescence intensity (MFI). To assemble the cytokine signature curves for each clinical group, the global median value of each seric cytokine was calculated using the entire study population and used as the cut-off edge to define each individual as low and high cytokine producer¹⁶. The ascendant cytokine profile from Sham group was assembled and considered as the reference signature curve for comparative analysis between the HF subgroups.

Statistical methods. The data analysis was performed using GraphPad Prism 5 program (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Statistical analysis was performed using the non-parametric Kruskal-Wallis test for comparisons between groups and the non-parametric Mann-Whitney test for group-to-group comparisons. T test was used for echocardiographic measurement. P values of <0.05 were considered significant.

Results

Mortality. In total, 75 animals were utilized in this study. Being that, 22 were used as donors of SC. Coronary artery ligation was performed in 41 mice. The perioperative mortality rate, within 24 h after the operation, was ~12% (5 mice). Finally, 36 mice were randomly allocated to three groups as follows: HF+PBS (12 mice), HF+G-CSF (12 mice), and HF+G-CSF+SC (12 mice). The mortality of HF+PBS mice (1 death [8%]) was lower than that of HF+G-CSF (2 deaths [16%]) and HF+G-CSF+SC (2 deaths [16%]). In sham-operated mice, had 2 deaths [16%]. No deaths involved cardiac rupture in all groups.

Animal characteristics. No behavior associated with stress or adverse effects was observed in mice that participated in the protocol. Table 1 presents the characteristics of the animals. There were no differences between body weights from the different groups at the beginning and at the end of the study. A large area of scarring was observed on the anterior wall of the left ventricle of infarcted mice. The infarct size was lower in HF+G-CSF and HF+G-CSF+SC group compared with HF+PBS mice (HF+G-CSF = ~42%; HF+G-CSF+SC = ~32%, $p = 0.001$). No detectable infarct was observed on the left ventricle of sham mice. Cardiomegaly, pulmonary congestion and hepatic congestion were not statistically significant, as well as hypertrophy of the diaphragm and hamstring (Table 1).

Functional Capacity Evaluation. HF+G-CSF mice displayed decreased exercise tolerance (Figure 1 and 2) associated with worse final velocity reached and maximal distance run, compared to the Sham and HF+PBS groups, which are directly related to skeletal muscle function. Unlike the expected result, there was no statistically significant difference in exercise tolerance in HF+PBS and Sham animals.

Cytokines measurements in the skeletal muscle. Figure 3 shows the serial changes in cytokines in skeletal muscle after 30 days of infarction induction. Following data assembling on multi-cytokine diagrams, the frequency of *High* cytokine producers was calculated for each experimental group. Generally, the comparative analysis of *High* cytokine producers, taking as reference the curve shown by the Sham group, amongst the infarcted groups which highlighted that myocardial infarction is characterized by a general increase in the frequency of *High* cytokine producers of pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-6, IL-12, INF- γ , IL-1 β , besides an increase in the frequency of *High* cytokine producers of anti-inflammatory

cytokine IL-10. The G-CSF treatment (HF+G-CSF) leads an important decrease in IL-4 *High* cytokine producers frequency. The HF+G-CSF animals showed, figure 5, great 47.1% decrease ($p < 0.05$) in the IL-10/TNF- α ratio when compared to the Sham group, and significant 60.3% decrease compared with HF+G-CSF+SC.

Cytokines measurements in the diaphragm muscle. Figure 4 shows the serial changes in cytokines in diaphragm muscle after 30 days of infarction induction. The comparative analysis of *High* cytokine producers, taking as reference the curve shown by the Sham group, showed that the infarcted groups is characterized by a general decrease in the frequency of *High* producers of pro-inflammatory cytokines IL-6, IL-12, IL-1 β , INF- γ , along with decreased frequency of *High* producers of IL-10. The G-CSF treatment (HF+G-CSF) was not efficient at increasing IL-10 and moreover showed increased even more important in TNF- α cytokine. The association treatment (HF+G-CSF+SC) was able to reduce TNF- α and also improve IL-12 and IL-10 frequency cytokines. The HF+G-CSF animals showed, figure 5, great 45% decrease ($p < 0.05$) in the IL-10/TNF- α ratio when compared to the Sham group, and significant 52.8% decrease compared with HF+G-CSF+SC. HF+PBS animals also showed a decrease IL-10/TNF- α ratio compared with Sham animals (24.5%).

4. Discussion

Cytokines have been suggested to play an important role in the pathogenesis of cardiovascular diseases¹⁷.

Despite some studies demonstrate that the administration of G-CSF has the ability to prevent left ventricular dysfunction and remodeling¹⁸⁻²⁰ harmful to the functioning of the heart, controversial results are also reported. Data show that although occurring mobilization capacity of stem cells (SC) to the periphery in the use of G-CSF, this effect does not result in improvement of cardiac function²¹, prevention of hypertrophy or decreased infarct zone²²⁻²³. Thus, despite the evidence that supports the potential benefit of therapy with G-CSF alone or associated with SC administration, a large of studies are needed to foster knowledge of the use of cytokines in cardiac and skeletal muscle repair, including diaphragm, in ischemic heart disease. To test this hypothesis, we primarily studied the effects of these therapies in the cardiac tissue, examining the histopathology and cytokines present in the left ventricle of mice underwent surgery for induction of experimental infarction model using the left

coronary artery ligation (*unpublished data*). This study showed a decrease in serum TGF- β cytokine in mice that received G-CSF alone, in contrast we observed an increase when G-CSF was associated with SC, remembering that TGF- β plays a crucial role in cardiac repair, suppressing inflammation, resulting in angiogenesis and vascularization. We also observed an increase in IFN- γ cytokine in G-CSF group, which was associated with high-level cardiac transcription of TNF- α ²⁴. Histopathology analysis showed a significant increase of calcification and less angiogenesis in the left ventricle in G-CSF mice. On the other hand, we do not observe the presence of calcification and elevated angiogenesis when the G-CSF was associated with the implantation of SC.

This led us to hypothesize that despite proven stem cell mobilization into the periphery, the treatment with G-CSF alone implies an exacerbated systemic inflammatory response, resulting in decrease in functional capacity and increased intolerance to exercise, accompanied by important alterations in skeletal muscle, which may be modulated by association of SC implantation into treatment. To test this hypothesis we evaluated echocardiography measurements, exercise intolerance by functional analysis and muscle cytokines level in diaphragm and hamstring muscles from HF animals treated with G-CSF alone or associated with SC.

The echocardiographic data showed high perimeter of myocardial infarction in mice 30 days after coronary artery blockage. Also noted that the proposed treatments, G-CSF alone and associated with SC were able to decrease the bed sore healing, this being most evident in the group G-CSF. Heart failure in this model of coronary ligation has also been reported by many others^{12,17,25}. However, echocardiographic data are insufficient for the clinical characterization of HF, because this syndrome is defined by the presence of hemodynamic abnormalities, fluid retention (congestion), and physical exercise intolerance¹. However, our study do not showed data referring to the congestive picture, such as presence of pulmonary edema and hepatic congestion.

Although treatment with G-CSF alone has been extremely effective in diminution of bed sore healing after infarction, but the animals achieved worse performance in functional capacity evaluation. In previous laboratory studies, we demonstrated a significant increase of calcification and less angiogenesis in the left ventricle in G-CSF mice by histopathology analysis (*unpublished data*). Furthermore, a good performance during physical exertion is not associated only with an improved cardiac function, but with the combination of better cardiac

performance with beneficial adaptations in non-cardiac target organs. This may include the vasodilator response in the vascular endothelium, the cardiac output distribution, the ventilatory response^{26,27}, and changes in skeletal muscles²⁸. Our study also showed that the association of G-CSF and SC was able to maintaining a satisfactory test. This result suggest an immunomodulatory potential of SC, as mentioned previously by Batten et al²⁹, which use cell therapy in tissue engineering.

Despite the fact that an increase in inflammatory mediators in skeletal muscle is well characterized, both in patients with HF³⁰⁻³¹ and animals³², we decide to analyze the possible effects of proposed treatments, G-CSF and G-CSF associated with the implantation of SC in the inflammatory response of skeletal muscle and we observed the maintenance of the inflammatory response in infarcted animals, even after treatment, emphasis on cytokines TNF- α , IL-1 β , IFN- γ .

Several reports have supported the idea that pro-inflammatory cytokines and anti-inflammatory cytokines are out of balance, especially TNF- α which is over expressed and IL-10, downregulated, in heart failure³³, contributing to the pathogenesis and progression of HF, and also directly correlate with the severity of the disease^{31,34}. The change in the balance between anti/pro-inflammatory suggests the importance of the ratio rather than changes in cytokines level alone¹⁷. We demonstrated a decrease in ratio of IL-10/TNF- α in the muscular level in HF+G-CSF. This result could help to explain lowering data in the exercise tolerance test. Interestingly, the opposite was observed in animals treated with G-CSF and implanted with SC, suggesting an important role of CT in modulating the immune response, when associated with G-CSF.

Serum level of IL-6 are elevated in heart failure syndrome³⁵ and clearly caused ventilatory and peripheral skeletal muscle atrophy³⁶. With regard to skeletal muscle, the elevation of proinflammatory cytokines such as IL-6 is generally viewed in the context of potentially deleterious impacts³⁷, mediating directly or indirectly catabolic effects on skeletal muscle³⁸. For this reason, we evaluated this cytokine in skeletal muscle and we observed an increase in their frequency in HF+PBS animals, as a signal that represents a potential efferent arm of the ability of skeletal muscle to contribute to the stress response of the organism³⁹.

Interesting, we observed an important decrease in *High* producers of IL-4 cytokine in HF+G-CSF group, which was recovery by association with SC. Recent reports indicate that

IL-4 promotes myoblast recruitment, fusion and growth and that this cytokine acts as a pro-migratory agent for myogenic cells⁴⁰, leading to muscle growth⁴¹. In this sense, a lack of IL-4 could cause a reduction in muscle size⁴²⁻⁴³. For the first time, in our study, we showed that infarcted mice treated with G-CSF exhibit a decrease in the content of the cytokine IL-4 in skeletal muscle, but this finding is not supported by reduction in weight of muscle. In the other hand, the association of SC in the treatment was able to improve in 100% the frequency of IL-4 in HF+G-CSF+SC animals.

Skeletal muscle adaptation play an important role in the symptomology of chronic heart failure⁴⁴. However, is already known that respiratory and peripheral muscles are differently affected by HF⁸⁻⁹. The majority of studies that have examined have focused on myofibrillar protein content alterations⁴⁵ and changes in contractile properties⁴⁶ in diaphragm muscle. Driven by this motivation, for the first time, we measured cytokines presents in diaphragm muscle in HF and observed that infarcted group is characterized by a general decrease in the frequency of *High* producers of pro-inflammatory cytokines IL-6, IL-12, IL-1 β , INF- γ , along with decreased frequency of *High* producers of IL-10.

Furthermore, we observed an important increase in frequency of *High* producers of TNF- α in HF+G-CSF associated with decreasing of IL-10, with significantly altered IL-10/TNF- α rate. These findings explain the poor performance achieved by HF+G-CSF animals in functional measurements. We also showed an increase in IL-10/TNF- α rate by SC association, demonstrating the positive effect of this treatment.

CONCLUSION

According to the results observed in this study, we conclude that using G-CSF alone appears to be responsible for amplifying the inflammatory process in infarcted animals leading to reduced functional capacity of skeletal muscle, which reflects in lower performance in exercise stress testing. In contrast, the use of G-CSF in association with hematopoietic SC appears to have a beneficial effect in modulating the inflammatory response and result in lower deleterious effect on the heart failure syndrome.

References

1. Hunt, S.A., *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* **112**, e154-235 (2005).
2. Dall'Ago, P., Stein, R. & Ribeiro, J. Exercício em pacientes com insuficiência cardíaca: Do dogma às evidências. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul* **4**, 1-6 (2005).
3. Kitzman, D.W. & Groban, L. Exercise intolerance. *Cardiol Clin* **29**, 461-477 (2011).
4. Ventura-Clapier, R., De Sousa, E. & Veksler, V. Metabolic myopathy in heart failure. *News Physiol Sci* **17**, 191-196 (2002).
5. Phan, T.T., Shivu, G.N., Abozguia, K., Sanderson, J.E. & Frenneaux, M. The pathophysiology of heart failure with preserved ejection fraction: from molecular mechanisms to exercise haemodynamics. *Int J Cardiol* **158**, 337-343 (2012).
6. Kitzman, D.W. & Groban, L. Exercise intolerance. *Heart Fail Clin* **4**, 99-115 (2008).
7. Mostarda, C., *et al.* Baroreflex sensitivity impairment is associated with cardiac diastolic dysfunction in rats. *J Card Fail* **17**, 519-525 (2011).
8. Howell, S., *et al.* Congestive heart failure: differential adaptation of the diaphragm and latissimus dorsi. *J Appl Physiol* **79**, 389-397 (1995).
9. van Hees, H.W., Ottenheijm, C.A., Granzier, H.L., Dekhuijzen, P.N. & Heunks, L.M. Heart failure decreases passive tension generation of rat diaphragm fibers. *Int J Cardiol* **141**, 275-283 (2010).
10. Barreda, D.R., Hanington, P.C. & Belosevic, M. Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. *Developmental & Comparative Immunology* **28**, 509-554 (2005).
11. Castro, J.P.S.W.d. Universidade Federal do Rio de Janeiro (2006).
12. de Leon, E.B., *et al.* Neuromuscular electrical stimulation improves GLUT-4 and morphological characteristics of skeletal muscle in rats with heart failure. *Acta Physiol (Oxf)* **201**, 265-273 (2011).
13. Roberts, A.W., *et al.* Genetic influences determining progenitor cell mobilization and leukocytosis induced by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* **89**, 2736-2744 (1997).
14. Bacurau, A.V., *et al.* Sympathetic hyperactivity differentially affects skeletal muscle mass in developing heart failure: role of exercise training. *J Appl Physiol* **106**, 1631-1640 (2009).
15. Ferreira, J.C., *et al.* Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **34**, 760-765 (2007).
16. de Almeida, C.M., *et al.* Immunological/virological peripheral blood biomarkers and distinct patterns of sleeping quality in chronic hepatitis C patients. *Scand J Immunol* **73**, 486-495 (2011).
17. Kaur, K., Sharma, A.K. & Singal, P.K. Significance of changes in TNF-alpha and IL-10 levels in the progression of heart failure subsequent to myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**, H106-113 (2006).
18. Fukuhara, S., *et al.* G-CSF promotes bone marrow cells to migrate into infarcted mice heart, and differentiate into cardiomyocytes. *Cell Transplantation* **13**, 741-748 (2004).
19. Takano, H., *et al.* Effects of G-CSF on left ventricular remodeling and heart failure after acute myocardial infarction. *Journal of molecular medicine* **84**, 185-193 (2006).
20. Khan, M., Manzoor, S., Mohsin, S., Khan, S.N. & Ahmad, F.J. IGF-1 and G-CSF complement each other in BMSC migration towards infarcted myocardium in a novel in vitro model. *Cell Biol Int* **33**, 650-657 (2009).

21. Ripa, R.S. Granulocyte-colony stimulating factor therapy to induce neovascularization in ischemic heart disease. *Dan Med J* **59**, B4411 (2012).
22. Zohlhofer, D., *et al.* Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: a randomized controlled trial. *JAMA* **295**, 1003-1010 (2006).
23. Louzada, R.A., *et al.* Granulocyte-colony stimulating factor treatment of chronic myocardial infarction. *Cardiovasc Drugs Ther* **24**, 121-130 (2010).
24. Reifenberg, K., *et al.* Interferon-gamma induces chronic active myocarditis and cardiomyopathy in transgenic mice. *Am J Pathol* **171**, 463-472 (2007).
25. Manikandan, P., *et al.* Time course studies on the functional evaluation of experimental chronic myocardial infarction in rats. *Mol Cell Biochem* **267**, 47-58 (2004).
26. Mello, P.R., *et al.* Inspiratory muscle training reduces sympathetic nervous activity and improves inspiratory muscle weakness and quality of life in patients with chronic heart failure: a clinical trial. *J Cardiopulm Rehabil Prev* **32**, 255-261 (2012).
27. Pina, I.L. & Daoud, S. Exercise and heart failure. *Minerva Cardioangiol* **52**, 537-546 (2004).
28. Vanzelli, A.S., *et al.* Association of physical training with beta-blockers in heart failure in mice. *Arq Bras Cardiol* **95**, 373-380 (2010).
29. Batten, P., Rosenthal, N.A. & Yacoub, M.H. Immune response to stem cells and strategies to induce tolerance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **362**, 1343-1356 (2007).
30. Gielen, S., *et al.* Anti-inflammatory effects of exercise training in the skeletal muscle of patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* **42**, 861-868 (2003).
31. Toth, M.J., Ades, P.A., Tischler, M.D., Tracy, R.P. & LeWinter, M.M. Immune activation is associated with reduced skeletal muscle mass and physical function in chronic heart failure. *Int J Cardiol* **109**, 179-187 (2006).
32. Schulze, P.C., *et al.* Muscular levels of proinflammatory cytokines correlate with a reduced expression of insulinlike growth factor-I in chronic heart failure. *Basic Res Cardiol* **98**, 267-274 (2003).
33. Batista, M.L., Jr., *et al.* Exercise training changes IL-10/TNF-alpha ratio in the skeletal muscle of post-MI rats. *Cytokine* **49**, 102-108 (2010).
34. Dalla Libera, L., *et al.* Apoptosis in the skeletal muscle of rats with heart failure is associated with increased serum levels of TNF-alpha and sphingosine. *J Mol Cell Cardiol* **33**, 1871-1878 (2001).
35. Torre-Amione, G., *et al.* Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *J Am Coll Cardiol* **27**, 1201-1206 (1996).
36. Janssen, S.P., *et al.* Interleukin-6 causes myocardial failure and skeletal muscle atrophy in rats. *Circulation* **111**, 996-1005 (2005).
37. Haddad, F., Zaldivar, F., Cooper, D.M. & Adams, G.R. IL-6-induced skeletal muscle atrophy. *J Appl Physiol* **98**, 911-917 (2005).
38. Goodman, M.N. Interleukin-6 induces skeletal muscle protein breakdown in rats. *Proc Soc Exp Biol Med* **205**, 182-185 (1994).
39. Welc, S.S. & Clanton, T.L. The regulation of interleukin-6 implicates skeletal muscle as an integrative stress sensor and endocrine organ. *Exp Physiol* **98**, 359-371 (2013).
40. Lafreniere, J.F., Mills, P., Bouchentouf, M. & Tremblay, J.P. Interleukin-4 improves the migration of human myogenic precursor cells in vitro and in vivo. *Exp Cell Res* **312**, 1127-1141 (2006).
41. Horsley, V., Jansen, K.M., Mills, S.T. & Pavlath, G.K. IL-4 acts as a myoblast recruitment factor during mammalian muscle growth. *Cell* **113**, 483-494 (2003).
42. Nelms, K., Keegan, A.D., Zamorano, J., Ryan, J.J. & Paul, W.E. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu Rev Immunol* **17**, 701-738 (1999).

43. Rosa Neto, J.C., *et al.* Acute exhaustive exercise regulates IL-2, IL-4 and MyoD in skeletal muscle but not adipose tissue in rats. *Lipids Health Dis* **10**, 97 (2011).
44. Harrington, D. & Coats, A.J. Skeletal muscle abnormalities and evidence for their role in symptom generation in chronic heart failure. *Eur Heart J* **18**, 1865-1872 (1997).
45. Toth, M.J., Palmer, B.M. & LeWinter, M.M. Effect of heart failure on skeletal muscle myofibrillar protein content, isoform expression and calcium sensitivity. *Int J Cardiol* **107**, 211-219 (2006).
46. Degens, H., *et al.* Changes in contractile properties of skinned single rat soleus and diaphragm fibres after chronic hypoxia. *Pflugers Arch* **460**, 863-873 (2010).

Legends for figures

Table 1: Animals characteristics. Values are means \pm SE. Abbreviations: IBW = initial body weight, FBW = final body weight. * p different from HF+PBS group.

Figure 1: Main changes resulting from the central and peripheral pathophysiology of Heart Failure Syndrome.

Figure 2: Experimental flow chart. Seven days after myocardial infarction (MI) or sham surgery, stem cells (SC) or phosphate buffer solution (PBS) were administrated. The HF+G-CSF and HF+G-CSF receives granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) during five days after. At the end of experiment, was performed functional evaluation and echocardiographic measurements in all groups.

Figure 3: Final velocity reached obtained in progressive test to exhaustion performed after 4 weeks in mice underwent surgery to control and operation of myocardial infarction by ligation of the left coronary artery (MI + PBS). Analysis performed by Student's t test. Data are means \pm SE. * $p = 0.006$ different from Sham and HF+PBS groups.

Figure 4: Maximal distance run obtained in progressive test to exhaustion performed after 4 weeks in mice underwent surgery to control and operation of myocardial infarction by ligation of the left coronary artery (MI + PBS). Analysis performed by Student's t test. Data are means \pm SE. * $p = 0.007$ different from Sham and HF+PBS groups.

Figure 5: Muscle skeletal muscle cytokine frequency of *High* cytokine producers in Control, HF+PBS, HF+G-CSF and HF+G-CSF+SC groups. Low cytokine-producers ($\square <$ global median) and *High* cytokine producers ($\blacksquare \geq$ global median) were tagged for further frequency analysis. Multi-cytokine diagrams were used to quantify the frequency of High cytokine producers for each cytokine in all studied groups. "Cytokine signatures" of heart failure disease induced from coronary artery obstruction was compared with the signature curve model assembled from control group. (*) relevant frequency of *High* cytokine producers considered for values above the 50th percentile.

Figure 6: Diaphragm cytokine frequency of *High* cytokine producers in Control, HF+PBS, HF+G-CSF and HF+G-CSF+SC groups. Low cytokine-producers ($\square <$ global median) and *High* cytokine producers ($\blacksquare \geq$ global median) were tagged for further frequency analysis.

Multi-cytokine diagrams were used to quantify the frequency of High cytokine producers for each cytokine in all studied groups. “Cytokine signatures” of heart failure disease induced from coronary artery obstruction was compared with the signature curve model assembled from control group. (*) relevant frequency of *High* cytokine producers considered for values above the 50th percentile.

Figure 7: Ratio of IL-10 to TNF- α at 4 weeks after myocardial infarction by ELISA in skeletal muscle (A) and diaphragm muscle (B). Values are expressed by MFI \pm SE. Significantly different from HF+G-CSF group.

Table 1 Animals characteristics

	Sham (n= 10)	HF+PBS (n= 11)	HF+G-CSF (n= 9)	HF+G- CSF+SC (n=10)	<i>p</i>
IBW (g)	21.4 ± 2.3	20.8 ± 1.3	20.5 ± 2.7	22.2 ± 1.4	0.3
FBW (g)	23.9 ± 1.9	23.9 ± 1.3	22.1 ± 2.1	24 ± 1.2	0.07
Infarct size (%)	-	27.9 ± 2.4	16.1 ± 1.3*	19.06 ± 6.4*	0.0004
Heart weight (g/g)	2.27 ± 0.2	2.71 ± 0.51	2.52 ± 0.64	2.36 ± 0.52	0.2
Lung weight (g/g)	1.5 ± 0.24	1.79 ± 1.01	1.48 ± 0.37	1.31 ± 0.21	0.2
Liver weight (g/g)	23.9 ± 3.5	22.94 ± 4.2	24.93 ± 7.9	20.34 ± 4.7	0.3
Hamstring weight (g/g)	2.93 ± 0.5	3.06 ± 0.1	2.72 ± 0.69	2.83 ± 0.86	0.5
Diaphragm weight (g/g)	1.85 ± 0.42	1.81 ± 0.53	1.85 ± 0.45	1.89 ± 0.31	0.9

Figure 1

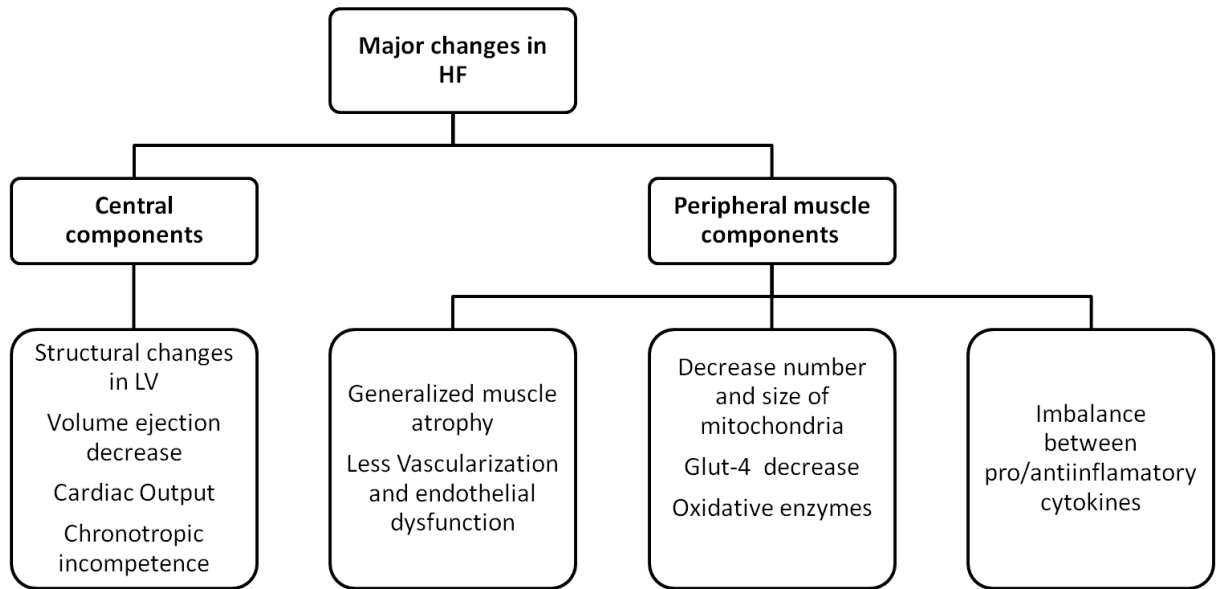


Figure 2

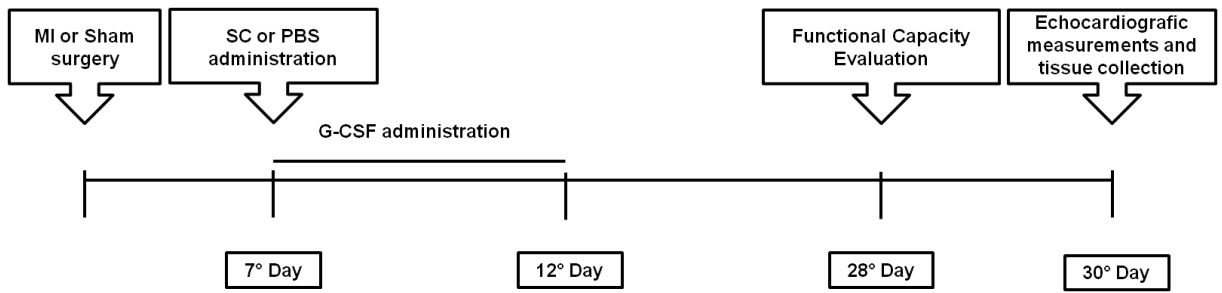


Figure 3

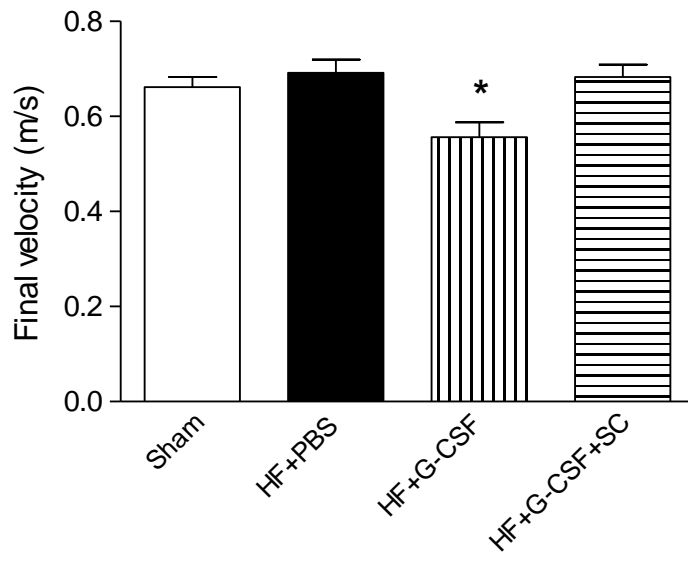


Figure 4

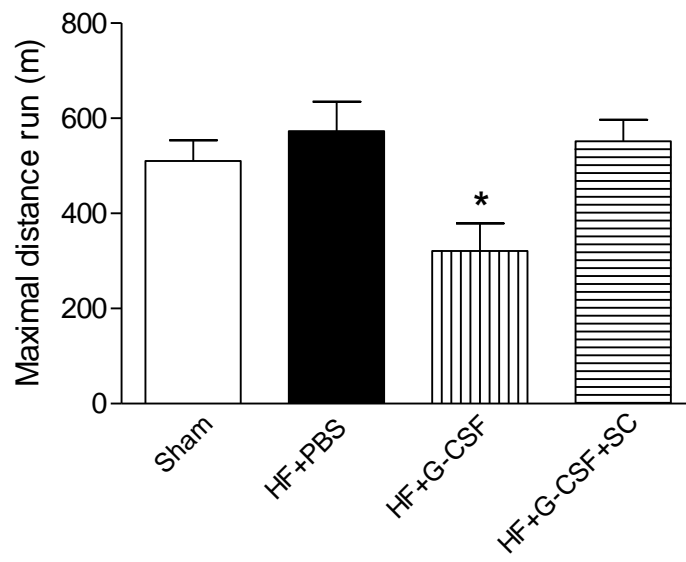


Figure 5

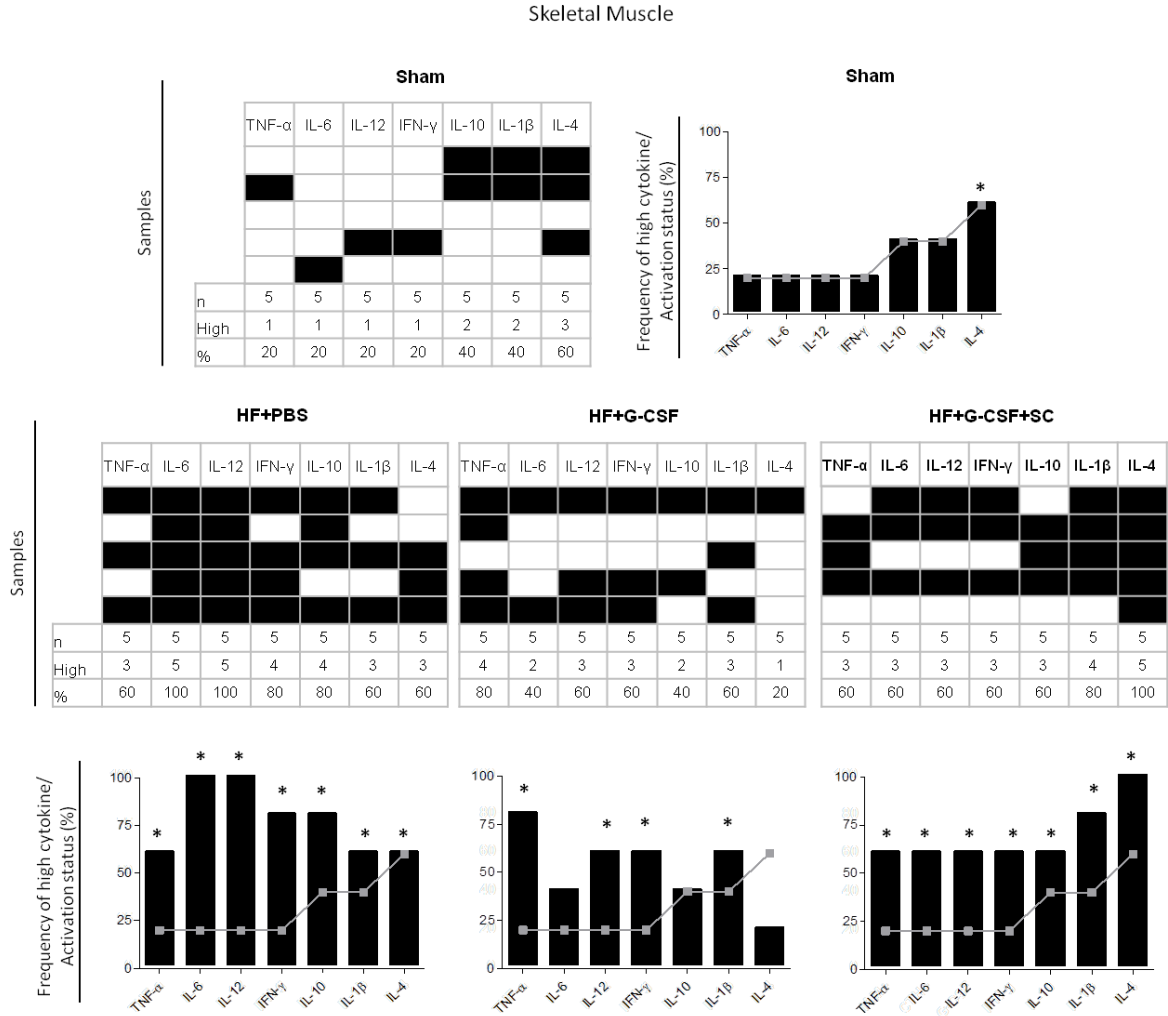


Figura 6

Diaphragm muscle

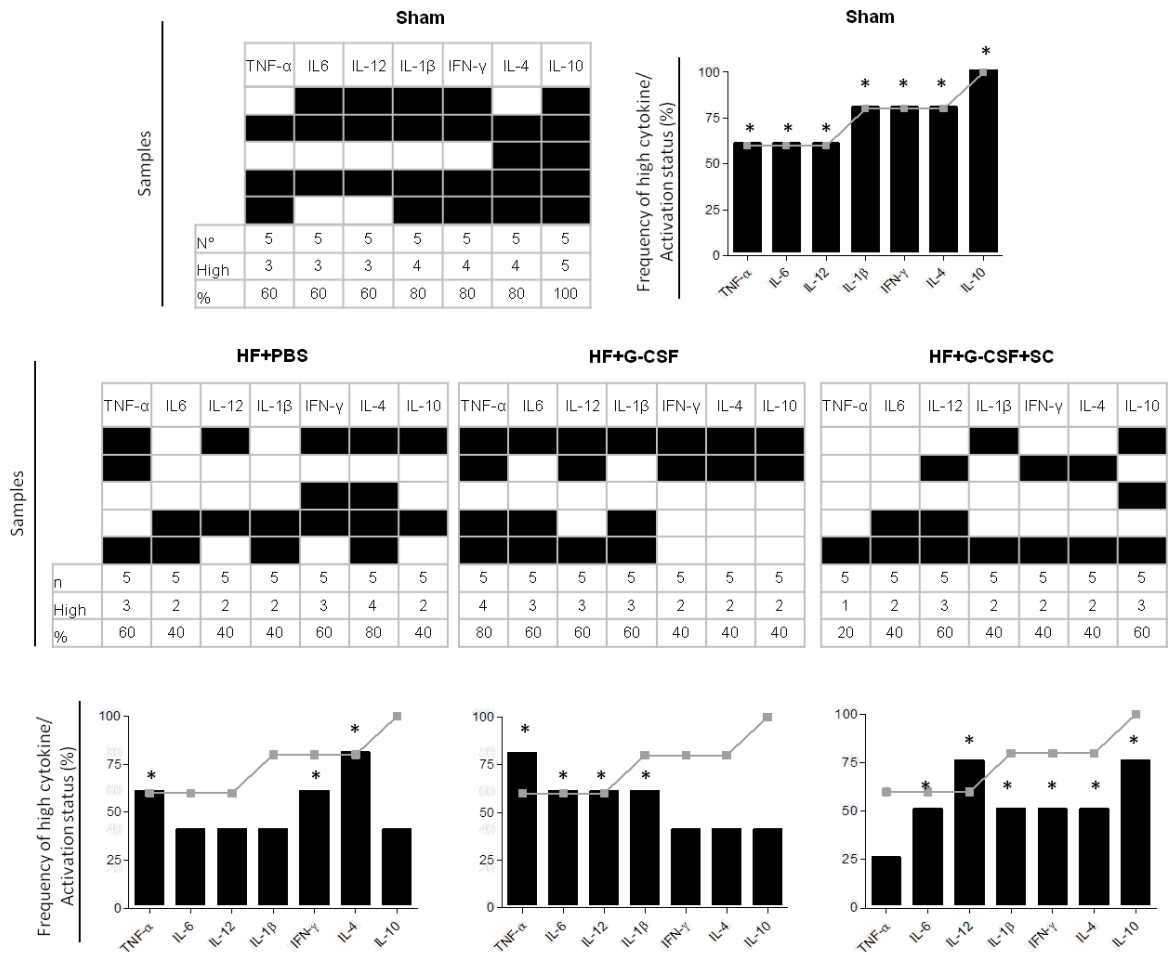


Figura 7

