

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KATHERINE ATHAYDE TEIXEIRA DE CARVALHO

DESENVOLVIMENTO DO BIOPROCESSO DE CO-CULTIVO DE MIOBLASTOS
ESQUELÉTICOS E CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS PARA A
REGENERAÇÃO DO MIOCÁRDIO.
MODELO EM MURINOS

CURITIBA

2006

KATHERINE ATHAYDE TEIXEIRA DE CARVALHO

**DESENVOLVIMENTO DO BIOPROCESSO DE CO-CULTIVO DE MIOBLASTOS
ESQUELÉTICOS E CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS PARA A
REGENERAÇÃO DO MIOCÁRDIO.
MODELO EM MURINOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Divisão de Bioprocessos, do Departamento de Engenharia da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para a obtenção do grau acadêmico de Doutor.

Coordenador: Prof. Doutor Carlos R.Soccol.
Orientador: Prof.Doutor Waldemiro Gremski.
Co-orientador: Prof. Doutor Carlos R.Soccol.

CURITIBA

2006

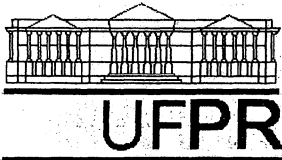
Carvalho, Katherine Athayde Teixeira de
DESENVOLVIMENTO DO BIOPROCESSO DE CO-CULTIVO DE MIOBLASTOS
ESQUELÉTICOS E CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS PARA A REGENERAÇÃO
DO MIOCÁRDIO. MODELO EM MURINOS - Curitiba, 2006.

96 f. : il

Orientador: Professor Doutor. Waldemiro Gremski.

Dissertação (Doutorado)/ Biotecnologia - Divisão de Bioprocessos do Departamento
de Engenharia, Universidade Federal do Paraná.

1. Co-cultivo. 2. Mioblastos esqueléticos. 3. Células-tronco mesenquimais. 4.
Regeneração. 5. Miocárdio.



RELATÓRIO DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO

Aos vinte dias do mês de dezembro de 2006, no Salão Nobre do Prédio da Administração do Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, Jardim das Américas, foi instalada pelo Prof Dr Carlos Ricardo Soccol, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, a banca examinadora para a Quadragésima Sétima Defesa de Tese de Doutorado, área de concentração: Saúde Animal e Humana. Estiveram presentes no Ato, além do Coordenador do Curso de Pós-Graduação, professores, alunos e visitantes.

A Banca Examinadora, atendendo determinação do colegiado do Curso de Doutorado em Processos Biotecnológicos, ficou constituída pelos Professores Doutores Bonald Cavalcanti Figueiredo (UFPR), Carlos Ricardo Soccol (UFPR), Luiz Cesar Guarita-Souza (PUCPR), Nelson Itiro Muyagge (PUCPR e UFPR), Sérgio Almeida de Oliveira (INCOR-USP), Luciana Porto de Souza Vandenberghe (UFPR), Maria de Lourdes Biondo Simões (PUCPR) e Waldemiro Gremski (UFPR – orientador da tese).

Às 14h00, a banca iniciou os trabalhos, convidando a candidata **Katherine Athayde Teixeira de Carvalho** a fazer a apresentação da Tese intitulada: **“Desenvolvimento de Bioprocesso para o Co-Cultivo de Mioblastos Esqueléticos e de Células-Tronco Mesenquimais para a Regeneração do Miocárdio. Modelo em murinos”**. Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de arguição pelos membros participantes.

Tendo em vista a tese e a arguição, a banca composta pelos professores Dr Bonald Cavalcanti Figueiredo, Dr Carlos Ricardo Soccol, Dr Luiz Cesar Guarita-Souza, Dr Nelson Itiro Muyagge, Dr^a Luciana Porto de Souza Vandenberghe, Dr^a Maria de Lourdes Biondo Simões e Dr Waldemiro Gremski, declarou a candidata aprovada (de acordo com a determinação dos Artigos 32/33/34/35 da Resolução 13/96 de 23.07.96).

Curitiba, 20 de dezembro de 2006.

Prof Dr Bonald Cavalcanti Figueiredo

Prof Dr Carlos Ricardo Soccol

Prof Dr Luiz Cesar Guarita-Souza

Prof Dr Nelson Itiro Muyagge

Prof Dr Waldemiro Gremski

Prof^a Dr^a Luciana P S Vandenberghe

Prof^a Dr^a Maria de Lourdes B Simões

Dedico,

aos meus filhos: Paulo, Antonio e Augusto;

ao meu esposo, pela compreensão das horas roubadas de nosso convívio familiar;

à minha mãe, que por toda a minha infância incentivou-me brincadeiras de cientista.

Ofereço,

àqueles que, me comoveram com o seu sofrimento, com a sua angústia e que com sua fé e esperança me incentivaram a pesquisa terapêutica;

àqueles que possam se beneficiar e aliviar os seus sintomas de cansaço e fadiga da insuficiência cardíaca com o tratamento fruto dessa pesquisa.

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Waldemiro Gremski, por todos os estímulos e manutenção de minhas atividades de pesquisa e particularmente e em especial pela orientação e amizade.

À Professora Doutora Luciana Porto de Souza Wandenberghe, vice-coordenadora da Pós-Graduação Divisão Bioprocessos do Departamento de Engenharia da Universidade Federal do Paraná, por ter me acolhido no último instante da inscrição para o concurso desta Pós-Graduação.

Ao Professor Doutor Carlos Ricardo Soccol, co-orientador, coordenador da Pós-Graduação Divisão Bioprocessos do Departamento de Engenharia da Universidade Federal do Paraná, por oferecer um curso de alto nível profissional e pelo cumprimento da excelência da qualidade.

Ao Professor Doutor Luiz César Guarita-Souza pela grande contribuição aos nossos resultados dessa dissertação e a hombridade de suas atitudes em momentos tão difíceis e companheirismo.

Ao Doutor Márcio Scorsin por ter me retornado a minha vocação de pesquisadora, na área de pesquisa biotecnológica aplicada à Medicina.

Ao Júlio César Francisco pelo grande empenho, disposição incomum e paciência nas etapas deste projeto, que envolveram atividades no Laboratório Experimental de Cultivo Celular, Técnica Operatória, Laboratório de Patologia Experimental e Biotério.

Ao Professor Fernando Hintz Greca, pela disponibilização do Laboratório de Técnica Operatória.

Ao Professor Doutor Nelson Itiro Myiague, pela sua disposição e inestimável colaboração na realização dos exames ecocardiográficos.

Às amigas e co-orientadas: Rossana Baggio Simeoni, Leila de Oliveira e Camila Capucho Cury pelo estímulo à pesquisa e contribuição no levantamento bibliográfico.

Às biólogas Carmen Lúcia Kunioshi Rebellato e Paula Hansen pelo auxílio técnico prestado nos cultivos celulares.

À Ana Paula Camargo Martins, em especial pela dedicação e empenho nos cortes histológicos.

À Professora Márcia Olandoski, pela sua inegável disposição para as análises estatísticas e discussões valorosas.

Ao Professor Dr. Alberto Accioly Veiga que, na qualidade de Decano e na direção do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde e do Instituto de Ciências Biológicas da PUCPR, permitiu e tornou possível a pesquisa neste domínio.

Aos queridos colegas da Pós-Graduação da UFPR pelo convívio agradável e salutar nas descobertas do conhecimento.

Àqueles que dificultaram a progressão dessa pesquisa e que por mecanismos alheios ao racional, me estimularam a dar continuidade.

Às Capes e ao SETI-PR pelo financiamento dessa dissertação como fruto da pesquisa incentivada por estas instituições.

À Brenda Folly pela arte final.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE QUADROS.....	xiii
GLOSSÁRIO.....	xv
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 FORMULAÇÃO DO PROBLEMA.....	6
1.2 OBJETIVOS DO TRABALHO.....	7
1.2.1 Objetivos Gerais.....	7
1.2.2 Objetivos Específicos.....	7
1.2.2.1 Desenvolver o Co-cultivo de CTME e de ME.....	8
1.2.2.2 Comparar com outros modelos.....	8
1.2.2.3 Validar.....	8
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	8
2.1 TERAPIA CELULAR.....	8
2.2 TIPOS CELULARES.....	11
2.2.1 Células-tronco.....	11
2.2.1.1 Células-tronco adultas.....	12
2.2.2 Células satélites.....	14

2.2.3 Células progenitoras endoteliais.....	16
2.2.4 Células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea.....	17
2.2.5 Outros tipos celulares.....	19
2.3 CARDIOMIOPLASTIA.....	21
2.3.1Terapia celular e gênica para angiogênese.....	21
2.3.2 Terapia celular para a miogênese.....	26
2.3.2.1 Transplante de fibroblastos.....	26
2.3.2.2 Transplante de células cardíacas adultas.....	27
2.3.2.3 Transplante de células cardíacas fetais.....	29
2.3.2.4 Transplante de células musculares esqueléticas.....	30
2.3.2.5 Transplante de células musculares lisas.....	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1 AMOSTRA.....	34
3.2 CUIDADOS GERAIS PARA OS ANIMAIS.....	35
3.2.1 Condições do biotério.....	35
3.2.2 Condições de laboratório.....	36
3.2.3 Pesagem.....	36
3.2.4 Anestesia.....	36
3.2.5 Ventilação mecânica.....	37
3.2.6 Materiais operatórios.....	38
3.2.7 Eutanásia.....	38
3.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS- PRIMEIRA FASE.....	38
3.3.1 Delineamento do estudo da primeira fase.....	38
3.3.2 Isolamento de ME (bio-separação).....	39

3.3.2.1 Detalhamento do método de isolamento de ME.....	40
3.3.3 Viabilidade celular.....	41
3.3.4 Isolamento de CT mononucleares (bio-separação).....	42
3.3.4.1 Detalhamento do método de isolamento das CT mononucleares.....	44
3.3.5 Bioprocesso de co-cultivo.....	45
3.3.6 Manutenção do co-cultivo.....	46
3 3.7 Recuperação do Bioproduto.....	47
3.4 RESÍDUOS.....	48
3.4.1 Resíduos do bioprocesso-classificação.....	48
3.4.2 Resíduos do isolamento de células-tronco mononucleares.....	48
3.4.3 Resíduos do isolamento de células satélites.....	48
3.4.4 Da manutenção e subcultivos.....	49
3.4.5 Recuperação do bioproduto.....	49
3.5 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA.....	49
3.5.1 Concentração celular.....	49
3.6 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS DA SEGUNDA FASE.....	50
3.6.1 Delineamento do estudo da segunda fase.....	50
3.6.2 Isolamentos de células satélites (bio-separação).....	50
3.6.3 Cultivos de mioblastos esqueléticos.....	50
3.6.4 Manutenção do cultivo de mioblastos esqueléticos	51
3.6.5 Isolamentos de células-tronco mononucleares (bio-separação).....	51
3.6.6 Identificação celular	51
3.6.7 Viabilidade celular.....	51

3.6.8 Cultivos de CTME.....	52
3.6.9 Manutenção do cultivo de CTME.....	52
3.6.10 Identificação celular.....	53
3.6.11 Recuperação do Bioproduto.....	53
3.6.12 Bioprocesso do co-cultivo de CTME e do ME.....	53
3.6.13 Manutenção do co-cultivo.....	54
3.6.14 Recuperação do Bioproduto.....	54
3.6.15 Procedimento indução do infarto do miocárdio.....	54
3.6.16 Procedimento de avaliação ecocardiográfica.....	54
3.6.17 Procedimento de transplantes.....	56
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	56
3.8 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA APÓS OS TRANSPLANTES.....	57
3.9 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS DA TERCEIRA FASE.....	58
3.9.1 Delineamento do estudo da terceira fase.....	58
3.9.2 Bioprocesso do Co-cultivo de ME e CTME.....	58
3.9.3 Manutenção do Co-cultivo.....	59
3.9.4 Viabilidade Celular.....	59
3.9.5 Recuperação do Bioproduto.....	59
3.9.6 Procedimento de Indução da Miocardiopatia Chagásica.....	59
3.9.6.1 Inoculação de <i>Trypanosoma cruzi</i>	59
3.9.7 Procedimento de avaliação ecocardiográfica.....	60
3.9.8 Procedimentos de transplante.....	60
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	60
3.11 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA APÓS OS TRANSPLANTES.....	60

4. RESULTADOS	60
4.1 RESULTADOS PRIMEIRA FASE	60
4.1.1 Análise Morfológica.....	60
4.1.2 Análise Quantitativa.....	61
4.1.3 Viabilidade.....	61
4.2 RESULTADOS DA SEGUNDA FASE	62
4.2.1 Resultados funcionais por ecocardiografia.....	62
4.2.2 Resultados do estudo imunocitoquímico.....	66
4.2.3 Resultados do estudo histopatológico.....	66
4.3 RESULTADOS DA TERCEIRA FASE	70
4.3.1 Resultados funcionais por ecocardiografia.....	70
4.3.2 Resultados do estudo histopatológico.....	74
5. CONCLUSÕES	78
5.1 CONCLUSÃO DA PRIMEIRA FASE.....	78
5.2 CONCLUSÃO DA SEGUNDA FASE.....	78
5.2.1 Avaliação Funcional.....	78
5.2.2 Avaliação Histopatológica.....	78
5.3 CONCLUSÃO DA TERCEIRA FASE.....	78
5.3.1 Avaliação Funcional.....	78
5.3.2 Avaliação Histopatológica.....	79
5.4 CONCLUSÃO GERAL.....	79
6. DISCUSSÕES	79
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	85
REFERÊNCIAS	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Diferenciação das CTME derivadas da medula óssea.....	17
Figura 02	Respirador de volume.....	37
Figura 03	Animal com tubo endotraqueal conectado ao sistema de ventilação mecânica.....	38
Figura 04	Membros dos animais recém-nascidos para a realização da retirada de fragmentos musculares.....	40
Figura 05	Maceração muscular.....	41
Figura 06	Macerado muscular diluído em colagenase.....	42
Figura 07	A. Fêmures dispostos em placa de petri. B. Lavagem do fêmur com heparina.....	43
Figura 08	Punção-aspiração do sangue da medula óssea.....	43
Figura 09	CTME <i>in vitro</i> identificadas a sua origem mesenquimal com o auxílio de anticorpo anti-vimentina, 100x.....	44
Figura 10	Anel formado de células-tronco mononucleares.....	45
Figura 11	Co-cultivo de ME e CTME após 14 dias de semeadura.....	47
Figura 12	ME identificados com anticorpo antimiosina rápida no co-cultivo de ME e CTME em 14 dias, 400x (FITC.).....	47
Figura 13	CTME derivadas da MO em cultivo por 14 dias.....	53
Figura 14	Ecocardiógrafo bidimensional para animais de pequeno porte.....	55
Figura 15	Transdutor sobre o tórax do animal.....	56
Figura 16	Exposição do coração para o procedimento (A) e aspecto esbranquiçado do mesmo após a ligadura da coronária esquerda (B).....	57
Figura 17	Os quatro cortes coronais dividindo o coração em quatro cortes (base, médio proximal, médio distal e ápex).....	58

Figura 18	Angiogênese e miogênese na cicatriz da miocardiopatia isquêmica crônica após o Transplante de Co-cultivo de ME e CTME. Tricrômio de Gomori, 400x.....	67
Figura 19	Angiogênese e miogênese na cicatriz da miocardiopatia isquêmica crônica após o Transplante de Co-cultivo de ME e CTME. Tricrômio de Gomori, 100x.....	67
Figura 20	Miogênese na cicatriz da miocardiopatia isquêmica crônica após o Transplante de ME. H&E, 40x.....	68
Figura 21	Miogênese na cicatriz da miocardiopatia isquêmica crônica após o Transplante de ME. H&E, 100x.....	68
Figura 22	Cicatriz vascular na miocardiopatia isquêmica crônica (área do infarto). Tricrômio de Gomori, 100x.....	69
Figura 23	Miocárdio normal. Tricrômio de Gomori, 100x.....	69
Figura 24	Angiogênese na cicatriz da miocardiopatia isquêmica crônica após o Transplante de CTME. Tricrômio de Gomori, 40x.....	70
Figura 25	Fração de Ejeção Ventricular Esquerda antes (pré) e após (pós) o transplante celular dentro dos grupos Controle e Co-cultivo na Miocardiopatia Chagásica.....	72
Figura 26	Volume sistólico final do Ventrículo esquerdo antes (pré) e após (pós) o transplante celular dentro dos grupos Controle e Co-cultivo na Miocardiopatia Chagásica.....	73
Figura 27	Volume diastólico final do Ventrículo esquerdo Antes (pré) e após (pós) o transplante celular dentro dos grupos Controle e Co-cultivo na Miocardiopatia Chagásica.....	74
Figura 28	Angiogênese após transplante de co-cultivo de ME e CTME na miocardiopatia Chagásica. H&E, 1000x.....	75
Figura 29	Miogênese e angiogênese após o transplante de co-cultivo de ME e CTME na Miocardiopatia Chagásica. H&E, 100x.....	75
Figura 30	Miogênese após o transplante de co-cultivo de ME e CTME na Miocardiopatia Chagásica. H&E, 1000x.....	76
Figura 31	Miocardiopatia Chagásica após o transplante de meio, sem células (grupo controle): Desorganização da citoarquitetura do miocárdio, corte longitudinal. H&E, 400x.....	76

Figura 32	Miocardiompatia Chagásica após o transplante de meio, sem células (grupo controle), corte transversal: anticorpo anti-fator VIII, controle negativo. Imunoperoxidase, 100x.....	77
Figura 33	Miocardiompatia Chagásica após o transplante de co-cultivo, corte transversal: demonstrando positividade para o anticorpo anti-fator VIII. Imunoperoxidase, 1000x.....	77
Figura 34	Aprovação para a Fase I de Pesquisa Experimental Humana.....	85

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- CONCENTRAÇÃO CELULAR&ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO DO CO-CULTIVO DE MIOBLASTOS ESQUELÉTICOS E CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS.....	62
---	----

LISTA DE QUADROS

QUADRO 01- CONCENTRAÇÃO CELULAR DURANTE O CO-CULTIVO DE MIOBLASTOS ESQUELÉTICOS E CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS.....	61
QUADRO 02- AVALIAÇÃO FUNCIONAL ECOCARDIOGRÁFICA. ANÁLISES: BASAL E APÓS UM MÊS DA FRAÇÃO DE EJEÇÃO DO VENTRÍCULO ESQUERDO.....	63
QUADRO 03- AVALIAÇÃO FUNCIONAL ECOCARDIOGRÁFICA – COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS DA FRAÇÃO DE EJEÇÃO DO VENTRÍCULO ESQUERDO.....	63
QUADRO 04- AVALIAÇÃO FUNCIONAL ECOCARDIOGRÁFICA. ANÁLISES: BASAL E APÓS UM MÊS DO VOLUME DIASTÓLICO DO VENTRÍCULO ESQUERDO	64
QUADRO 05- AVALIAÇÃO FUNCIONAL ECOCARDIOGRÁFICA – COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS DO VOLUME DIASTÓLICO FINAL DO VENTRÍCULO ESQUERDO.....	64
QUADRO 06- AVALIAÇÃO FUNCIONAL ECOCARDIOGRÁFICA - RESULTADOS APÓS UM MÊS DA FRAÇÃO DE EJEÇÃO DO VENTRÍCULO ESQUERDO.....	65
QUADRO 07- AVALIAÇÃO FUNCIONAL ECOCARDIOGRÁFICA - COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS DA FRAÇÃO DE EJEÇÃO DO VENTRÍCULO ESQUERDO	65
QUADRO 08- AVALIAÇÃO FUNCIONAL ECOCARDIOGRÁFICA, ANTES E APÓS O TRANSPLANTE CELULAR DENTRO DOS GRUPOS CONTROLE E CO-CULTIVO NA MIOCARDIOPATIA CHAGÁSICA.....	71
QUADRO 09 - AVALIAÇÃO FUNCIONAL ECOCARDIOGRÁFICA DO VOLUME DIASTÓLICO VENTRICULAR ESQUERDO. ANTES E APÓS O TRANSPLANTE CELULAR ENTRE OS GRUPOS CONTROLE E CO-CULTIVO NA MIOCARDIOPATIA CHAGÁSICA.....	71

QUADRO 10 - AVALIAÇÃO FUNCIONAL ECOCARDIOGRÁFICA APÓS UM MÊS DE EVOLUÇÃO - COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS, ANTES E APÓS O TRANSPLANTE, NA MIOCARDIOPATIA CHAGÁSICA.....	72
--	----

GLOSSÁRIO

Blastocisto: o blastocisto consiste em uma esfera composta de camadas de células (trofoderma), uma cavidade repleta de fluido (blastocelo) e um conjunto de células no interior (massa celular interior). Pré-implantação de embrião de 30-150 células.

CD: *cluster of differentiation* - sistema de nomenclatura uniforme. De acordo com este sistema, um marcador de superfície celular que identifique uma linhagem ou um estágio particular, que tenha uma estrutura definida e que seja reconhecido por um grupo de anticorpos monoclonais, é designado como um membro do grupo de diferenciação.

Célula-tronco: células primitivas que possuem a capacidade de autorenovação e a habilidade para se diferenciar em múltiplos tipos celulares.

Células-tronco embrionárias: células pluripotentes derivadas da massa celular interior do blastocisto; dão origem às células das três camadas germinais.

Células-tronco adultas: presentes em todos os tecidos com renovação, estas células se dividem para auto-renovação e diferenciação em múltiplos tipos celulares progenitores.

Células-tronco hematopoéticas: células precursoras adultas raras, presentes no sangue periférico e medula óssea, dão origem a várias populações distintas de células progenitoras formadoras das células sanguíneas.

Células progenitoras: células precursoras multipotenciais intermediárias para células maduras tecido-específicas.

Células progenitoras endoteliais: células que estão presentes no sangue periférico e medula óssea; estão envolvidas na angiogênese e neovascularização pós-natal.

Células-tronco mesenquimais: Também referidas como células estromais da medula, estas células se diferenciam *in vitro* seguindo múltiplos passos que incluem a miogênese cardíaca.

Células RS: *Recycling Stem cells*. Sub-população de células pequenas, agranulares, presentes em cultivo de células-tronco mesenquimais.

Células SP: *Side Population cells*. População lateral de células, que se apresentam negativas com o corante Hoechst, específico para identificar células-tronco hematopoéticas.

Citoquinas: termo genérico utilizado para uma grande variedade de proteínas regulatórias, produzidas e secretadas por células e usadas para comunicação com

outras células. Uma classe de citocinas são as interleucinas, as quais são mediadores intracelulares na geração de respostas imunes.

Fibroblastos: células que originam tecido conjuntivo.

Gap junction: comunicação célula-célula para permitir a passagem de íons e outras moléculas pequenas, do citoplasma de uma célula para o citoplasma da outra, através de poros proteicos intercelulares. .

Imunofenotipagem: identificação de vários tipos de células por separação de acordo com a identificação de seus marcadores de superfície celular.

Marcador de superfície: proteínas de superfície que são únicas para determinados tipos celulares, capazes de detectá-los por anticorpos ou outros métodos de detecção.

Medula óssea: tecido que preenche a maioria das cavidades ósseas e contém células precursoras hematopoéticas, das quais evoluem as células sanguíneas (leucócitos, eritrócitos e plaquetas). A medula óssea também contém células precursoras mesenquimais.

Transplante alogênico: dois ou mais indivíduos (ou linhagens celulares) são ditos alogênicos quando os genes de um ou mais loci não são idênticos em sequência no mesmo organismo.

Transplante autólogo: o tecido transplantado origina-se de receptor do transplante. Tais transplantes evitam complicações de rejeição imune.

Plasticidade: a capacidade de células precursoras adultas que, presentes em um tecido, diferenciam-se em células maduras de outro tecido, não-relacionado.

FACS: *fluorescence activated cell sorting*. Fundamento da tecnologia do citômetro de fluxo: fazer passar células ou outras partículas em suspensão, alinhadas, por uma fonte de luz, realizando uma análise multiparamétrica, incluindo uma separação física de uma população previamente determinada, se o aparelho possuir funções separadoras (sorting).

RESUMO

No infarto do miocárdio e na doença de Chagas existem alguns mecanismos fisiopatológicos em comum: perda de cardiomiócitos devido à isquemia, à redução da contratilidade e à disfunção cardíaca. A terapia celular vem propondo o tratamento para a falência cardíaca usando vários tipos celulares. **Objetivos:** Desenvolver e avaliar o método de co-cultivo de mioblastos esqueléticos e células-tronco mesenquimais para a terapia celular no infarto do miocárdio (IM) e na doença de Chagas (DC). **Materiais e métodos:** IM- 39 ratos completaram o estudo após um mês, 17 ratos receberam a terapia com o produto celular do co-cultivo e 22 ratos, receberam apenas meio na cicatriz. Na DC- 15 ratos completaram o estudo após um mês, 07 ratos receberam o produto celular de co-cultivos autólogos e 08 receberam apenas o meio. Todos os animais realizaram ecocardiograma antes e após um mês de terapia. Os parâmetros analisados foram: fração de ejeção ventricular esquerda (FEVE); volume sistólico e diastólico finais. A análise estatística pela ANOVA. O co-cultivo de mioblastos esqueléticos e células-tronco mesenquimais mantido por um período de 14 dias (DMEN, 15% SFB, 1% Antibiótico, IGF-I e dexametasona). Análises histológicas, de rotinas, foram realizadas. **Resultados:** Entre as provas funcionais verificou-se no grupo IM FEVE, nos animais, que receberam células do co-cultivo de $23,52 \pm 8,67$ a $31,45 \pm 8,87$ ($p=0,006$) e no grupo $26,68 \pm 6,92$ a $22,32 \pm 6,94$ ($p=0,004$) e no grupo DC FEVE, nos animais que receberam células do co-cultivo de $31,10 \pm 5,78$ a $53,37 \pm 5,84$ ($p<0,001$) e no grupo controle, $36,21 \pm 3,70$ a $38,19 \pm 7,03$ ($p= 0,426$). O exame histológico revelou, nos modelos de miocardiopatia estudados, miogênese e angiogênese naqueles animais, que receberam o produto celular de co-cultivo. **Conclusão:** Estes resultados validam o produto celular do co-cultivo de mioblastos esqueléticos e de células-tronco mesenquimais para o tratamento dessas duas doenças.

DESCRITORES: Células musculares esqueléticas, células-tronco, regeneração, miocárdio.

ABSTRACT

In myocardial infarction and Chagas's disease some physiopathological aspects are common: cardiomyocyte loss due to ischemia leads to a reduction of contractility and heart function. Cell therapy has been proposed for the treatment of heart failure through transplant of various cells types. **Objective:** To develop and to evaluate the method of co-culture of skeletal muscle (SM) and mesenchymal stem cells (MSC) for cell therapy of heart failure in Myocardial Chagas's disease (MCD) and myocardial post-infarction (MI). **Materials and methods:** MI- 39 rats completed the study at one month. 17 rats received co-cultured cell therapy and 22 rats, only medium in the scar. MCD- 15 rats completed the study at one month. 7 rats received autogenous co-culture cell therapy and 8 animals received only medium. All animals underwent ecocardiographic analysis at baseline and one month. The measures of Left Ventricular Ejection Fraction (LVEF), Left Ventricular End Systolic and Dyastolic Volume were registered and analyzed by ANOVA. The co-culture method of SM and MSC cells was performed at 14 days (medium culture: DMEN, with 15% FCS and 1% Antibiotic, IGF-I and dexamethasone). Standard stain analysis was done in the cells and tissue. **Functional Results:** MI- LVEF in the animals that had received the co-cultured cells: $23,52 \pm 8,67$ to $31,45 \pm 8,87$ $p=0,006$ versus control group: $26,68 \pm 6,92$ to $22,32 \pm 6,94$ $p=0,004$ and MCD- LVEF in animals that received the co-cultured cells: $31,10 \pm 5,78$ to $53,37 \pm 5,84$ $p<0,001$ versus control group: $36,21 \pm 3,70$ to $38,19 \pm 7,03$ $p= 0,426$. **Histopathological Results:** In both experimental model diseases, the analysis of the animals receiving co-cultured cells demonstrated a presence of myogenesis and angiogenesis. **Conclusion:** The results validate the product of the SM and MSC co-culture process for treatment in these diseases.

KEY WORDS: Skeletal muscle cells, stem cell, regeneration, myocardium.

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardíacas são importante causa de morbi-mortalidade, havendo milhões de pessoas portadoras de insuficiência cardíaca (IC) crônica no mundo. A IC de causa isquêmica a mais prevalente, constituindo um grande problema de saúde pública. Com o aumento da longevidade da população, a expectativa é de que as doenças cardiovasculares tornem-se dominantes neste século. É estimado no Brasil que, 350.000 pacientes sofram infarto agudo do miocárdio ao ano (ARAÚJO et al, 2005).

Outra doença que apresenta grande impacto no Brasil, como causa de insuficiência cardíaca é a doença de Chagas, particularmente afetando indivíduos adultos jovens na fase produtiva da vida. A doença de Chagas afeta 16 milhões de pessoas em toda a América Latina, sendo seis milhões no Brasil. É uma doença que não tem cura e evolui, em 30% dos casos, para a forma cardíaca da doença que, normalmente aparece 20 anos após a contaminação com o *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) (IANNI; MADY, 1998).

Os atuais tratamentos complementares ao tratamento clínico, como padrão-ouro, da IC tais como: a cardiomioplastia, o transplante cardíaco, as várias modalidades de marcapasso e os dispositivos mecânicos de assistência ventricular ainda não são estabelecidos como procedimento padrão para o tratamento da IC, cada um deles apresentando seus próprios inconvenientes.

Apenas o transplante cardíaco, de órgão total é uma técnica capaz de recuperar a função ventricular esquerda e tratar a causa básica: perda do cardiomiócito e suas conseqüentes perdas da contratilidade e da função do miocárdio. Este apresenta várias dificuldades: número limitado de doadores, incompatibilidade de doadores, riscos inerentes de rejeição e os efeitos adversos do uso de imunossupressores. Surge, portanto, campo para a pesquisa e aplicação de técnicas alternativas.

No Brasil, confirmou-se no primeiro semestre de 2006, a tendência de diminuição ou na melhor das hipóteses, de estagnação da taxa de doadores efetivos e uma conseqüente diminuição dos transplantes cardíacos na maioria dos estados, tornando imperativa a necessidade de medidas organizacionais e educacionais. No

primeiro semestre de 2006, havia 240 pacientes em lista de espera (1,5 por milhão) para transplante do coração no Brasil, pois há dificuldades de doadores. O estado do Paraná possui um dos maiores números de pessoas nesta lista: 70 pacientes (7.3 por milhão de população) perdendo apenas para São Paulo: 98 pacientes (2,7 por milhão de população), dados de Janeiro/ Junho de 2006 do Registro Brasileiro de Transplantes (RBT- ABTO, 2006).

As duas principais doenças que causam a IC no Brasil são a cardiomiopatia Isquêmica e a doença de Chagas. Essas doenças apresentam mecanismos fisiopatológicos em comum: diminuição do suprimento vascular, necrose, perda de cardiomiócitos e fibrose, tendo como conseqüências a diminuição da contratilidade e a disfunção cardíaca. No infarto do miocárdio há perda do suprimento vascular cardíaco, levando à necrose celular, perdas dos cardiomiócitos, sendo estes substituídos por tecido fibrótico, não contrátil (ROSSI; BESTETTI, 1995). Na doença de Chagas, as alterações na microvasculatura precedem e podem ser um dos mecanismos patogênicos do subseqüente dano do miocárdio. A infecção pelo *T. Cruzi* provoca uma vasculite generalizada, com a presença de vasoespasmo, redução do fluxo sangüíneo, isquemia focal, trombose, aumento da agregação plaquetária e elevados níveis de tromboxano A2 e endotelina-1 (BOCCHI et al,1996). A infecção das células endoteliais por parasitas aumenta as sínteses de endotelinas-1 e biologicamente ativas, as quais participam do vasoespasmo da microcirculação coronariana (MACHADO et al, 2000).

O principal objetivo do tratamento, durante um infarto agudo do miocárdio, é restabelecer a perfusão e a recuperação do tecido o mais rápido possível. Se a reperfusão não fôr obtida da forma adequada, ocorrerá perda de cardiomiócitos e eventualmente, disfunção sistólica ventricular esquerda, remodelamento ventricular e IC congestiva, elevação dos estresses: sistólico e diastólico, liberação de mediadores e neuro-hormônios deletérios (WOLLERT; DREXLER, 2005).

Apesar de técnicas mecânicas e farmacológicas de revascularização, não há terapia efetiva que restaure a região infartada do miocárdio (cicatriz miocárdica) tornando-a tecido funcional e viável. Os tratamentos cirúrgicos visam à recuperação da função ventricular esquerda por meio da reconstrução geométrica do coração para sua forma elíptica, o que pode favorecer a melhora de sua função, porém

existem algumas limitações inerentes ao procedimento, além de não tratar a causa básica, a perda dos cardiomiócitos adultos. Deve-se considerar também o fato de que este tipo de tratamento não pode ser proposto a todos os potenciais candidatos (PRÓSPER et al, 2003; SCORCIN; GUARITA-SOUZA, 2001; AL ATTAR et al, 2002).

Já no tratamento da miocardiopatia chagásica, os tratamentos se restringem aos procedimentos farmacológicos e aos implantes de marcapassos.

O desenvolvimento de novas e efetivas opções de tratamento para pacientes portadores de IC congestiva é imperativo, dado o aumento de sua prevalência e seu impacto sócio-econômico na saúde mundial (PERIN et al, 2003a).

O dogma de que o coração é um órgão pós-mitótico diferenciado, incapaz de auto-regeneração, foi descartado. Estudos recentes demonstraram a proliferação de cardiomiócitos, onde células precursoras musculares quiescentes foram ativadas, proliferaram, diferenciaram-se em novos cardiomiócitos que, diferenciados e maduros, foram capazes de formar fibras musculares funcionais (FUKUDA, 2001; LEE et al, 2004).

Porém, esta capacidade regenerativa é limitada para recuperar a área lesada. Também a angiogênese normal é insuficiente para suprir a grande demanda por oxigênio e nutrientes e para prevenir a apoptose de cardiomiócitos hipertrofiados e o remodelamento ventricular (QU-PETERSEN et al , 2002; BIANCO et al, 2001).

Estudos pré-clínicos, em modelo animal, sugeriram que a transferência de células-tronco aumentou a regeneração miocárdica e a neovascularização após infarto do miocárdio (BOHELER et al, 2002).

Baseado neste estudo e no reconhecimento da plasticidade de células-tronco adultas (diferenciação em tipos celulares não relacionados ao tecido de origem) tem sido proposta a utilização dessas células para regeneração miocárdica em pacientes com infarto do miocárdio e diversas outras cardiopatias, já que possuem capacidade de proliferação, auto-regeneração e diferenciação em tecidos e órgãos especializados, eventualmente em cardiomiócitos (KAWADA; OGAWA, 2001; MCKINNEY-FREEMAN et al, 2002; PENN et al, 2002).

Sob análise funcional, os requisitos fundamentais para que as células possam ser enxertadas são: a capacidade proliferativa, a integração anatômica destas

células ao miocárdio, o restabelecimento da angiogênese, a diferenciação em cardiomiócitos, criando um acoplamento eletromecânico com o tecido miocárdico circundante e conseqüente melhora da função cardíaca (PERIN et al, 2003b; YANNAKI; PAPAYANNOPOULOU, 2001; SOLTER; GEAHART, 1999).

Diferentes tipos celulares podem ser utilizados para a regeneração do miocárdio. Técnicas para coleta, isolamento e expansão também têm sido exploradas. Entre as células doadoras em potencial, encontramos cardiomiócitos fetais, cuja vantagem é sua identidade imunofenotípica com o cardiomiócito, porém com as desvantagens de requererem imunossupressão, possuírem curta sobrevivência, limitado suprimento e questões de ordem ética (PENN et al, 2002).

Com base em evidências experimentais, observou-se que, vários tipos de células-tronco poderiam ter funções terapêuticas. Estas incluem células-tronco adultas: fração de células mononucleares de medula óssea, células progenitoras endoteliais e células-tronco mesenquimais (CTME) derivadas da medula óssea (MO), entre outras. Já, as células-tronco embrionárias (CTE), derivadas do blastocisto, estão envolvidas em problemas éticos, embora tenham a vantagem de serem totipotentes e altamente expansíveis. Apesar das células-tronco embrionárias exibirem maior potencialidade para a diferenciação em cardiomiócitos, sua utilização tem se restringido mais ao campo da experimentação animal em virtude do inerente componente imunogenético, além da maior tendência a causar arritmias e gerar tumores. A seleção de um tipo celular específico requer tecnologias altamente sofisticadas (AL ATTAR et al, 2002; PERIN et al, 2003b; KAWADA; OGAWA, 2001; HESCHELER; FLEISCHMANN, 2001; KUEHNLE; GOODELL, 2002; CHACHQUES et al, 2004a).

As CTME derivadas da MO de adulto também estão sendo estudadas e possuem vantagens como a de possuir baixa imunogenicidade, pluripotência, praticidade de isolamento, purificação, expansão *in vitro* e a possibilidade de criopreservação para seu uso *à posteriori*. Sua desvantagem reside no fato das propriedades eletrofisiológicas e funcionais não estarem completamente conhecidas (PRÓSPER et al, 2003; LAW et al, 2004).

Outro tipo celular em estudo é a célula satélite (precursora de mioblasto esquelético), que possui as vantagens de permitir o transplante autólogo, apresentar

resistência à isquemia e ter alto potencial para divisão em cultivo, além de seu fácil acesso. Suas desvantagens, até o momento, são as possíveis presenças de arritmias ventriculares após transplante, ausência de *gap junction* (comunicação célula-célula para permitir a passagem de íons e outras moléculas pequenas, através de poros protéicos intercelulares) e o fato de requerer expansão *in vitro* (PRÓSPER et al, 2003).

Para promover a miogênese, alguns autores sugerem a utilização de células satélites ou células de músculo liso ou CTME derivadas da MO de adultos. Para angiogênese e vasculogênese, os tipos celulares propostos são: células progenitoras endoteliais, células-tronco derivadas da MO, células progenitoras da linhagem hematológica e células mesoteliais. Em síntese, para a regeneração miocárdica, as células principalmente investigadas são as células satélites e as células-tronco de M. O (LAW et al, 2004; LEE; MAKKAR, 2004; CHACHQUES et al, 2005; SOUZA et al, 2004; FONTES; THOMSON, 1999; SCHIEKER et al, 2004; PIETERNELLA et al, 2003; PITTENGER et al, 1999).

O avanço nas técnicas de cultivo celular em modelos animais possibilitou o estudo dos sinais químicos e físicos (citoquinas e outros sinais solúveis) que, influenciam o desenvolvimento e a diferenciação celular, direcionando-os para os tipos celulares de interesse. Além de moléculas sinalizadoras solúveis, o contato direto célula-célula parece ser obrigatório para o controle externo do microambiente e a diferenciação de células-tronco. Dados já demonstrados indicam que CTME possuem plasticidade e podem ser reprogramadas, *in vitro*, para linhagem cardiomiogênica e serem usadas em terapias celulares para tratamento de doenças cardíacas (YANNAKI; PAPAYANNOPOULOU, 2001; SOLTER; GEARHART, 1999; PITTENGER; MARTIN, 2004).

O desenvolvimento de estratégias para melhorar a sobrevivência e diferenciação celular é de grande interesse dos pesquisadores, existindo basicamente duas modalidades de terapia celular com a finalidade de regenerar a musculatura cardíaca ou melhorar sua vascularização: a que utiliza células-tronco somáticas adultas e outra que utiliza os mioblastos esqueléticos (ME).

1.1 FORMULAÇÃO DO PROBLEMA

A utilização das células-tronco derivadas da MO no transplante cardíaco apresenta várias vantagens. Estas células podem ser encontradas na MO de pacientes de qualquer idade, são facilmente coletadas e possibilitando uma fonte autóloga, o que exclui problemas de rejeição. Estudos experimentais mostraram que a transferência dessas células, após serem cultivadas e tratadas em laboratório, induz a expressão de proteínas musculares no local danificado e conseqüente melhora da função cardíaca (AL ATTAR et al, 2002).

De acordo com a literatura, os ME transplantados no miocárdio, nos modelos de criolesão e de infarto do miocárdio por ligadura da artéria coronária esquerda, são capazes de promover a melhora funcional e do grau de IC. Entretanto, a maioria destas células morre (70%) por falta de nutrição. Por outro lado, as células mononucleares da MO transplantadas, demonstram favorecer a angiogênese, por terem em seu *pool* de células: CTME derivadas da MO, pluripotentes (0,001%-0,01% da fração mononuclear); os precursores de células endoteliais e as células da linhagem hematopoética (PERIN et al, 2003b).

Em síntese, ambas as células: ME e células-tronco são atrativas ferramentas terapêuticas. Nos modelos pesquisados, os ME são transplantadas após o cultivo e as células-tronco: fração mononuclear, sem o cultivo e/ou cultivadas (CTME), sendo estes tipos celulares transplantados isoladamente.

Estes resultados sugerem idealizar um modelo de bioprocesso de co-cultivo de ME e de CTME da M.O para o transplante no tratamento das doenças do miocárdio, onde existem mecanismos fisiopatológicos em comum: diminuição do suprimento vascular, necrose, perda de cardiomiócitos e fibrose. A escolha destes dois tipos celulares: ME e CTME da MO, visa propiciar simultaneamente miogênese e angiogênese para o tecido transplantado, evitando com a presença de células angiogênicas à perda de ME transplantados por falta de nutrição, o que poderia potencializar a viabilidade celular dessas células no miocárdio hospedeiro.

Há controvérsia na literatura, quanto à capacidade das células-tronco da MO de se diferenciarem em cardiomiócitos e há uma concordância quanto ao potencial angiogênico destas, pela presença de precursores de células endoteliais (CD133⁺).

Baseados nos resultados obtidos na literatura e de nossos resultados com o transplante ME e de CTME, ambos após o cultivo, e aplicados isoladamente, foram idealizadas duas hipóteses (GUARITA-SOUZA et al, 2005).

1) seria possível estabelecer um bioprocesso de co-cultivo destes dois tipos celulares, permitindo a proliferação de ambos simultaneamente, possibilitando uma interação prévia *in vitro* antes da interação *in vivo* (troca de sinalizações entre as células) ? 2) Seria possível que o produto deste co-cultivo celular aplicado potencializasse os resultados benéficos já encontrados de miogênese e angiogênese, quando essas células aplicadas isoladamente, se administradas simultaneamente os ME e as CTME para produzir a somatória de efeitos benéficos (PIETERNELLA et al, 2003; PITTENGER et al, 1999; PITTENGER; MARTIN, 2004)?

O cultivo celular teria como objetivo principal possibilitar a oferta de um número maior de células. Já a associação de dois tipos celulares distintos, obtidos de isolamento de tecidos distintos, denominado de co-cultivo, favoreceria as interações célula-célula *in vitro*, previamente ao transplante. Essas interações prévias visariam favorecer a adesão celular ao tecido transplantado, aumentar a taxa de sobrevivência das células após a implantação, além de possibilitar um procedimento de manutenção de cultivo único para dois tipos celulares que poderia diminuir os custos operacionais, gerando um produto celular, capaz de promover angiogênese e miogênese com a perspectiva de melhora da função contrátil no miocárdio receptor.

1.2 OBJETIVOS DO TRABALHO

1.2.1 Objetivos Gerais

Desenvolver um bioprocesso de terapia celular capaz de promover melhora funcional cardíaca associada à angiogênese e à miogênese promovendo a regeneração do miocárdio.

1.2.2 Objetivos Específicos

1.2.2.1 Desenvolver o Co-cultivo de CTME e de ME

Desenvolver um bioprocesso de co-cultivo de CTME e de ME, tendo como característica o cultivo simultâneo de ambos os tipos celulares, para proliferar e expandir no mesmo substrato; possibilitando a interação prévia destas células antes do transplante no miocárdio e possibilitar o co-transplante (Primeira Fase).

1.2.2.2 Comparar com outros modelos

Comparar os resultados funcionais e histopatológicos da terapia celular com o uso do modelo de co-cultivo de CTME e de ME com as terapias dessas células aplicadas isoladamente na miocardiopatia isquêmica crônica (Segunda Fase).

1.2.2.3 Validar

Validar o bioprocesso de co-cultivo de CTME e de ME no tratamento no tratamento da cicatriz do miocárdio (Terceira Fase).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TERAPIA CELULAR

Historicamente, as pesquisas básicas e descobertas sobre as células-tronco foram realizadas em modelos animais, particularmente nos camundongos. A presença de células-tronco não hematopoéticas na MO foi primeiro sugerida pelo patologista alemão Cohnhein, em 1867, e corroborada por Friedenstein, em 1970,

demonstrando a capacidade de aderência de células estromais da medula óssea cultivadas em placas de plástico (KEREIAKES, 2003).

Estas células aderentes possuíam pluripotencialidade e rapidamente diferenciavam-se em osteoblastos, condroblastos, células de tecido adiposo e células musculares (ORLIC et al, 2001a; TOMITA et al 1999).

Em 1981, pesquisadores relataram métodos para o cultivo das células-tronco embrionárias (CTE) de camundongos em laboratório, levando-se cerca de 20 anos para que o mesmo fosse realizado com CTE humanas (DED et al, 2003).

Muito do conhecimento desenvolvido sobre CTE teve origem em dois campos de pesquisas: a biologia reprodutiva aplicada, ou seja, tecnologias de fertilização *in vitro*, e a pesquisa básica em embriologia de camundongos. Em 1998, James Thomson, da Universidade de Wisconsin-Madison, isolou células da massa celular interna do blastocisto e desenvolveu a primeira linhagem de CTE humanas. Paralelamente, John Gearhart, na Universidade Johns Hopkins, relatou a primeira derivação de células germinais embrionárias humanas de uma população celular isolada de tecido fetal das gônadas, conhecida como célula germinal primordial, a qual origina óvulos e espermatozoides (GEARHART, 2001; ORLIC et al, 2001).

Vários autores levantaram questionamentos que, ainda necessitam de respostas. Qual seria o tipo celular que melhor se adaptaria ao transplante celular com o objetivo de reparar o miocárdio lesado: células-tronco hematopoéticas, células progenitoras endoteliais, CTME da MO, células-tronco derivadas do tecido adiposo ou células satélites? Qual a melhor via de acesso: injeções endovenosas, administração intracoronariana, aplicação transendocárdica ou transepicárdica? Quais as linhagens mais eficientes em relação à área cicatricial, zona perinfartada ou área isquêmica? Quais os métodos para sua caracterização? Quais as vantagens em favorecer a introdução e a migração destas células no miocárdio? Quais as doenças cardíacas que se beneficiariam desta terapêutica (AL ATTAR et al, 2002; QU-PETERSEN et al, 2002; MCKINNEY-FREEMANN et al, 2002; PENN et al, 2002; TOMITA et al 1999; DED et al, 2003)?

Uma das propostas terapêuticas que está sendo desenvolvida é o uso de células-tronco da MO para recuperação de miocardiopatias. Esta proposta consiste na introdução destas células no miocárdio lesado, as quais possuem uma eventual

capacidade de atuar sobre a causa básica, a destruição do cardiomiócito, regenerando e restaurando a função do músculo cardíaco (ORLIC et al, 2001b; JACKSON et al, 2001; TOMA et al, 2002).

Durante muitas décadas estudou-se o processo de hematopoiese (processo de produção das células sanguíneas) a partir de células-tronco multipotentes, localizadas no interior dos ossos, que são capazes de dar origem às células mais diferenciadas e com menor capacidade de proliferação. Células da MO são multipotentes, geram as linhagens progenitoras mielóide e linfóide e dando origens aos nove tipos celulares presentes no sangue, de hemácias a linfócitos. O processo de renovação celular é tão intenso que, diariamente novas células sanguíneas entram na circulação (TOMITA et al, 1999).

A noção de que vários tecidos e órgãos do corpo humano, como o fígado, o músculo esquelético, o pâncreas, e o sistema nervoso, têm um estoque de células-tronco, com uma capacidade limitada de regeneração tecidual após lesão, é recente. Ainda mais recente é a idéia de que as células-tronco presentes nestes vários órgãos são, não apenas multipotentes no sentido de que podem gerar células constitutivas daquele órgão específico, mas também pluripotentes, no sentido de que também podem gerar células de outros órgãos e tecidos.

A possibilidade de utilizar as próprias células de indivíduos adultos resolveria simultaneamente os dois principais problemas enfrentados pela bioengenharia: a rejeição imunológica de transplantes heterólogos e as objeções ético-religiosas do uso de material fetal ou embrionário. O primeiro relato incontestável desta propriedade das células-tronco adultas foi feito em 1998 por um grupo de cientistas italianos que estudaram a regeneração do músculo esquelético por células derivadas da MO (MULLER-EHMSSEN et al, 2002).

Na manutenção da homeostase, o organismo é capaz produzir um processo proliferativo exuberante sob controle, impedindo, em circunstâncias normais, que o número de células produzidas exceda o necessário e que essas células liberadas na circulação estejam em estágio correto de diferenciação.

Três recentes descobertas têm revolucionado a biologia das células-tronco e demonstrado seu potencial em uma ampla gama de doenças humanas. Primeiro: o isolamento de células-tronco de órgãos onde se pensava não haver potencial

regenerativo. Por exemplo, células satélites (células-tronco musculares esqueléticas) podem ser cultivadas *in vitro* e transplantadas em músculos receptores onde se diferenciam em miotubos e fundindo-se com fibras musculares endógenas regenerando o tecido muscular. Segundo: células-tronco adultas órgão-específicas demonstram maior plasticidade do que se pensava, ou seja, células-tronco isoladas de um determinado tecido podem diferenciar-se em vários tipos celulares distintos do seu tecido de origem. Terceiro: As CTE humanas podem ser isoladas de fetos em estados muito precoces e proporcionar sua diferenciação *in vitro* em ampla variedade de tipos celulares (QUAINI et al, 2002).

As células-tronco têm sido estudadas pelo seu potencial terapêutico em doenças degenerativas. Uma série de estudos demonstra que células-tronco adultas possuem um novo padrão de desenvolvimento, um processo denominado transdiferenciação ou de plasticidade (AL ATTAR et al, 2002; QU-PETERSEN et al, 2002; BIANCO et al, 2001; MCKINNEY-FREEMAN et al, 2002; ORLIC et al, 2001a; JACKSON et al, 2001; TOMA et al, 2002; TOMITA et al, 1999; MULLER- EHMTSEN et al, 2002).

2.2 TIPOS CELULARES

2.2.1 Células-tronco

As células-tronco são células que podem dar origem a todos os tecidos e possuem a habilidade em passar, *in vivo*, de um estado quiescente, indiferenciado, para a auto-replicação. Estas células foram inicialmente caracterizadas como sendo totipotentes ou pluripotentes. Durante a embriogênese normal, as células-tronco totipotentes são originárias de embriões humanos (encontradas na massa interior do blastocisto, quatro à cinco dias após fecundação) ou de tecido fetal e destinadas à ser parte das gônadas. Essas células possuem o potencial de diferenciação para qualquer tipo de célula derivada das três camadas germinativas e inclusive das células germinativas (óvulos e espermatozóides) e anexos placentários (YANNAKI; PAPAYANNOPOULOU, 2002; MULLER- EHMTSEN et al, 2002; QUAINI et al, 2002;

LAFLAMME et al, 2002; BAYES-GENIS et al, 2002; TAKESHITA et al, 1994; MUROHARA et al, 1998; BAUMGARTHER et al, 1998; ISNER et al, 1996).

A maioria dos pesquisadores faz uso do termo pluripotente para descrever células-tronco que são originárias das três camadas germinais embrionárias: mesoderma, endoderma e ectoderma. Estas três camadas germinais são as fontes embrionárias de todas as células do corpo e dos mais diferentes tipos de células especializadas derivadas de uma destas três camadas (Figura 01). As células pluripotentes também dão origem a qualquer tipo celular no organismo, porém não possuem a capacidade de formar um organismo completo (ORLIC et al, 2001a).

Células multipotentes são células-tronco que originam diferentes tipos celulares, porém possuem certo comissionamento linhagem-específico. Células precursoras unipotentes são definidas como células no organismo adulto, capazes de diferenciar-se somente em uma linhagem (ORLIC et al 2001b; LAFLAMME et al, 2002).

O uso de células-tronco derivadas da MO em transplantes autólogos, além da vantagem de evitar o uso de terapias imunossupressoras não-específicas, proporciona facilidade de coleta, de manipulação e permite a reconstituição mais rápida do tecido lesado do que no transplante alogênico (AL ATTAR et al, 2002; PENN et al, 2002; PITTENGER et al, 1999).

Várias fontes de células-tronco têm sido estudadas: embrionárias e fetais, as quais possuem vasto potencial de desenvolvimento, retendo a capacidade de diferenciar-se em inúmeros tipos celulares, incluindo cardiomiócitos e CTME da MO adultas sendo que, *in vitro* parecem possuir capacidade de diferenciação em multilinhagens (QU-PETERSEN et al, 2002).

Muitos estudos serão necessários na área de biologia celular, no isolamento, cultivo e regulação de diferenciação de células-tronco humanas e dos aspectos éticos suscitados, antes que o completo potencial destas abordagens possa ser conhecido (GROUNDS et al, 2002; KUEHNLE; GOODELL, 2002; BAUMGARTHER et al, 1998; ISNER et al, 1996; LOSORDO et al, 1998; HENNINGSON et al, 2003).

2.2.1.1 Células-tronco adultas

Células-tronco adultas, assim como todas as células precursoras, compartilham, no mínimo, duas características: podem fornecer cópias idênticas delas mesmas por longos períodos de tempo e esta habilidade em proliferar é dita auto-renovação e podem dar origem aos vários tipos celulares maduros que possuem características morfológicas e funções especializadas. Células-tronco adultas são raras. Sua função primária é manter o estado funcionante do organismo em equilíbrio, denominado homeostasia e com certas limitações, repor células danificadas. Além disso, células-tronco adultas estão dispersas em tecidos maduros e seus comportamentos são diversos, na dependência de seu local de desenvolvimento (QUAINI et al, 2002; BAYES-GENIS et al, 2002).

Há dois tipos gerais de estratégias pelas quais as células-tronco geram progenitores diferenciados. Em um extremo, há o mecanismo que pode ser descrito como invariável, no qual a célula-tronco dá origem, dentro de uma divisão assimétrica, há uma célula-tronco filha e outra célula-filha que segue a diferenciação. No outro extremo, um mecanismo altamente regulatório pelo qual a célula-tronco dá origem a células-filhas com uma probabilidade finita de originar células-tronco ou progenitores comissionados. A maioria dos tecidos auto-regenerativos de mamíferos se encaixa nesta categoria. Ainda que as duas estratégias sejam extremamente diferentes, ambas envolvem controle de retro-alimentação múltiplo e interações intercelulares recíprocas (ODORICO et al, 2001; VERFAILLIE et al, 2002).

Os controles intrínsecos do destino das células-tronco incluem fatores de transcrição e de expressão gênica, que determinam e controlam as mudanças no nível de promotores ou inibidores do ciclo celular. Os controles externos estão relacionados ao conceito de nicho celular. Sobre os nichos das células-tronco, os estudos discorrem sobre a importância do microambiente das células-tronco, denominado nicho; onde envolvem uma complexidade de sinais de curta e longa-distância entre essas, suas células-filhas diferenciadas e células vizinhas (VERFAILLIE et al, 2002).

Os sistemas que apoiam a proliferação, diferenciação e sobrevivência de populações progenitoras diversas dependem de fatores secretados por outros tipos celulares. Uma ampla gama de fatores secretores regula o destino e a proliferação das células-tronco. Duas famílias de fatores de crescimento demonstram sua

importância funcional: fator transformador de crescimento β (TGF- β) e *complexos de proteínas ligantes no contato célula-célula (Wnts)*. Além desses controles, há o controle homeostático, realizado por mecanismos de retroalimentação que podem envolver os fatores de transcrição específicos induzindo uma resposta para um sinal externo ou atuando como antagonista de diferentes sinais externos (ODORICO et al, 2001; WEISSMAN, 2000).

Outro conceito introduzido por vários autores diz respeito à plasticidade. Populações de células-tronco foram isoladas de tecidos adultos apresentando uma inequívoca plasticidade, quando transplantadas em receptores, ou seja, as células-tronco poderiam diferenciar-se em tipos celulares não relacionados ao seu tecido de origem (TAKESHITA et al, 1994; ODORICO et al, 2001; VERFAILLIE, et al, 2002; WEISSMAN, 2000).

Diversos estudos demonstraram que uma célula-tronco adulta é capaz de originar células diferenciadas com fenótipos maduros e inteiramente integradas ao tecido, sendo capazes de executar funções especializadas, próprias do tecido. O termo fenótipo referiu-se às todas características observadas nas células ou no organismo: morfologia, interações com outras células e ambientes não-celulares, proteínas que estão presentes na superfície celular e comportamento celular (secreção, contração e transmissão sináptica). Esta capacidade das células-tronco adultas, somada ao conceito da plasticidade, tornaria estas células candidatas viáveis para o reparo da lesão do miocárdio (BIANCO et al, 2001; YANNAKI; PAPAYANNOPOULOU, 2002; CHACHQUES et al, 2004a; QUAINI et al, 2002; BARBIERI et al, 2005; COWAN et al, 2004).

2.2.2 Células satélites

Outra fonte de células-tronco cogitada seria o músculo esquelético adulto. O músculo esquelético adulto é um tecido único, do ponto de vista estrutural, consistindo predominantemente de miofibras altamente especializadas, destinadas a conduzir funções teciduais específicas.

O conceito de células satélites (células-tronco de músculo esquelético) é fundamental para a homeostasia muscular pós-natal, em resposta à recuperação,

demanda de crescimento ou lesões. Cada miofibrila é intimamente associada às células satélites que repousam sob a lâmina basal e estritamente acopladas à membrana plasmática. Nos músculos normais, células satélites são mitoticamente quiescentes, mas tornam-se ativas, em resposta aos sinais liberados após lesões ou em resposta aos estímulos. Após divisão, células satélites ativadas passam a ser denominadas de mioblastos esqueléticos (ME); e após diferenciação terminal são incorporadas às fibras musculares adultas, como micronúcleos após mitose (QU-PETERSEN et al, 2002; SOUZA et al, 2004; MULLER- EHMSSEN et al, 2002; CIVIN, 2001; KAIJI; LEIDEN, 2001; WATT; HOGAN, 2000).

Células satélites são, todavia, uma população de células-tronco que proporciona capacidade de reposição de células pós-mitóticas diferenciadas necessárias para as funções do músculo esquelético adulto. O potencial clonogênico destas células é ilustrado por sua capacidade em gerar colônias de diferenciação progênie-competente *in vitro*. Quando plaqueadas em densidade clonal, elas proliferam formando colônias, sendo que, uma proporção destas retém a capacidade de diferenciar-se. A habilidade das células satélites em gerar tipos celulares diferenciados é inequívoca, tanto *in vivo* como *in vitro*. Contudo, de que forma esta auto-renovação seria mantida ainda não estão bem esclarecidas (CIVIN, 2001).

Ainda que a predominância seja de células satélites e miofibrilas, o tecido muscular esquelético também contém uma ampla gama de outros tipos celulares, incluindo as do tecido conjuntivo, tecido adiposo, terminações nervosas e um extenso sistema vascular. Até o momento, a conclusão é de que nem todas as células satélites seriam equivalentes e que o comportamento regenerativo do músculo esquelético contém diferentes tipos de precursores, fenotípica e funcionalmente (HAWLEY, 2001; CHEDRAWY et al 2002).

Os marcadores de superfície celular são importantes ferramentas, mas têm suas limitações, eles não são ideais para a identificação de células satélites *in vivo* por sua expressão em células-tronco e outros tipos celulares presentes no tecido muscular (MARTIN-RENDON; WATT, 2003; GRAF, 2002).

Vários marcadores foram sugeridos para a identificação de células satélites sendo que um dos mais considerados é a M-Caderina, presente na interface das células satélites e repousando sob miofibrilas. Alguns marcadores de superfícies

celulares fluorescentes que são utilizados em análises por Citômetria de Fluxo (*Fluorescent activated cells sorting* -FACS) de células-tronco hematopoéticas e mesenquimais também são investigados para células satélites. Células miogênicas são CD45⁻, sendo que, a maior parte de CD34⁺, ainda que o CD34 não seja um útil para identificar células satélites em cortes de tecidos uma vez que está presente em outras células do tecido vascular e hematopoético (QU-PETERSEN et al, 2002; GRAF, 2002; ORLIC et al, 2001b).

Vários estudos mostraram que cardiomiócitos alogênicos sobrevivem após implantação em miocárdio normal, quando submetido á criolesão e na área atingida pelo infarto, integrando-se ao tecido miocárdico receptor e melhorando a função contrátil. Uma vez isto estabelecido, as pesquisas focaram nos tipos celulares autólogos facilmente disponíveis como as células satélites. Tais células progenitoras de músculo esquelético foram isoladas de uma amostra de músculo esquelético, cultivadas e expandidas *in vitro*. Os estudos demonstraram que a implantação de um grande número de células satélites na região infartada melhorou a contratibilidade regional em roedores e outros modelos animais. Contudo, relatos recentes indicaram o desenvolvimento de arritmias ventriculares em alguns experimentos (MARTIN-RENDON; WATT, 2003; GRAF, 2002; ORLIC et al, 2001a).

2.2.3 Células progenitoras endoteliais

Os angioblastos ou células progenitoras endoteliais, encontrados no sangue periférico e da MO, quando cultivados e expandidos *in vitro*, mostraram grande potencial terapêutico em casos de neovascularização miocárdica, demonstrando um impacto favorável na preservação da função ventricular (SIMINIAK; URPI SZ, 2003).

As células progenitoras endoteliais são identificadas com base na expressão de antígenos de superfície tais como CD133 e receptor -2 para fator de crescimento de célula endotelial vascular (VEGFR-2), também encontrados em células-tronco hematopoéticas. Em modelos utilizando camundongos, os progenitores endoteliais foram mobilizados da MO e contribuíram para a neo-angiogênese da região isquêmica. Da mesma forma, em modelos de isquemia cardíaca em ratos, as células mobilizadas CD34⁺, CD117⁺ de forte intensidade, CD133⁺ e VEGFR2⁺ contribuíram

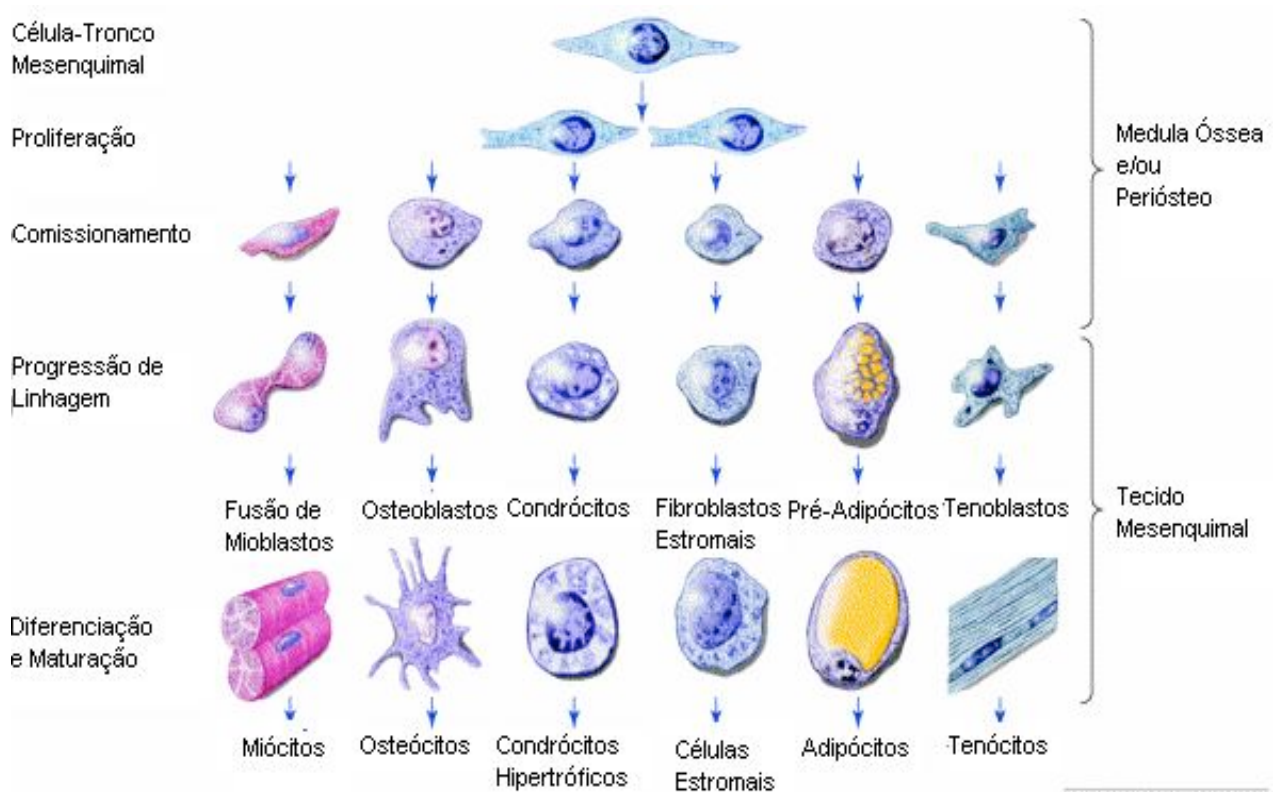
para reparar o coração do rato após infarto do miocárdio por sua impressionante capacidade de gerar novos capilares na zona infartada (QU-PETERSEN et al, 2002; PENN et al, 2002; ZAMMIT; BEAUCHAMP, 2001; STAMM; STEINHOFF, 2003; LAUGWITZ et al, 2005).

2.2.4 Células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea

O consenso em diversos estudos é que as CTME diferenciam-se em cardiomiócitos *in vitro* e *in vivo* (GROUNDS et al, 2002; PENN et al, 2002; ODORICO et al, 2001; QU et al, 1998).

Ao contrário das células-tronco hematopóéticas e endoteliais, as CTME são originárias do mesoderma somático e demonstram seu potencial em diferenciar-se em tecidos funcionais mesodérmicos: osteoblastos, condrócitos, adipócitos e mioblastos esqueléticos (figura 01) (VERFAILLIE et al, 2002; CONBOY et al, 2003; KAWAMOTO et al, 2001; LI et al, 1999b).

FIGURA 01. DIFERENCIAÇÃO DAS CTME DERIVADAS DA MEDULA ÓSSEA



Células-tronco mesenquimais são raras na medula óssea, representando 0,001% a 0,01% das células nucleadas, porém, podem ser facilmente isoladas, cultivadas e expandidas. Essas têm estabilidade genética e características reproduzíveis, tornando-as ideais para a manipulação *in vitro*, podendo gerar novas células contráteis e favorecendo o seu uso em terapias celulares na cardiomioplastia (PERIN et al, 2003b).

Em um estudo realizado com o auxílio da citometria de fluxo, foi determinado um padrão imunofenotípico das CTME. Partindo-se do princípio de que a MO adulta contém, no mínimo, dois tipos de células-tronco: células tronco-hematopoéticas e CTME (também denominadas células estromais da medula), ambos os tipos celulares poderiam ser isolados da fração mononuclear da MO aspirada. Células-tronco hematopoéticas podem ser isoladas com base em marcadores de membrana específicos e apesar da ausência de um marcador único para células-tronco mesenquimais, algumas estratégias para o enriquecimento da fração dessas células são baseadas nas suas características de adesão ao material plástico (REYES et al 2002).

A simples distinção de que células-tronco hematopoéticas são CD45⁺ e CD34⁺, enquanto CTME derivadas da M.O são CD45⁻ e CD34⁻, já indicaria um caminho a ser seguido (QU-PETERSEN et al, 2002).

CTME derivadas da MO *in vitro* se apresentam como uma população homogênea, de células aderentes que expressam proteínas específicas em sua superfície (marcadores de membrana), os quais incluem CD29, CD44, CD73, CD90 e CD105. Embora esses marcadores não sejam específicos para CTME, estes são principalmente caracterizados por sua habilidade em diferenciarem-se em múltiplas linhagens mesenquimais, as quais incluem osteócitos, condrócitos, células adiposas e células de músculos esqueléticos, sob condições controladas, *in vitro*. Todavia, as células-tronco mesenquimais preenchem todos os critérios para serem consideradas células-tronco de fato: auto-regeneração, diferenciação em múltiplas linhagens e reconstituição de tecidos *in vivo* (MAJKA et al, 2003).

No estudo supracitado, as células foram cultivadas e após procedimentos técnicos apropriados, foram incubadas com anticorpos monoclonais contra CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, VE-Caderina, VCAM-1, CD105, CD117, CD133, KDR e

FLT-1. Os resultados obtidos mostraram que CTME da MO, tipicamente expressam os antígenos CD73 e CD105, conforme já descrito em trabalhos anteriores. E também apresentaram positividade para CD44, CD90 e CD166 e foram negativos para marcadores hematopoéticos típicos, como CD14, CD34, CD45 e CD133. CTME derivadas da MO, indiferenciadas não apresentaram positividade para os receptores KDR e FLT-1 ou para VE-Caderina e VCAM. Uma das conclusões desta pesquisa diz respeito à principal vantagem das CTME da MO, que é de possuir fácil acesso por punção da MO, além da facilidade de cultivo e expansão. CTME da MO demonstraram ser geneticamente estáveis após longo tempo de cultivo MAJKA et al, 2003; REYES et al, 2001; WATT et al, 1998).

Embora não exista um único marcador específico, os marcadores mais comuns expressos em CTME da MO de humanos são: CD10, CD13, CD44, CD56 (baixa intensidade de fluorescência), CD61, CD90, CD105, CD109, CD140b, CD164 e CD172a, sendo negativos para CD15, CD34, CD45, CD117, CD133, CD167a (WATT et al, 1998; BACIGALUPO, 2004; MINGUELL et al, 2001; ZVAIFLER et al, 2000).

Outros autores definem as CTME da MO humanas como constituindo uma população imunofenotipicamente distinta, uniformemente positiva para CD44, CD54, CD71, CD73, CD90, CD105, CD106, CD120a e CD124 e CD15 negativa para CD14, CD34 e CD45; podendo ser induzidas a diferenciarem-se em células adiposas, condrócitos e osteócitos (PITTENGER et al, 1999; REYES et al, 2002; WATT et al, 1998; BACIGALUPO, 2004; OSWALD et al, 2004).

As CTME não são definidas por sua origem, sendo que, mesmo dentro de um tecido definido como a medula óssea, na dependência de microambientes (nichos), onde células idênticas ou intimamente relacionadas são capazes de expressar diferentes moléculas em sua superfície (YANNAKI; PAPAYANNOPOULOU, 2001; NAGAYA et al, 2005; LEE et al, 2003).

2.2.5 Outros tipos celulares

Outros tipos celulares estão sob análise de seu potencial de regeneração do miocárdio como as células: endoteliais vasculares, mesoteliais, células estromais de

tecido adiposo e células-tronco provenientes da polpa dental (LEE; MAKKAR, 2004; SCHIEKER et al, 2004).

As células endoteliais vasculares podem ser coletadas da membrana interna de arteríolas autólogas ou veias periféricas e após sua expansão *in vitro*, essas foram transplantadas no miocárdio isquêmico, sendo demonstrada a formação de extensa rede capilar no miocárdio, no entanto insuficiente para a sua regeneração tissular (SCHIEKER et al, 2004).

As células mesoteliais, obtidas por excisão e digestão do epíploon ou do líquido peritoneal de pacientes humanos, são facilmente cultivadas e passíveis de modificações genéticas. Esse tipo celular seria, provavelmente, o precursor das artérias coronárias durante a embriogênese secretando um amplo espectro de citocinas angiogênicas. Essas células têm sido utilizadas para desenvolver neoangiogênese em modelos experimentais de infarto do miocárdio, por apresentarem semelhanças morfológicas e funcionais às células endoteliais e conservarem características de transdiferenciação.

As células estromais de tecido adiposo ou também conhecidas, como células-tronco derivadas do tecido adiposo, despertam grande interesse, em razão de sua grande e reversível capacidade de expansão *in vitro*, o que parece ser permanente durante toda a vida adulta. Contudo, para assegurar o remodelamento do tecido adiposo, será necessário o desenvolvimento de uma rede capilar. Apesar deste fato, parece haver uma ligação importante entre as células adiposas e a rede vascular. Estas células representam uma heterogêna população que inclui células endoteliais microvasculares constituindo uma fonte de células pluripotentes e não restritivas.

O entendimento entre o desenvolvimento do tecido adiposo e plasticidade abre novas perspectivas para a terapia angiogênica baseada na administração de células-tronco derivadas de tecido adiposo no tratamento de doenças cardiovasculares. Outro fato interessante foi a constatação da diferenciação espontânea de cardiomiócitos a partir de células do estroma de tecido adiposo (SCHIEKER et al, 2004).

As células-tronco provenientes da polpa dental parecem ser fontes viáveis de células com potencial para o desenvolvimento de terapias de transplante celular

autólogo e ainda não foram testadas para a cardiomioplastia celular (; MAKKAR, 2004b; SCHIEKER et al, 2004).

2.3 CARDIOMIOPLASTIA

2.3.1 Terapia celular e gênica para angiogênese

Vários estudos vêm demonstrando de forma cada vez mais consistente, que células originadas da MO participam intensamente da regeneração de várias estruturas do sistema cardiovascular.

Estudos *in vitro* demonstraram que, células-tronco da MO, sua fração mononuclear, pode se diferenciar em cardiomiócitos, cuja atividade elétrica espontânea e os receptores funcionais adrenérgicos e muscarínicos foram detectados. Embora outros trabalhos tenham utilizado condições de cultivo dos aspirados da medula óssea que, favoreçam a seleção de células do estroma, em nenhum destes trabalhos, os autores se preocuparam com uma caracterização fenotípica mais exata do (s) tipo (s) celular (es) que era (m) capaz (es) de se diferenciar em cardiomiócitos em cultura (TAKESHITA et al, 1994; MUROHARA et al, 1998).

Estudos *in vivo* foram conduzidos em modelos com ratos, cães e porcos, tanto em modelos de corações normais, após o IAM e criolesão. Estudos demonstraram em ratos que, as células-tronco da MO, sua fração mononuclear, injetadas na borda de áreas infartadas se diferenciaram para cardiomiócitos e que, após o IAM, essas células marcadas de ratos integraram-se nas bordas da área do infarto e se diferenciaram para cardiomiócitos. Estes resultados foram reproduzidos em modelos suínos de IAM, onde os cardiomiócitos, juntamente com novos vasos originados e da M.O foram identificados (LAFLAMME et al, 2002; BAYES-GENIS et al, 2002; TAKESHITA et al, 1994).

Em recente série de casos de análise histopatológica de autópsias de coração de mulheres submetidas a transplante da MO de doadores homens, foi observada a presença de cardiomiócitos com cromossomas XY, ou seja, cardiomiócitos originários da MO do doador. A origem extracardíaca de novos cardiomiócitos, já

havia sido descrita em outros estudos, mas este foi o primeiro a identificar a MO como fonte de novos cardiomiócitos, revolucionando assim o conceito, até então vigente de que, não há regeneração da musculatura cardíaca a partir de células progenitoras da medula óssea (QUAINI et al, 2002; MUROHARA et al, 1998; BAUMGARTHER et al, 1998, ISNER et al, 1996).

Outra questão importante foi à demonstração da transdiferenciação de células-tronco da MO em células endoteliais e o seu papel na angiogênese, além da elucidação do papel dos fatores angiogênicos.

As implicações terapêuticas dos fatores de crescimento angiogênicos foram identificadas por estudos há duas décadas. Investigações posteriores estabeleceram a possibilidade da utilização de formulações de fatores de crescimento angiogênico recombinantes, com o objetivo de desenvolver ou aumentar a rede de colaterais em modelos animais de isquemia crônica miocárdia ou de membro. Esta nova estratégia foi denominada angiogênese (ODORICO et al, 2001).

Diversos estudos experimentais utilizando proteínas recombinantes ou transferências gênicas de VEGF, FGF-2 e HGF foram realizados. A transfecção gênica em seres humanos utilizando DNA carreando VEGF (phVEGF) foi inicialmente realizada para o tratamento de pacientes com isquemia grave de membros, com sucesso (ODORICO et al, 2001; VERFAILLIE et al, 2002; WEISSMAN, 2000; BARBERI et al 2005).

Em um estudo de fase I, sete pacientes portadores de angina refratária crônica receberam células-tronco, a fração mononuclear, através de injeções transepicárdicas por meio de minitoracotomia, sendo indicada exclusivamente com o objetivo de obter angiogênese e tiveram sucesso neste propósito (COWAN et al, 2004; CIVIN, 2001; KAIJI; LEIDEN, 2001; WATT; HOGAN, 2000; HAWLEY, 2001).

Os estudos experimentais em animais e os ensaios clínicos já realizados têm duas implicações. Primeiro, sugerem que o mecanismo fundamental pelo qual a neovascularização aumenta o desenvolvimento da rede de colaterais é pelo fornecimento de citocina suplementar aos indivíduos que, devido à idade avançada, o diabetes, a hipercolesterolemia e outras circunstâncias ainda não definidas, são incapazes de aumentar a expressão de citocinas, em resposta à isquemia tecidual. Segundo, a administração de citocina claramente representa

somente um aspecto da intervenção terapêutica. Independentemente, do quanto de citocina é administrada, a população de células endoteliais residentes pode constituir um fator limitante potencial para promover a neovascularização nos tecidos isquêmicos (KAIJI; LEIDEN, 2001; WATT; HOGAN, 2000; HAWLEY, 2001).

Várias alternativas têm sido desenvolvidas baseadas na concepção de que, as células endoteliais e as células-tronco hematopoiéticas derivam de uma progenitora comum, o hemangioblasto. Portanto, o paradigma de que as células endoteliais eram geradas por replicação de células endoteliais maduras foi revolucionado. Estudos demonstraram que, grande parte das células envolvidas no processo de angiogênese tinha origem na MO. Mais ainda, possibilitaram a descoberta de que há vasculogênese na vida adulta, ou seja, que ocorre surgimento de novos vasos na vida adulta e não somente a replicação de capilares a partir de vasos já existentes, conceito que responde por angiogênese. Após esta publicação, muitas outras se seguiram confirmando estes resultados (CHEDRAWY et al, 2002; GRAF, 2002; ORLIC et al, 2001b; FERRARI et al, 1998; SIMINIAK; URPISZ, 2003; ZAMMIT; BEAUCHAMP, 2001; STAM; STEINHOFF, 2003; KAWAMOTO et al, 2001).

As células progenitoras endoteliais (CPE), originadas na MO, poderiam ser identificadas como CD34+ e VEGFR2+, embora outros marcadores como os CD133+ e CD31+ tenham sido descritos. Durante a isquemia tecidual, com a queda dos níveis de oxigênio, ocorre aumento da produção de Fator de Indução de Hipóxia tipo 1 (HIF-1), que por sua vez desencadeará o aumento de vários fatores de crescimento, mais notadamente o VEGF. O aumento de VEGF vai ser o principal estímulo para a mobilização das células da MO, assim como o principal sinal para a mobilização destas células nos tecidos isquêmicos e sua posterior diferenciação em células endoteliais em estruturas tubulares. A aplicação de VEGF para a neovascularização terapêutica mobiliza as CPE (KAWAMOTO et al, 2001; Li et al, 1999a; MAJKA et al, 2003).

Shintani e colaboradores estudaram pacientes com IAM submetidos à angioplastia primária com sucesso e observaram significativa elevação das CPE originárias da M.O que, apresentaram pico sérico no sétimo dia após o IAM. Os níveis de CPE tiveram relação com os níveis de séricos de VEGF. Enquanto, outros

autores sugeriram que a neovascularização ocorrendo naturalmente após o IAM seria insuficiente para suprir células ainda vivas sob risco e a maior oferta de CPE poderia potencializar esta resposta (REYES et al, 2002; WATT et al, 1998).

A utilização de células-tronco da MO em experimentos de neovascularização baseia-se em consistentes resultados descritos na literatura, tendo sido utilizadas em modelos de isquemia miocárdica aguda e crônica, que foram conduzidos em diversos animais, utilizando-se as vias intracoronariana e transendocárdica (WATT et al, 1998; BACIAGALUPO, 2004; MINGUELL et al, 2001; ZVAIFLER et al, 2000; OSWALD et al, 2004; NAGAYA et al, 2005; LEE et al, 2003; UCHIDA et al, 2000; DEANS; MOSELEY, 2000).

O implante de células-tronco da MO foi capaz de melhorar tanto a contração e a perfusão miocárdica em modelos animais de miocardiopatia isquêmica crônica. Modelos de membros isquêmicos de animais também foram bem sucedidos na neovascularização utilizando essas células (MUROHARA et al, 1998; REYES et al, 2002; MINGUELL et al, 2001; ZVAIFLER et al, 2000; NAGAYA et al, 2005; LEE et al, 2003; UCHIDA et al, 2000; DEANS; MOSELEY, 2000).

O primeiro caso do uso de células-tronco da MO humano para o tratamento de miocardiopatia, descrito na literatura, refere-se à realização de injeções dessas células, sua fração mononuclear, por via coronariana em um paciente após o IAM, com segurança. Após, seguiu-se o relato de uma série de 20 pacientes após o IAM, dos quais 10 foram utilizados para o grupo de controle e tratados por angioplastia primária tardiamente (12 horas após o IAM), sendo que, os outros dez foram para o grupo de transplante de células. Os critérios de inclusão foram à ausência de viabilidade miocárdica na área infartada ou fração de ejeção do ventrículo esquerdo inferior a 40%. Esses pacientes foram submetidos ao transplante de células entre quinto e nono dias após o IAM. As células foram injetadas no lúmen através de um balão de angioplastia, o guia foi insuflado no local da lesão responsável pelo IAM. Ao final de três meses os pacientes, que receberam as células, apresentaram melhora da contratilidade na área infartada, assim como redução do volume sistólico final (redução de 18%), sugerindo um efeito benéfico no remodelamento cardíaco. Na análise da perfusão em repouso com tálho houve redução da área com defeito de perfusão em 26% (STRAUER et al, 2002; ASSMUS et al, 2002). Em outro estudo,

as células-tronco da MO foram selecionadas a partir do sangue periférico e expandidas *in vitro* de 11 pacientes e de outros 09 pacientes coletadas da MO, a fração mononuclear e as células á fresco foram utilizadas por infusão por via intracoronariana após quatro dias do IAM, em pacientes tratados por angioplastia primária, e concluíram por uma redução da área de necrose ao final de quatro meses. Nos pacientes avaliados por tomografia com emissão de pósitrons houve aumento de 15% na captação de 18 Fluorodeoxiglicose na área infartada. Paralelamente, houve significativa redução de 25%, no volume sistólico final, associada à melhora da fração de ejeção, ambos não observados em um grupo controle não randomizado (n=11). Houve melhora da contratilidade regional mesmo em pacientes que não tiveram critérios de viabilidade miocárdica ao ecocardiograma com dobutamina e a ressonância magnética cardíaca (WOLLERT et al, 2004; CHEN et al, 2004).

Outros autores estudaram os efeitos do implante transendocárdio de células-tronco da MO: a fração mononuclear, com o auxílio de cateteres, em pacientes com miocardiopatia isquêmica grave e sem a possibilidade de revascularização miocárdica convencional. 14 pacientes foram submetidos à terapia celular e complicações maiores não foram descritas. Todos os pacientes receberam as altas hospitalares após 48 horas de tratamento. Um ano após estes pacientes demonstraram melhora significativa dos sintomas e da perfusão miocárdica, com redução da área de isquemia de 15,1% para 4,5% da área do ventrículo esquerdo (p=0,02), redução do volume sistólico final em 15% (p=0,03) e melhora relativa de 31% na fração de ejeção (p=0,0004) em dois meses no grupo tratado. O grupo controle, não apresentou melhora em nenhum dos parâmetros avaliados (PERIN et al, 2003a). No primeiro estudo randomizado para humanos foram incluídos 60 pacientes. 30 pacientes foram randomizados para o grupo tratado com células-tronco da MO, a fração mononuclear, por via intracoronariana na miocardiopatia isquêmica crônica. Outros autores publicaram os resultados do primeiro estudo clínico randomizado e controlado por placebo, do implante intracoronariano dessas células de pacientes após IAM. Em outro estudo, 69 pacientes foram randomizados para injeção intracoronariana de CTME da MO ou solução salina. E três meses

após, houve a melhora da contratilidade segmentar nos pacientes do grupo tratado em relação ao grupo controle (WOLLERT et al, 2004; KAWADA et al, 2004).

Até o presente momento cinco estudos clínicos do implante intracoronário de células-tronco da MO, a fração mononuclear após o IAM foram publicados, totalizando a inclusão de 214 pacientes, com um seguimento máximo de um ano. Nenhum efeito adverso relacionado ao procedimento de injeção ou a ação das células-tronco da MO no organismo foi relatado (TOMA et al, 2002; KAWADA et al, 2004).

Como descrito, o uso das células da MO parece ter efeitos benéficos nas lesões isquêmicas agudas do miocárdio, em regiões onde a falta de circulação é o fator desencadeante e onde ainda não houve perda de cardiomiócitos. Os estudos demonstram a capacidade angiogênica tanto das frações mononucleares não purificadas como das CTME.

2.3.2 Terapia celular para a miogênese

2.3.2.1 Transplante de fibroblastos

Estudos demonstraram a transformação dos fibroblastos nos cardiomiócitos. Os fibroblastos do coração de cães foram isolados, submetidos à cultura celular e infectados com um retrovírus, contendo o gene MyoD e β -galactosidase, sendo esses injetados nos corações infartados de quatro cães, após seis dias do infarto do miocárdio. A eutanásia desses animais foi realizada após doze dias do transplante, sendo essas células identificadas pela marcação com a β -galactosidase, comprovando o sucesso da transferência gênica em três animais. Nas áreas onde a determinação da beta-galactosidase foi positiva, os anticorpos anti-isoforma rápida da miosina marcaram positivamente a miosina de cadeia pesada, indicando regeneração do músculo esquelético. Os autores verificaram a existência da conversão dos fibroblastos em células capazes de expressar as proteínas de contração rápida da cadeia pesada, porém, não identificaram a presença dos miotubos (LAFLAMME et al, 2002).

2.3.2.2 Transplante de células cardíacas adultas

Estudos *in vivo* demonstraram que, o cardiomiócito adulto não sofre processo de diferenciação celular, mas aumenta a massa miocárdica por meio de sua hipertrofia como consequência de um fator desencadeante (MULLER-EHMSEN et al, 2002).

A remodelação ventricular esquerda decorrente do infarto do miocárdio depende basicamente, do local e da expansão desse infarto. Primeiramente, após o estabelecimento da fibrose miocárdica, ocorre hipertrofia dos cardiomiócitos adultos viáveis restantes. Este aumento da massa das células cardíacas e contráteis tenta a compensação da perda de parte do ventrículo esquerdo comprometida pela fibrose. Caso a hipertrofia consiga manter a função cardíaca normal, todo o processo tem tendência de estabilização. Entretanto, caso o infarto seja mais extenso e a hipertrofia dos cardiomiócitos restantes não seja capaz de recuperar a função cardíaca normal, o ventrículo esquerdo inicia sua dilatação, dando início à remodelação ventricular, que pode induzir insuficiência cardíaca. Inicialmente, o processo de remodelação tem como objetivo recuperar o volume de ejeção normal do ventrículo esquerdo (BARDORFF et al, 2003; KAWADA et al, 2004).

Assim, mesmo as áreas não acometidas pelo infarto podem contribuir com o aumento do volume diastólico final do ventrículo esquerdo. O dogma de que, o coração não pode aumentar o número de cardiomiócitos, foi abandonado após a demonstração de regeneração de cardiomiócitos provenientes de células-tronco cardíacas e extra-cardíacas; no entanto, esta capacidade é limitada e insuficiente. A resposta predominante, fisiológica, do miocárdio é a de aumentar a síntese de sarcômeros e conseqüentemente, aumentar o tamanho dos cardiomiócitos devido à hipertrofia. Esta tentativa de recuperar a atividade normal é acompanhada pela dilatação do ventrículo esquerdo e o prognóstico após o infarto do miocárdio baseia-se no volume diastólico final e na capacidade de remodelação do ventrículo esquerdo, determinando o índice de sobrevivência (ANVERSA et al, 2006).

Em outro estudo, a mutação oncogênica do cardiomiócito adulto foi induzida e com o objetivo de avaliar: a viabilidade do transplante do cardiomiócito atrial adulto (AT-1) no miocárdio, de ratos para analisar a estabilidade do enxerto no miocárdio e

seus possíveis efeitos deletérios na função cardíaca. Os cardiomiócitos atriais foram obtidos a partir de biópsias atriais e isolados por digestão enzimática. Estas células foram cultivadas e transplantadas no miocárdio de 14 animais singênicos em um grupo de estudo de 20 ratos, sendo os demais controles. A análise histológica, com o auxílio do anticorpo anti-T-Ag no miocárdio após quatro meses de terapia, demonstrou presença de células AT-1 identificadas pela imunoperoxidase e que as células AT-1 mantiveram a atividade mitótica. Não houve relato de arritmia cardíaca relacionada ao transplante dessas células. Os autores observaram que, apesar de não terem sido identificadas as junções *GAP* entre as células AT-1 e os cardiomiócitos adultos nativos, as células AT-1 mantiveram a capacidade de proliferação após o transplante no miocárdio e, desta forma, este pode servir como receptor estável para as células manipuladas *in vitro*, podendo ser útil para recombinações moleculares no coração (KOH et al,1993).

A viabilidade do transplante de cardiomiócitos adultos, em corações infartados foi também avaliada em 22 ratos adultos submetidos à criolesão miocárdica com nitrogênio líquido na parede livre do ventrículo esquerdo, entre os ramos coronários interventriculares, o anterior e o póstero-lateral esquerdo. Simultaneamente, foram realizadas biópsias de átrio esquerdo, seguidas de isolamento e expansão celular. Neste estudo, três semanas após a lesão miocárdica, foram transplantadas 2×10^6 células em 12 ratos, a injeção de meio de cultura na área infartada em dez ratos e não foram nem submetidos à criolesão miocárdica nem receberam células ou meio de cultura (grupo simulação) cinco ratos. A pureza das células transplantadas foi avaliada usando anticorpo monoclonal antimiosina que, identificou 90% de cardiomiócitos adultos. Após cinco semanas de injeção das células, a função ventricular esquerda foi avaliada pelo método de Langendorff que, identificou no grupo transplantado melhora da função ventricular esquerda em comparação com o grupo controle. O grupo simulação apresentou melhora da função ventricular esquerda entre todos os grupos. O estudo histológico com hematoxilina-eosina analisou a área infartada e a 5-bromo-2-deoxyuridina (BrdU) identificou a presença das células transplantadas vivas na área lesada do miocárdio. A área de fibrose e o volume ventricular esquerdo eram menores no grupo transplantado do que no grupo controle. Nos animais que, receberam transplante de cardiomiócitos adultos, não foi

encontrado infiltrado linfocitário. Os autores concluíram que, o transplante de células cardíacas atriais, no músculo cardíaco criolesado, limita a dilatação e a área lesada do ventrículo esquerdo e resulta em melhora da função cardíaca, comparada ao grupo controle. Acredita-se, portanto que, esta terapia pode diminuir a progressão da IC (STEINHELPER; FIELD, 1990).

2.3.2.3 Transplante de células cardíacas fetais

Na tentativa de identificar células ideais para serem transplantadas em corações de animais infartados, os cardiomiócitos fetais foram propostos, pois na realidade são células cardíacas propriamente ditas, apresentam auto-estimulação e ainda podem entrar no ciclo mitótico normal de evolução das células cardíacas.

Partindo deste princípio, um estudo realizado com 20 ratos, separados em dois grupos: um controle e outro grupo induzido infarto do miocárdio, por toracotomia esquerda e ligadura da artéria coronária esquerda. No grupo controle, foi praticado o transplante de cardiomiócitos fetais (2×10^6 células/campo) em três porções distintas do ventrículo esquerdo e no grupo com infarto, injetou-se o mesmo número de células na zona ao redor da fibrose. Os cardiomiócitos fetais foram obtidos pela captação do coração de fetos de ratas aos 20 dias de gestação. Quarenta e oito horas após a terapia celular, os ratos sofreram eutanásia. A análise histológica dos ventrículos esquerdos, com HE e imunohistologia com alfa-actina que, identificou na área infartada de 50% destes ventrículos analisados a presença dos cardiomiócitos fetais transplantados, tanto no grupo controle, como nos ratos infartados. Os autores sugeriram que existe viabilidade do transplante dos cardiomiócitos fetais na área infartada de ratos (SCORSIN et al, 2000).

Amparados em estudos anteriores que mostraram a viabilidade do transplante de cardiomiócitos fetais, foi procedido outro estudo com criolesão miocárdica na parede livre do ventrículo esquerdo de 28 ratos, em uma área de $54 \pm 11 \text{ mm}^2$. Após quatro semanas da lesão miocárdica, os animais foram transplantados com cardiomiócitos fetais (n=14), isolados no 18.º dia de gestação e infectados com *Plasmodium sp* contendo beta-galactosidase, na área comprometida. Nos corações dos animais do grupo controle (n=14), injetaram apenas o meio de cultura na região

do miocárdio lesado. Após quatro semanas do transplante, os cardiomiócitos fetais formaram tecido cardíaco demonstrado pela presença de positividade da beta-galactosidade na área lesada. Os cardiomiócitos fetais transplantados formaram sarcômeros e reação inflamatória linfocitária ocorreu independente da administração de ciclosporina (5mg/kg/dia). Após o transplante, houve angiogênese em relação ao grupo controle. Nenhum tecido muscular cardíaco regenerado foi encontrado no grupo controle. Vinte semanas após a terapia, a área de tecido transplantado era inferior à área de tecido transplantado após quatro semanas de terapia. Concluíram que, o tecido cardíaco formado pelo transplante de cardiomiócitos fetais no miocárdio criolesado diminuiu de tamanho com o tempo de evolução, provavelmente, em decorrência do processo de rejeição, já que foi identificado importante infiltrado linfocitário entre as células transplantadas (REINECKE et al, 1999; YOO et al, 2000).

Após os resultados satisfatórios do transplante de cardiomiócitos fetais no miocárdio infartado, o mesmo procedimento foi praticado em animais no modelo de miocardiopatia dilatada induzida por doxorrubicina em 37 camundongos pela via de administração intraperitoneal de 08 mg/kg e confirmada por ecocardiografia transtorácica modo M. Os animais foram separados em três grupos: grupo tratado (n=12) que recebeu injeção intramiocárdica de cardiomiócitos fetais contendo fator transgênico expressando a beta-galactosidase; grupo (n=15) que, recebeu equivalente volume de meio de cultura e o outro grupo (n=10) o qual não foi submetido à cirurgia. Um mês após a terapia, a nova análise ecocardiográfica, que registrou melhora da fração de ejeção do ventrículo esquerdo de 2,11% nos animais que, receberam o transplante de cardiomiócitos fetais em relação ao exame pré-operatório. Concluíram que, o transplante celular de cardiomiócitos fetais também pode melhorar a função ventricular esquerda de camundongos, neste modelo (LI et al, 1996).

2.3.2.4 Transplante de células musculares esqueléticas

O músculo esquelético adulto é formado por miofibras envoltas por reservas de células imaturas não ativas, mononucleadas e localizadas na sua membrana basal, denominadas células satélites (ASAKURA et al, 2002).

Após lesão muscular esquelética, química, física ou mecânica, essas células se ativam tornando-se hiperplásicas e proliferam para formar o mioblasto, que migra e funde-se com os demais mioblastos para formar miotubos para a formação de nova fibra muscular. As demais células esqueléticas ao redor da lesão fazem hipertrofia na tentativa de recuperar a função normal do músculo, em qualquer idade e em qualquer espécie animal (ASAKURA et al, 2002).

Baseados nos estudos anteriores com os cardiomiócitos adultos e fetais para o transplante no miocárdio infartado, e acreditando que esta terapia permitiria um avanço no tratamento de insuficiência cardíaca, injetaram uma linhagem imortalizada de ME, na circulação arterial por punção no ventrículo esquerdo, com o objetivo de atingir, tanto as artérias coronárias, como a circulação sistêmica. Essas células foram marcadas com beta-galactosidase. A análise histológica após quatro meses demonstrou que, apenas 5% do total das células injetadas, migraram para o coração nos capilares e no interstício do miocárdio, sendo identificada nesta fase a presença de miofilamentos e que, os ME injetados iniciaram a expressão de uma proteína cardíaca, a fosfolambina e a conexina-43. Esta última, é presente em mais de 90% das junções *GAP* que, compõem a estrutura típica do músculo cardíaco, o disco intercalar, sugerindo a existência de estímulo elétrico, essencial na contração cardíaca. Concluíram que, a injeção de células por via arterial poderia atingir o miocárdio, integrá-lo e inclusive sofrer transformação fenotípica (KO et al, 2000).

Um estudo foi realizado com o objetivo de determinar se os ME poderiam restabelecer a contratilidade miocárdica. Neste estudo, foi realizada a criolesão com nitrogênio líquido da parede anterior do ventrículo esquerdo, através de toracotomia lateral esquerda, de ratos Fisher; seguidos de biópsia muscular esquelética, isolamento e cultivo celular. A terapia celular foi realizada com a injeção intramiocárdio de 3×10^6 células, em quatro animais. Um dia e três meses após as terapias realizaram as eutanásias seguidas de análises histopatológicas (KO et al, 2000; MONTECINO-RODRIGUEZ et al, 2000).

Simultaneamente, outro estudo semelhante em ratos, com o transplante de mioblastos uma semana após a lesão miocárdica foi realizado. Injetaram 3×10^6 células na área comprometida (n=2), outro grupo (n=8) recebeu $4,5 \times 10^6$ células e um terceiro grupo (n=3) recebeu solução salina logo após a lesão miocárdica. Esses animais foram tratados por BRdU, por injeção subcutânea, um dia antes de serem sacrificados para a marcação dos ME por meio da detecção da síntese de DNA. Os ME foram identificados após a eutanásia, a partir de 24 horas seguintes ao transplante e distinguidos das células inflamatórias por sua morfologia (MONTECINO-RODRIGUEZ et al, 2000).

Neste mesmo estudo, os animais sofreram eutanásia de modo seriado a partir do terceiro dia após o transplante, permitindo o estudo da integração das células no tecido. Muitas células já haviam se fusionado e formado miotubos multinucleados após uma semana do transplante. As células transplantadas eram melhores reconhecidas como miofibras esqueléticas e muitas delas apresentavam estriações após duas semanas da terapia celular, pois os sarcômeros estavam bem formados e muitas apresentavam núcleos na periferia. Ilhas de músculos esqueléticos maduros foram observadas após sete semanas e com os diâmetros celulares maiores, comparando-os com o período de duas semanas. Não foi identificado nenhum músculo esquelético transplantado com infiltrado inflamatório ou com presença de atrofia. Após três meses do transplante, as células apresentavam a característica de ME maduro, com muitas miofibras multinucleadas na periferia e densidade vacuolar dentro do normal. Os diâmetros das fibras eram maiores do que no grupo com sete semanas de evolução, indicando que, os ME haviam se hipertrofiado neste período. Estes achados foram confirmados por microscopia eletrônica. Observaram, do ponto de vista funcional, que essas células poderiam estar auxiliando na contratilidade miocárdica e como consequência poderiam melhorar a função ventricular esquerda (MONTECINO-RODRIGUEZ et al, 2000).

Outro estudo evidenciou que a reação inflamatória, ocorrida durante os primeiros três dias após o transplante de ME em músculo esquelético periférico, é a responsável pela morte dos 70% de ME injetados, e que, drogas anti-inflamatórias poderiam reduzir a taxa de mortalidade. Com esse princípio, utilizou-se o fator de crescimento transformador- $\beta 1$ (TGF β -1) que, foi introduzido nos ME através de

vetores, como os retrovírus, permitindo, assim, a secreção de citocinas antiinflamatórias. Esses ME foram injetados no músculo esquelético tibial de ratos da mesma espécie e comparando com o grupo transplantado de mioblasto não tratado, os resultados demonstraram que o grupo com o TGF- β 1 apresentou redução de 20% da mortalidade dessas células (LI et al, 2004).

Para contrapor a importante mortalidade dos próprios ME transplantados, foi proposto outro estudo em ratos, com o objetivo de aumentar a quantidade de ME ofertados para o transplante. Neste estudo, o músculo esquelético foi pré-condicionado pela administração de 0,5ml de cloridrato de bupivacaína a 0,5%, no local, 48 horas antes da biópsia muscular, seguido de isolamento e cultivo celular por uma semana. O número de células satélites obtido desse procedimento foi superior ao número obtido pelo grupo controle. Neste mesmo estudo, os autores induziram o infarto do miocárdio, por meio da ligadura da artéria coronária circunflexa, em 66 ratos e uma semana após, os animais foram reoperados e randomizados em quatro grupos para tratamento na área infartada. No grupo controle (n=23) foi injetada solução de meio de cultivo, grupo de ME (n=11): $6,8 \times 10^6$, grupo (n=11): 50% ME: $3,5 \times 10^6$ células associado ao macerado muscular e outro grupo (n=11), macerado muscular. Os macerados eram realizados imediatamente após a ressecção dos fragmentos musculares. Todos os animais foram submetidos ao exame ecocardiográfico após o infarto do miocárdio e após dois meses de terapia. Na análise ecocardiográfica observaram melhora da fração de ejeção ventricular esquerda no grupo transplantado com ME cultivadas em relação ao grupo tecido muscular esquelético macerado associado às células e ao grupo de macerado muscular (40,92% vs 37,52% vs 30,34%, respectivamente). Em seguida, os animais foram sacrificados e os ME identificados com a utilização do anticorpo monoclonal antimiosina rápida. E concluiu-se que para o sucesso do transplante de ME é necessário submeter o músculo esquelético ao cultivo celular e transplantar o próprio ME, de modo autólogo (POUZET et al, 2000).

Estes mesmos autores na seqüência do estudo anterior analisaram a concentração de ME transplantados no miocárdio de ratos infartados na melhora da função ventricular esquerda. Concluíram haver uma relação direta entre o número

de ME injetados e a melhora da função ventricular esquerda, quando os são transplantados na miocardiopatia isquêmica crônica em ratos (POUZET et al, 2000).

Outro estudo randomizado experimental avaliou o transplante de ME *versus* cardiomiócitos no infarto do miocárdio em ratos: grupo controle (meio de cultivo), grupo de cardiomiócitos adultos e grupo de ME. Concluíram que após dois meses do transplante, houve melhora significativa da função ventricular esquerda em ambos os grupos com células, havendo estabilização da função ventricular naquele de cardiomiócitos adultos. O grupo controle apresentou piora significativa da função ventricular esquerda (SCORSIN et al, 2000).

2.3.2.5 Transplante de células musculares lisas

Com o objetivo de identificar o tipo de célula muscular ideal a ser transplantada, realizaram o transplante de células musculares lisas obtidas do estômago de embriões de rato de 18 dias de vida e mantidas em cultivo por 24 horas, em corações criolesados. A sobrevivência das células foi analisada especificamente na área de fibrose ventricular e a sua capacidade angiogênica. Neste estudo, 28 ratos foram distribuídos em três grupos. Terapia com células musculares lisas no miocárdio lesado (n=10); com injeção de meio de cultura (n=10) e um grupo “simulação” (n=8). Quatro semanas após a lesão do miocárdio, os animais foram submetidos à terapia. As análises, funcional pelo método Langendorff e histopatológica, foram realizadas após dois meses de terapia e demonstraram que no grupo que recebeu células a contratilidade foi superior ao grupo controle, mas inferior aos ratos de grupo “simulação” e hiperplasia da musculatura lisa na área do miocárdio necrosado e angiogênese respectivamente. Concluíram que o transplante de células musculares lisas é uma boa alternativa para aplicabilidade clínica e sugeriram o seu uso no transplante autólogo a partir da musculatura lisa do útero nas mulheres e do estômago nos homens (LI et al, 1999b).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 AMOSTRA

Todos os animais receberam cuidados em concordância com os Princípios de Cuidados com Animais de Laboratório, formulado pela Sociedade Nacional de Pesquisa Médica e Guia de Cuidados com Animais de Laboratório, preparada pela Academia Nacional de Ciências e publicado pelo Instituto Nacional de Saúde. Sendo que, apenas a terceira fase foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (registro na CEPA/PUCPR N°48), pois antes não havia sido estabelecido este comitê nesta instituição.

Os animais de laboratório utilizados neste projeto de pesquisa foram: ratos albinos machos, não consanguíneos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*).

Primeira fase: animais recém-nascidos, machos, com três a quatro dias de vida e animais de idade aproximada de três meses, de peso variando de 80-100 gramas.

Segunda fase: animais de idade aproximada de três meses, machos, de peso variando de 250-350gramas.

Terceira fase: animais de idade aproximada de dois meses, machos, com peso variando de 150-200 gramas no início do estudo e 10 meses, de peso variando de 350-400 gramas no final do estudo.

3.2 CUIDADOS GERAIS PARA OS ANIMAIS

3.2.1 Condições do biotério

Os animais experimentais foram acomodados no Biotério da Pontifícia Universidade Católica do Paraná. No biotério foi fornecida água *ad libitum* com acesso livre, ração padronizada para a espécie (Nuvilab CR-1[®], Nuvital, Colombo – PR, Brasil) e foram alojados em caixas de polipropileno com grade, com lotação máxima de cinco animais por caixa. Estas foram mantidas em jornadas com ciclos de luz de 12 horas em 12 horas, alternando com o escuro, sob sala submetida à temperatura constante de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade do ar própria do ambiente. O cepilho foi trocado em dias alternados para a manutenção da higiene.

3.2.2 Condições de laboratório

Os isolamentos dos materiais foram obtidos por lavagem dos fêmures após eutanásia (primeira fase) e técnica de punção-aspiração (primeira, segunda e terceira fases) para o sangue da MO; fragmentos musculares após eutanásia (primeira fase) ou biópsia de músculo esquelético para o isolamento de ME (primeira, segunda e terceira fases), no Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da PUCPR. Os isolamentos e cultivos celulares foram realizados no Laboratório Experimental de Cultivo Celular da PUCPR. Os exames ecocardiográficos, a indução do infarto do miocárdio e os transplantes foram realizados no Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da PUCPR.

Todos estes procedimentos foram executados sob condições assépticas, sendo os isolamentos de células, em cabine de segurança biológica classe II, e todas as soluções utilizadas no processo foram rigorosamente controladas quanto à esterilidade e composição.

3.2.3 Pesagem

Os animais foram pesados durante todos os períodos precedendo os procedimentos anestésicos e eutanásia, permitindo os cálculos da posologia dos medicamentos. Os períodos foram os seguintes: lavagens de fêmures, técnica de punção-aspiração, eutanásias ou biópsias de músculo esquelético, exames ecocardiográficos, induções do infarto do miocárdio, transplantes.

A balança de precisão utilizada foi Marte[®] (modelo ASF11), com três casas decimais e sensibilidade de 0,01g aferida pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (Inmetro).

3.2.4 Anestesia

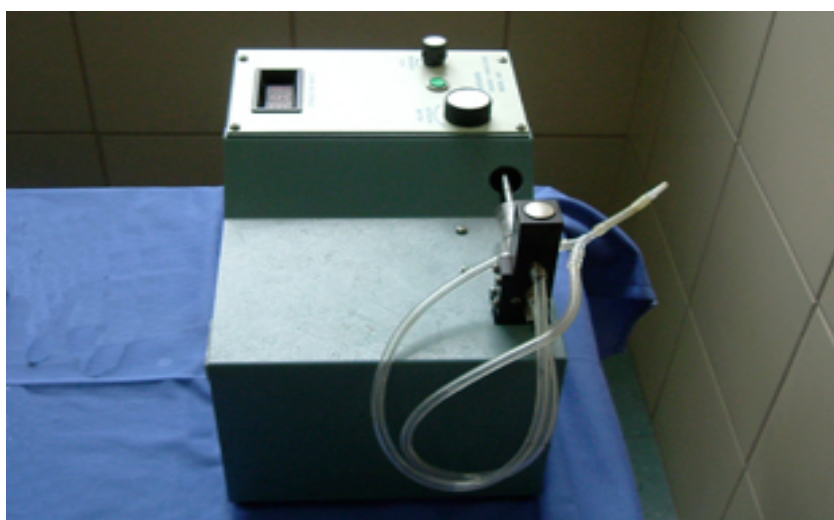
Todos os animais foram submetidos à anestesia geral com a associação de 50mg/kg/peso de ketamina (sedativo e bloqueador neuro-muscular), (Ketalar[®] Laboratórios Parke & Davis) e 10mg/kg/peso xilazina (sedativo e analgésico),

(Xilazina[®]), ambos por via intramuscular. Para certificação do efeito anestésico, foram observadas as ausências de reflexos neuromusculares (SCORSIN et al, 2000).

3.2.5 Ventilação mecânica

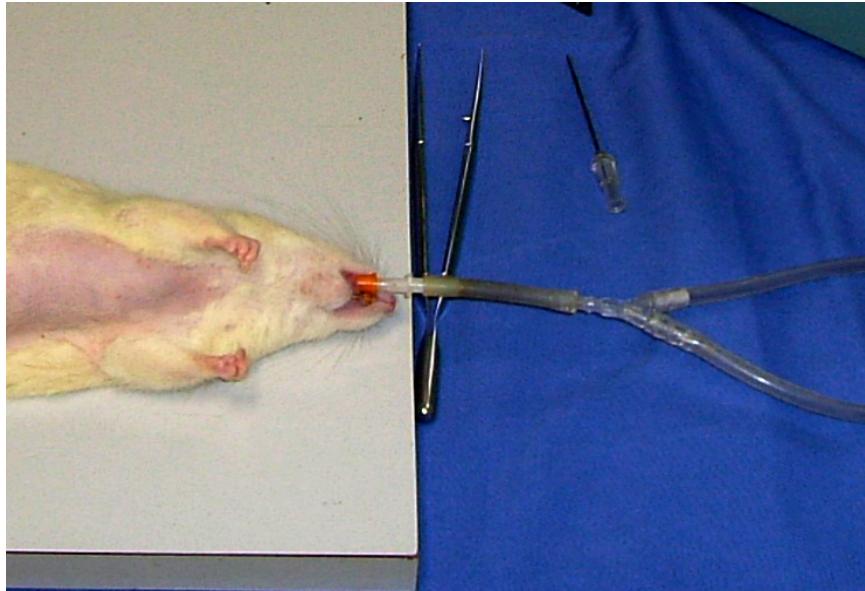
Esta técnica foi utilizada para os procedimentos de indução do infarto e terapia celular. Todos os animais foram entubados e ventilados com os respiradores de volume (HAVARD[®], Inc., respirador modelo 683, Massachusetts, USA), idealizados para animais de pequeno porte com oxigênio a 21% do ar ambiente (figura 02).

FIGURA 02. RESPIRADOR DE VOLUME.



Após anestesia, a via aérea definitiva foi obtida através da intubação orotraqueal com cateter venoso periférico número 14. O cateter foi conectado ao sistema de ventilação mecânica com o volume de 2,5mL, na frequência de 50 ciclos por minuto observando-se a expansão dos pulmões (figura 03).

FIGURA 03. ANIMAL COM TUBO ENDOTRAQUEAL CONECTADO AO SISTEMA DE VENTILAÇÃO MECÂNICA.



3.2.6 Materiais operatórios

Os materiais utilizados para as punções-aspiração do sangue da medula óssea de cristas ilíacas, lavagem dos fêmures e coleta dos fragmentos musculares, biópsias de músculos esqueléticos e transplantes dos animais, bem como para o transplante de células foram: pinças vasculares, portas-agulhas, tesouras, auto-estático e fio monofilamentar de náilon 4.0, seringas, heparina, agulhas, gases, luvas cirúrgicas, polivinilpirrolidona-iodo e solução fisiológica 0,9%.

3.2.7 Eutanásia

Todos os animais que foram submetidos à eutanásia receberam a dose letal (DL50) (148 mg/kg) do anestésico ketamina (SCORSIN et al, 2000).

3.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS DA PRIMEIRA FASE

3.3.1 Delineamento do estudo da primeira fase

Inicialmente, 05 ratos Wistar, adultos e 05 ratos Wistar, recém nascidos foram submetidos à eutanásia para coletas de sangue da MO e de fragmentos biópsias de músculo esquelético, para os isolamentos de células-tronco mononucleares e células satélites, respectivamente, visando o procedimento de co-cultivos nas proporções de 1:1; 1:2 e 2:1, em todos os animais para análises morfológicas *in vitro* quanto às confluências nos substratos.

A seguir aquela distribuição que, demonstrou maior confluência de acordo com as observações morfológicas *in vitro* foi reproduzida em nove grupos de ratos, adultos, cada grupo com dois animais. Vinte animais foram submetidos à eutanásia para coletas de sangue da MO e de biópsias de músculo esquelético para os isolamentos de células-tronco mononucleares e mioblastos esqueléticos, respectivamente visando o procedimento de co-cultivos autólogos para análises de proliferação *in vitro*. Então foram realizados os cálculos de índice de proliferação celular e análises estatísticas.

3.3.2 Isolamento de mioblastos esqueléticos (bio-separação)

O Isolamento de células satélites foi a partir de fragmentos musculares dos quatro membros de dois ratos recém-nascidos imediatamente *post-mortem*, para a primeira etapa na primeira fase e biópsias musculares para a segunda etapa na primeira fase e seguidos de cisalhamento muscular e de dissociação enzimática de acordo com a técnica de Delaporte (figura 04) (DELAPORTE et al, 1984).

Realizadas as contagens de células satélites com auxílio da câmara de Neübauer (Hemocitômetro).

FIGURA 04 - MEMBROS DOS ANIMAIS RECÉM-NASCIDOS PARA A REALIZAÇÃO DA RETIRADA DOS FRAGMENTOS MUSCULARES.



3.3.2.1 Detalhamento do método de isolamento de mioblastos esqueléticos

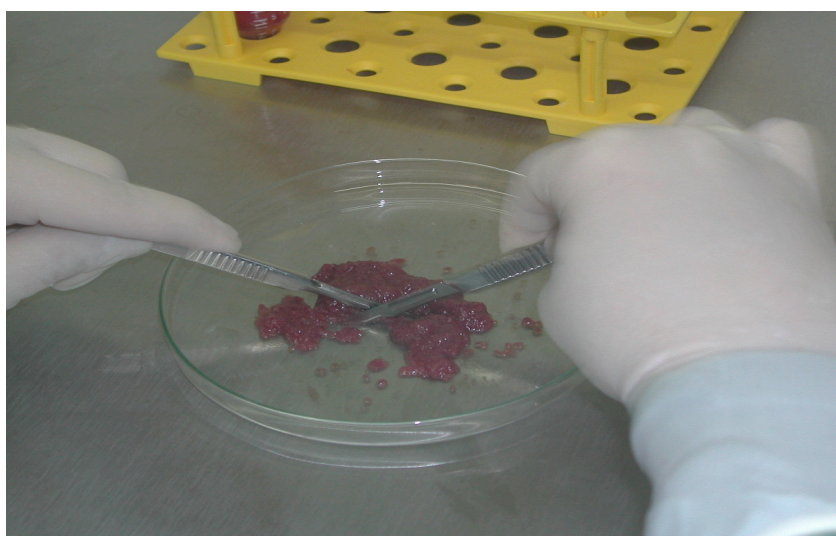
Para a obtenção das células satélites, biópsias e fragmentos de músculos tibiais anteriores serão realizadas nos ratos, precedidos de anestesia. Em uma placa de Petri o músculo foi colocado no meio de cultivo: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco® BRL, Life Technologies, Inc., Grand Island, NY), a 1% de antibiótico (penicilina, 100µg/mL e estreptomicina, 100µg/mL), com auxílio de uma lupa, retirando-se os vasos e tecidos conjuntivos: aponeuroses e tecido gorduroso. Os fragmentos foram transferidos para outra placa de Petri com meio a 1% de antibiótico. Seguiu-se a limpeza e o macerado muscular, este realizado pela redução do músculo em pequenos fragmentos, quase secos e triturados com o auxílio de duas lâminas de bisturi em cisalhamento (figura 05).

Após seguiu-se lavagem do macerado muscular com meio de cultura com cerca de 15mL, centrifugado a 350g por 6 minutos. O sobrenadante foi desprezado, sendo o precipitado pesado. Logo após ocorreu a digestão enzimática; o pélete de músculo recuperado em 10 mL de colagenase do tipo I (Sigma®, USA), por uma hora à 37°C na incubadora, sendo que a cada 10 minutos deve sofrer agitação manual. Após centrifugação a 350rpm por 6 minutos. Se muito viscoso, adicionado o meio (figura 06).

O pélete de músculo foi recuperado em 10 mL de tripsina a 0,05% (GIBCO® BRL, Life Technologies, inc., Rockville-USA RL) por 20 minutos em incubadora sendo que a cada 10 minutos sofreu agitação manual. Interrompeu-se a digestão enzimática com um mililitro de soro bovino fetal (SBF) (GIBCO® BRL-Life Technologies, inc., Rockville-USA RL), equivalente a 10% do volume; seguido homogeneização. Nova centrifugação a 400rpm por 7 minutos; retirado o sobrenadante e ressuspendido em volume de 05mL de meio de cultivo, sem SFB. A Filtração foi realizada sobre microfiltros de náilon de 100 micrometros e 40 micrometros (se muito viscoso, adicionado o meio) e após foi centrifugado a 400rpm por 7 minutos.

Recuperado o pélete em meio completo de cultivo e transferido para placas de acordo com o propósito: cultivo isolado de ME ou co-cultivo de ME e de CTME.

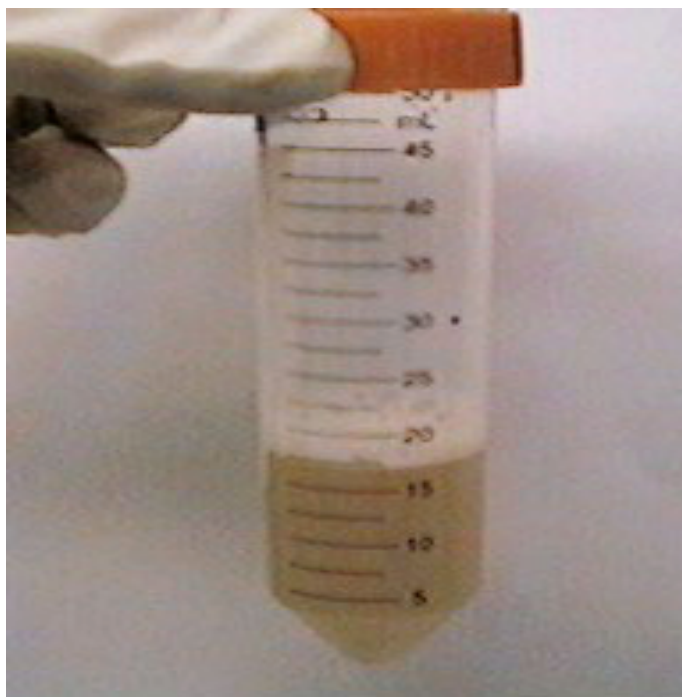
FIGURA 05 - MACERAÇÃO MUSCULAR



3.3.3 Viabilidade celular

A análise de viabilidade celular foi realizada por contagem direta em hemocitômetro com o auxílio de coloração do Azul de Trypan a 5% (Merck®, USA).

FIGURA 06. MACERADO MUSCULAR DILUÍDO EM COLAGENASE.



3.3.4 Isolamento de células-tronco mononucleares (bio-separação)

O isolamento de células-tronco mononucleares: Para a coleta do sangue da medula óssea foram realizadas lavagens dos fêmures dos animais com o auxílio de heparina e meio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM) (GIBCO® BRL, Life Technologies, inc., Rockville-USA) para a primeira etapa na primeira fase e por punção-aspiração para a segunda etapa na primeira fase, sendo este material processado imediatamente para o isolamento das células mononucleares, utilizando gradiente de densidade, Ficoll-Hypaque ($d= 1.077$) de acordo com a técnica de Boyum (figuras 7A, 7B e 8) (BOYÜM, 1968).

FIGURA 07A E 07B. FÊMURES DISPOSTOS EM PLACA DE PETRI. LAVAGEM DO FÊMUR COM O AUXÍLIO DA HEPARINA, RESPECTIVAMENTE.

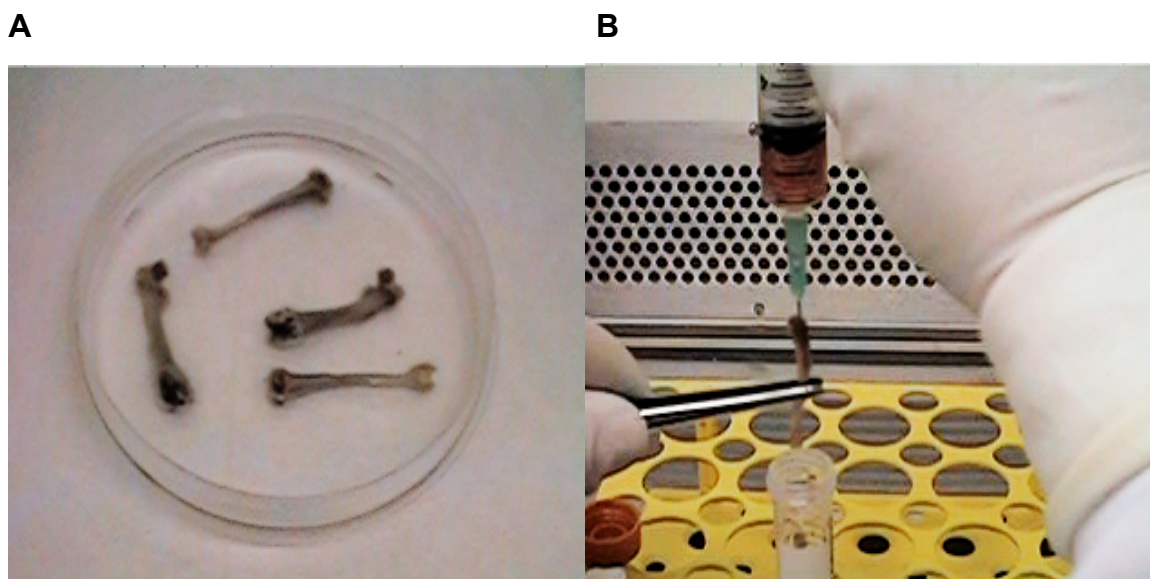
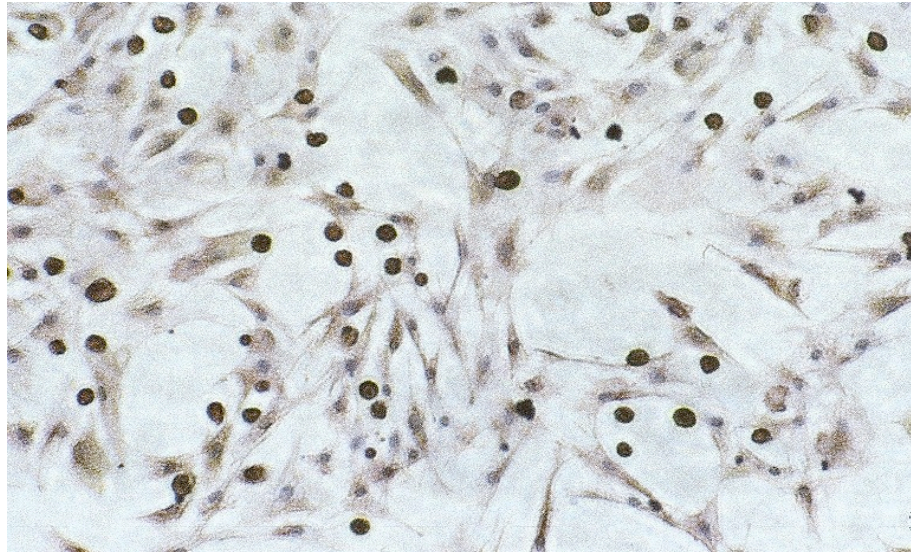


FIGURA 08 - PUNÇÃO-ASPIRAÇÃO DO SANGUE DA MEDULA ÓSSEA.



A origem mesenquimal das células aderentes ao frasco foi confirmada por imunocitoquímica, com o auxílio do anticorpo anti-vimentina (Peroxidase-Sigma[®], IMM-10, Vimentine S-20 Santa Cruz Biotechnology[®]) por imunoperoxidase (figuras 09-12). Realizadas as contagens de células mononucleares com auxílio da câmara de Neübauer (Hemocitômetro).

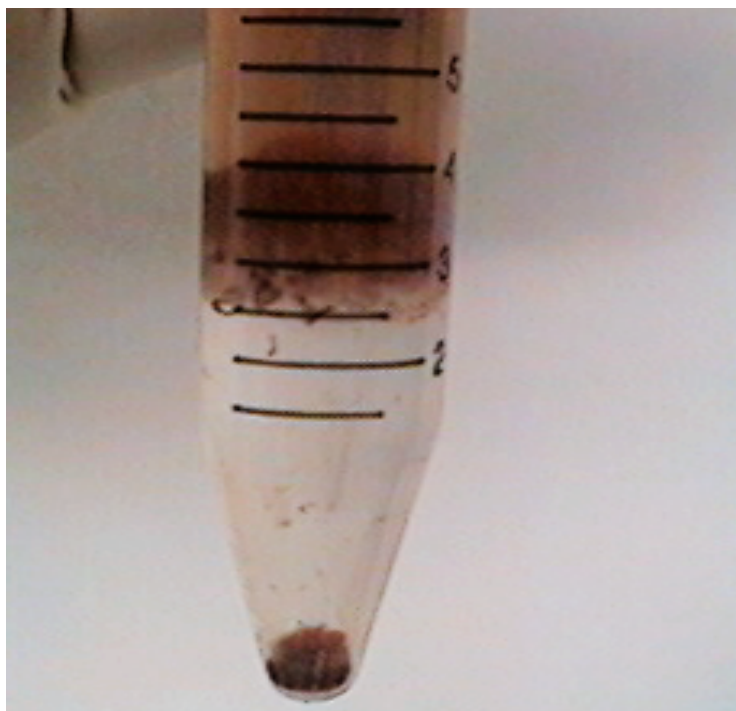
FIGURA 09 - CTME *IN VITRO* IDENTIFICADAS A SUA ORIGEM MESENQUIMAL COM AUXÍLIO DE ANTICORPO ANTI-VIMENTINA (100X, M.O).



3.3.4.1 Detalhamento do método de isolamento das células-tronco mononucleares

O sangue extraído da medula óssea dos fêmures através de lavagens com heparina e meio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM) (GIBCO® BRL, Life Technologies, inc., Rockville-USA) ou da punção-aspiração. O material coletado foi adicionado em nove mililitros de IMDM, suplementado com 1% de antibiótico (penicilina: 100µg/mL e estreptomicina: 100µg/mL) e 20% de tampão fosfato salino (PBS) (GIBCO® BRL, Life Technologies, inc., Rockville-USA), sendo acrescido de três ml de solução de gradiente de densidade ($d=1.007$, Ficoll-Hypaque-SIGMA®) e de acordo com Boyum, seguida de centrifugação por 40 minutos a 400rpm em temperatura de 18°C. Após a centrifugação, foi aspirado cinco mililitros da camada de plasma junto ao meio e descartado, seguido de remoção cuidadosa do anel de células mononucleares e de sua transferência para outro tubo de 15mL, completando-o com o IMDM, seguida de centrifugação a 400rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi então desprezado e o precipitado foi re-suspenso em IMDM e novamente centrifugado a 400rpm por 10 minutos, sendo retirado e desprezado o sobrenadante (figura 10) (BOYÜM, 1968).

FIGURA 10 - ANEL FORMADO DE CÉLULAS-TRONCO MONONUCLEARES.



3.3.5 Bioprocesso de co-cultivo

O meio utilizado foi o meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (GIBCO® BRL, Life Technologies, Inc., Grand Island, NY), suplementado com 15% de soro bovino fetal (SBF) (GIBCO® BRL-Life Technologies, inc., Rockville-USA RL), 1% de Antibiótico (penicilina, 100µg/mL e estreptomicina, 100µg/mL) e 10ng de Fator I de crescimento de Insulina tipo I (IGF-I) (Gibco® BRL, Life Technologies, Inc., Grand Island, NY), e dexametasona (Sigma®,USA). As células foram distribuídas em proporções variáveis, mantendo-se a concentração final de 05×10^5 por mililitro: células satélites / células mononucleares: 2:1, 1:1, 1:2; e mantidas em estufa de CO₂ a 37°C; seguida de observações morfológicas acerca da sobrevivência das células, adesão ao substrato e confluência. Observou-se que a proporção 2:1 teve a melhor confluência celular, optando-se por esta proporção para o seu co-cultivo durante 14 dias e realizada a avaliação da proliferação. A concentração inicial foi de 5.0×10^5 por

mililitro, células por frasco de 25cm² com o volume de cinco mililitros (total=2.5x10⁶ células por frasco) para todas as amostras em triplicatas dos animais.

3.3.6 Manutenção do co-cultivo

Na seqüência do co-cultivo, após 48 horas da primeira distribuição nos frascos, as células não aderentes foram aspiradas dos frascos, restando apenas células aderentes: ME, fibroblastos e CTME, seguidos de lavagem com PBS e seguidos de troca do DMEN suplementado com 20% de SFB, 1% de antibiótico (penicilina: 100µg /mL e estreptomicina: 100µg/mL) e 10ng de Fator I de Crescimento de Insulina (IGF-I) (Gibco[®] BRL, Life Technologies, Inc., Grand Island, NY). Após 14 dias de cultivo foram observadas as concentrações celulares em cada frasco.

O Cultivo celular foi mantido por 14 dias, em incubadora em 37.5°C e 5% de CO₂ (figuras 12,13 e 14). Para as subculturas, na dependência da confluência celular, as células foram desagregadas do substrato com o auxílio da tripsina e após dois minutos, foi interrompida sua ação com 20% de SBF. As células re-suspensas em DMEN, completando para 15mL e transferido para tubo de igual volume. Seguiu-se a centrifugação a 400rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi re-suspensão em DMEN.

FIGURA 11 - CO-CULTIVO DE ME E CTME APÓS 14 DIAS DE SEMEADURA.

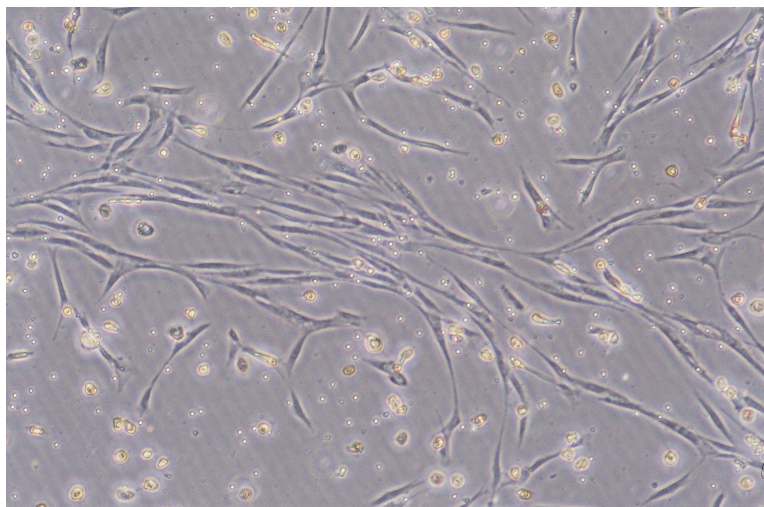
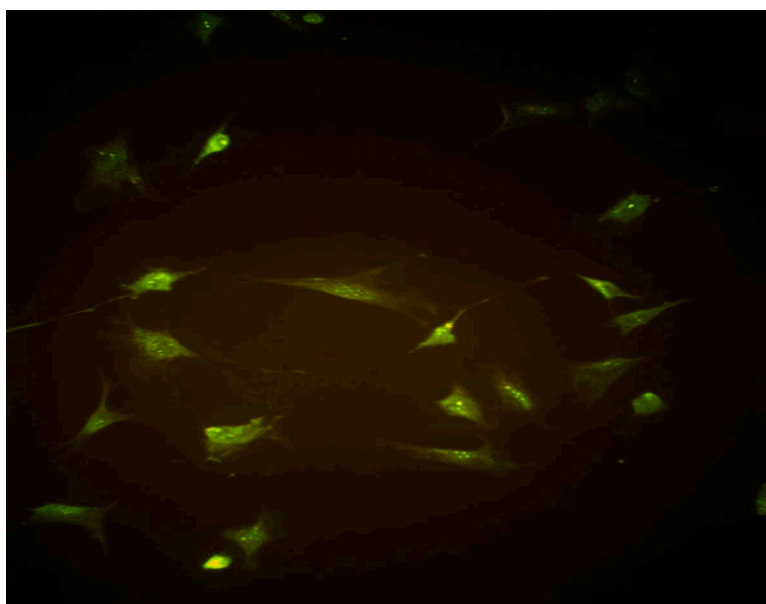


FIGURA 12 - ME IDENTIFICADOS COM ANTICORPO ANTIMIOSINA RÁPIDA NO CO-CULTIVO DE ME E CTME EM 14 DIAS (400X, M.O - FITC).



3.3.7 Recuperação do Bioproduto

Lavagem dos frascos de cultivo com PBS sem Cálcio (GIBCO® BRL, Life Technologies, inc., Rockville-USA RL), seguidos de enzima tripsina á 0,05% (GIBCO BRL®, Life Technologies, inc., Rockville-USA RL) com película líquida cobrindo a extensão da superfície cultivada por dois minutos. Interrupção da ação enzimática

com 10% do volume da enzima aplicada de SBF (GIBCO® BRL, Life Technologies, inc., Rockville-USA RL). Coleta do material com auxílio de pipeta, transferindo-o para tubo de centrífuga, seguido de centrifugação a 500g por dez minutos. O sobrenadante foi desprezado, restando o pélete ou precipitado que é a biomassa, o bioproduto celular.

3.4 RESÍDUOS

3.4.1 Resíduos do bioprocesso- classificação

Os resíduos foram classificados de acordo com Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde, emitido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Resolução RDC n.º 306, de 07 de dezembro de 2004): Classificação do resíduo: A – infectantes, B – químicos, C – radioativos, D – comum e E – perfuro-cortantes para as etapas distintas do Bioprocesso.

3.4.2 Resíduos do isolamento de células-tronco mononucleares e para cada animal.

Infectantes líquidos resíduos resultantes da filtração da medula óssea, meio de cultivo cerca de 20mL; solução de gradiente de densidade (Ficoll-Hypaque), três mililitros de azul de Trypan, células sanguíneas, juntamente com o meio de cultivo. Infectantes sólidos: Beckers: 50 cm³; pipetas descartáveis de cinco e dez mililitros (10 unidades de cada); tubos plásticos cônicos: de 10 mL (seis unidades). Comum: Papel estéril de celulose e plásticos das embalagens dos recipientes. Perfurocortantes: seringas e agulhas (duas unidades).

3.4.3 Resíduos do isolamento de células satélites e para cada animal.

Infectantes líquidos resíduos resultantes da maceração do músculo, cerca de dois mililitros do meio de cultivo. Infectantes sólidos: placas de petri, pinças metálicas, pipetas descartáveis de cinco e dez mililitros (10 unidades cada); tubos plásticos cônicos: de 10 mL (seis unidades) e frascos plásticos de cultivo (três

unidades). Comum: Papel estéril de celulose e plásticos para embalagens dos recipientes. Pérfurocortantes: lâminas de bisturi (duas unidades).

3.4.4 Da manutenção e subcultivos

Os resíduos líquidos infectantes obtidos da manutenção são cerca de 10mL de meio de cultivo contendo tripsina e SFB. Infectantes sólidos: tubos plásticos cônicos de 10 mL (três unidades) e pipetas descartáveis de cinco e dez mililitros (seis unidades). Comum: Papel estéril de celulose e plásticos de embalagem dos recipientes. Os materiais pérfurocortantes não foram utilizados.

3.4.5 Recuperação do bioproduto

Líquidos: meio de cultivo contendo tripsina e SFB, volume de 10 mL. Infectantes sólidos: papel estéril de celulose de embalagem dos recipientes como de tubos plásticos cônicos: de 10 mL (03 unidades). Os materiais pérfurocortantes não foram utilizados.

3.5 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

3.5.1 Concentração celular

Testou-se a hipótese nula de resultados iguais de concentração celular no início e após 14 dias (ou seja, ausência de proliferação) versus a hipótese alternativa de concentrações diferentes. Para tanto, adotou-se o teste não-paramétrico de Wilcoxon, considerando-se o nível de significância de até 5%. Os valores determinados foram os: mínimo, máximo, mediana, média e desvio padrão da concentração foram determinados após 14 dias e os valores da diferença entre as concentrações: final e inicial.

O índice de proliferação (IP) para cada um dos animais foi calculado por: $IP =$

$$\frac{N_t}{\frac{N_0 - 2}{T}}$$

, onde N_t = número de células finais; N_0 =número de células iniciais, T =tempo

entre o início e o fim em dias (=14 neste estudo) (CARVALHO et al, 2006a).

3.6 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS DA SEGUNDA FASE

3.6.1 Delineamento do estudo da segunda fase.

Cento e vinte e cinco ratos Wistar foram submetidos ao infarto agudo e os animais que apresentaram fração de ejeção ventricular esquerda inferior a 40% foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: grupo controle (DMEN); grupo de CTME, grupo de ME e grupo co-cultura. A análise funcional por ecocardiografia foi realizada em dois momentos: uma semana após o infarto do miocárdio e um mês após o transplante. Seguiram-se as análises estatísticas e histopatológicas após eutanásia. Nesta fase, os transplantes de co-cultivos foram heterólogos, tendo os animais na sequência do transplante iniciado com ciclosporina intraperitoneal na dose 5mg/kg de peso por 30 dias.

3.6.2 Isolamento de células satélites (bio-separação).

O Isolamento de células satélites foi a partir de fragmentos obtidos por biópsia muscular de tibial anterior de ratos machos adultos seguidos de cisalhamento dos músculos e de dissociação enzimática de acordo com a técnica de Delaporte (DELAPORTE et al, 1984).

3.6.3 Cultivos de mioblastos esqueléticos.

As células foram distribuídas em frascos de cultivo de 75 cm², na concentração de 05×10^5 /mL para a sua expansão. 48 horas após, os frascos de cultivo foram lavados com PBS e seguidos de troca do HAM-F12 (GIBCO® BRL Life Technologies, inc., Rockville-USA) suplementado com 20% de soro fetal bovino SFB, 1% de antibiótico (penicilina: 100µg/mL e estreptomicina: 100µg/mL) e 10ng de Fator de Crescimento de Fibroblasto (Gibco® BRL, Life Technologies, Inc., Grand Island, NY).

3.6.4 Manutenção do cultivo de mioblastos esqueléticos

O meio utilizado para a sua manutenção foi o HAM-F12 suplementado com 15% de SFB e 10ng de FGF, sendo trocado a cada 48 horas. As subculturas foram repicadas com o auxílio de tripsina a 0,05% conforme a confluência celular. Entende-se por confluência o preenchimento da área de superfície do frasco de cultivo em torno de seus 2/3 por células aderidas, sendo esta observação morfológica e sujeita à variabilidade do observador.

3.6.5 Isolamentos de células-tronco mononucleares (bio-separação)

A coleta do sangue da medula óssea foi realizada por punção-aspiração da medula óssea, sendo este material processado imediatamente para o isolamento das células mononucleares, utilizando gradiente de densidade, Ficoll-Hypaque (d= 1.077) de acordo com a técnica de Boyüm (BOYÜM, 1968).

3.6.6 Identificação celular

As células-tronco mononucleares foram identificadas por marcadores: CD45⁺ e CD 34⁺ (Clone OX-1 e Clone 581, Becton-Dickson®) por imunofenotipagem e quantificados por citometria de fluxo. Realizada a contagem das células satélites e mononucleares com auxílio da câmara de Neubauer.

3.6.7 Viabilidade celular

Procedeu-se como na primeira fase.

3.6.8 Cultivos de CTME

As células foram distribuídas em frascos de cultivo de 75 cm², na concentração de 05x10⁵/mL para a sua expansão. Na seqüência, após 48 horas da

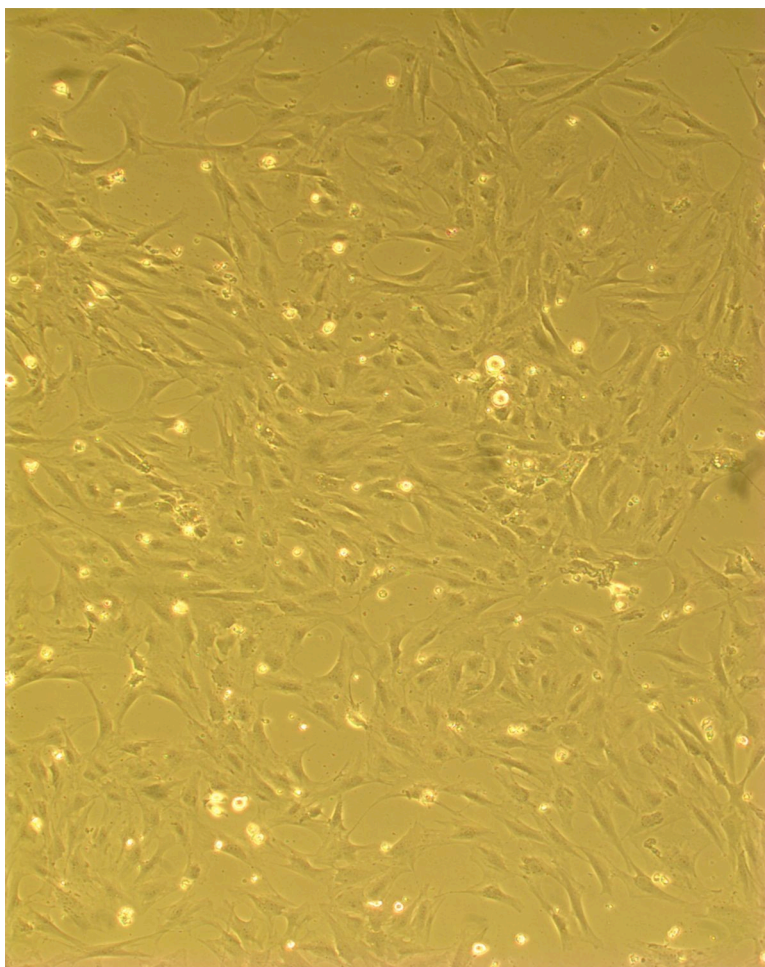
primeira distribuição nos frascos, as células não aderentes foram aspiradas dos frascos, restando apenas células aderentes: CTME, seguidos de lavagem com PBS e seguidos de troca do DMEN suplementado com 20% de SFB, 1% de antibiótico (penicilina: 100µg/mL e estreptomicina: 100µg/mL) e 10ng de IGF-I (GIBCO® BRL Life Technologies, inc., Rockville-USA).

3.6.9 Manutenção do cultivo CTME

O meio utilizado foi o DMEN suplementado com 20% SFB, 1% de antibiótico (penicilina: 100µg/mL e estreptomicina: 100µg/mL) e 10ng de IGF-I (GIBCO® BRL Life Technologies, inc., Rockville-USA), sendo trocado cada 48 horas. As culturas foram repicadas com o auxílio de tripsina á 0,05% na dependência da confluência celular.

O Cultivo celular foi mantido por 14 dias, em incubadora á 37.5°C e 5% de CO₂ (figura 13).

FIGURA 13 - CTME DERIVADAS DA MO CULTIVADAS POR 14 DIAS.



3.6.10 Identificação celular

Procedeu-se como na primeira fase.

3.6.11 Recuperação do Bioproduto

Procedeu-se como na primeira fase.

3.6.12 Bioprocesso do co-cultivo de CTME e ME

Os procedimentos do Bioprocesso do Co-cultivo de ME e CTME foram realizados de acordo com Carvallho, descrito na primeira fase, obedecendo à

mesma proporção de células: satélites / células mononucleares: 2:1, diretamente distribuídas nos frascos (CARVALHO et al, 2004).

3.6.13 Manutenção do co-cultivo de CTME e ME

Procedeu-se como na primeira fase.

3.6.14 Recuperação do Bioproduto

Procedeu-se como a primeira fase.

3.6.15 Procedimento indução do infarto do miocárdio

Todos os animais foram submetidos à uma toracotomia lateral esquerda por incisão de cerca de um centímetro e ligadura da artéria coronária esquerda, com fio de polipropilene 7.0 (Ethicon[®], Inc., Somerville, New Jersey, USA) induzindo o infarto da parede ântero-lateral do ventrículo esquerdo. Identificou-se a efetividade do procedimento, quando houve uma alteração da coloração (aspecto esbranquiçado) da parede ventricular esquerda.

3.6.16 Procedimento de avaliação ecocardiográfica

Os animais foram submetidos à avaliação ecocardiográfica transtorácica bi-dimensional (Sonos) após uma semana de Infarto do miocárdio e este equipado com transdutor linear de 15 ultra - MHz (15L8), permitindo a análise de até 160 Hz e especificamente produzida para estudo ultrassônico nos animais de pequeno porte (figura 14). O transdutor foi posicionado na porção ântero-lateral esquerda do tórax e os corações foram visibilizados pelo modo bi-dimensional com visão axial do ventrículo esquerdo, incluindo a valva mitral, aórtica e o apex na mesma imagem (figura 15). A seguir, procederam-se as seguintes medidas do ventrículo esquerdo das superfícies sistólica e diastólica finais, comprimento sistólico e diastólico finais e frequência cardíaca, para posteriores cálculos dos volumes sistólico e diastólico,

finais (VSFVE e VDFVE respectivamente) e da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE). Todas as medidas foram realizadas pelo mesmo ecocardiografista, três vezes, sendo calculada a média para cada parâmetro. A avaliação Ecocardiográfica foi realizada em “duplo-cego” (BLAND; ALTMAN, 1999).

Fórmula dos Volumes Ventriculares: $V = 8 \times (S)^2 / (3 \times 3.1415926 \times C)$, onde V=Volume; S= superfície e C= Comprimento.

Fórmula da Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo: $FEVE = (VDFVE - VSFVE) / VDFVE$, onde FEVE= fração de ejeção do ventrículo esquerdo; VDFVE = volume diastólico final do ventrículo esquerdo e VSFVE = volume sistólico final do ventrículo esquerdo.

FIGURA 14 - ECOCARDIÓGRAFO BIDIMENSIONAL PARA ANIMAIS DE PEQUENO PORTE.



FIGURA 15 - TRANSDUTOR SOBRE O TÓRAX DO ANIMAL.



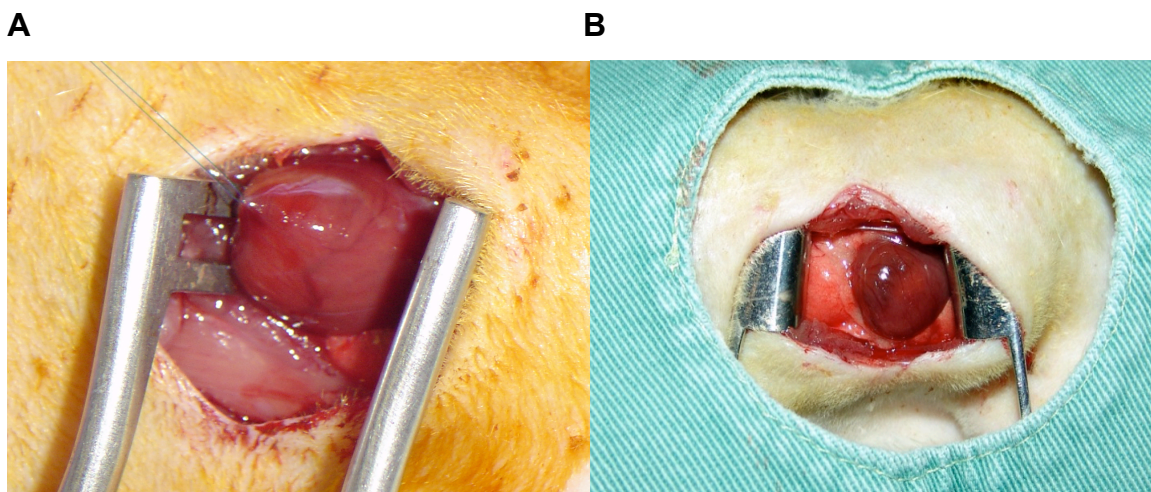
3.6.17 Procedimento de transplantes

Os transplantes foram realizados nove dias após o infarto do miocárdio, naqueles animais com a FEVE inferior a 40% e após randomizados para as diversas terapias. Os animais foram re-operados, submetidos a uma esternotomia mediana, onde foram visibilizados os ventrículos esquerdos, seguidos de injeções subepicárdicas (duas) nas regiões esbranquiçadas da parede anterior do ventrículo esquerdo, sendo identificadas como região do infarto (figuras 16A e 16B). As injeções subepicárdicas de 150 μ l de acordo com a randomização.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os quatro grupos foram comparados entre si e individualmente para análises das FEVE, VSFVE e VDFVE após sete dias de indução do infarto do miocárdio e um mês após o transplante. Utilizou-se o teste ANOVA, o teste de Student para as amostras pareadas e o teste exato de Fisher, considerando-se diferença estatística significativa quando $p < 0,05$.

Figura 16 - Exposição do coração para o procedimento (A) e aspecto esbranquiçado mesmo após a ligadura da coronária esquerda (B).



3.8 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA APÓS OS TRANSPLANTES

Cada animal após a eutanásia teve seu coração retirado e congelado imediatamente em nitrogênio líquido para análise histopatológica.

Cortes histológicos transversais foram realizados para procedimentos imunohistoquímicos em criostato (Leica®-Modelo 1850), com cerca de 6-8 micra de espessura, sendo montados em lâminas e corados com soluções de HE e tricrômio de Gomori. De cada peça foram feitas duas lâminas com os quatro cortes e para cada coloração citada (figura 17).

Estas análises foram realizadas no microscópio óptico (Olympus®RX50) acoplado a uma câmera de vídeo que, possibilita capturar imagens digitais a um computador. A análise de imagens digitais foi pelo programa Image Pro-plus (Média Cybernetics®, Silver Spring, Maryland, USA). Para análise destas lâminas foram utilizadas objetivas de aumentos de 20x, 40x, 100x.

Os cortes foram avaliados por sua morfologia e realizadas comparações entre os cortes de corações dos grupos: ME, CTME, controle e co-cultivo de ME e CTME.

FIGURA 17 - CORTES CORONAIS DIVIDINDO O CORAÇÃO EM QUATRO CORTES (BASE, MÉDIO PROXIMAL, MÉDIO DISTAL E ÁPEX).



3.9 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS DA TERCEIRA FASE

3.9.1 Delineamento do estudo da terceira fase

Os animais que, atenderam aos critérios de miocardiopata chagásica foram submetidos aos procedimentos de biópsia muscular e punção-aspiração da MO para os respectivos isolamentos celulares de ME e células-tronco da MO, seguidos de co-cultivos autólogos e então “randomizados” em dois grupos para transplante versus controle (injeção de meio e sem células).

3.9.2 Bioprocesso do Co-cultivo de ME e CTME

Os procedimentos do Bioprocesso do Co-cultivo de ME e CTME foram realizados de acordo com a segunda etapa na primeira fase, obedecendo à mesma proporção de células: satélites / células mononucleares: 2:1, diretamente distribuídas.

3.9.3 Manutenção do Co-cultivo

Procedeu-se como da segunda etapa na primeira fase.

3.9.4 Viabilidade Celular

Procedeu-se como da segunda etapa na primeira fase.

3.9.5 Recuperação do Bioproduto

Procedeu-se como da segunda etapa a primeira fase.

3.9.6 Procedimento de indução da miocardiopatia Chagásica

3.9.6.1 Inoculação de *Trypanosoma cruzi*

A cepa de *Trypanosoma cruzi* (*T.Cruzi*) utilizada foi obtida do laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN), mantida por passagens semanais em camundongos por via intraperitoneal. Punções intracardíacas foram realizadas em dois camundongos para coleta do sangue em tubo heparinizado, com formas tripomastigotas de *T.cruzi*. Amostras de 0,5 mL foram imediatamente inoculadas em cada um dos dez ratos Wistar e mantidos por dez dias. Ao término de dez dias, foram coletados cinco mililitros de sangue dos ratos, procedendo-se a contagem de tripanosomas na amostra e diluída em solução salina a conter $1,5 \times 10^5$ tripomastigotas/ mL.

Oitenta ratos Wistar foram inoculados, intraperitonealmente, na seqüência e mantidos por oito meses no Biotério. Estes animais foram submetidos às avaliações funcionais por ecocardiografia transtorácica e coleta de sangue por punção venosa caudal para a reação de Machado Guerreiro. Os critérios de inclusão para a seleção de animais deste estudo foram: presença de anticorpos anti-*trypanosoma cruzi* e FEVE inferior a 35%, indicativo de miocardiopatia. Os dois critérios presentes, concluiu-se por Miocardiopatia Chagásica.

3.9.7 Procedimento de avaliação ecocardiográfica

Procedeu-se como da segunda etapa na primeira Fase.

3.9.8 Procedimentos de transplante

Procedeu-se como na primeira fase. Ressaltando que todos os procedimentos foram autólogos e para os transplantes na miocardiopatia chagásica, as injeções foram em torno de três ou quatro nas paredes anterior e lateral do ventrículo esquerdo.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Procedeu-se como da segunda etapa na primeira fase.

3.11 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA APÓS OS TRANSPLANTES

Procedeu-se como na segunda etapa da primeira fase e acrescido da técnica imunohistoquímica com o auxílio do anticorpo antimiosina rápida (monoclonal anti-skeletal myosin - clone MY-32, Sigma[®] - Saint Louis Missouri, USA) para imunofluorescência e anticorpo anti-factor VIII (Dako[®], antihuman Von Willebrand Factor) para imunoperoxidase.

4. RESULTADOS

4.1 RESULTADOS PRIMEIRA FASE

4.1.1 Análise Morfológica

Na observação morfológica, o grupo de distribuição da proporção de células Satélites / células-tronco, fração mononuclear: 2:1, foi mais confluyente (ocuparam mais de 2/3 da área da superfície do frasco).

4.1.2 Análise Quantitativa

A análise quantitativa demonstrou um rendimento celular do co-cultivo da ordem de até 10^8 (tabela 01). A avaliação da proliferação celular demonstrou os resultados abaixo.

Concentração celular: o resultado do teste não-paramétrico de Wilcoxon indicou diferença significativa entre os resultados de concentração inicial e após 14 dias ($p=0,0096$). No quadro 01 são apresentados valores mínimo, máximo, mediana, média e desvio padrão da concentração após 14 dias e da diferença entre a concentração final e inicial.

Índice de proliferação: os valores são apresentados na tabela 01.

4.1.3 Viabilidade

A viabilidade pelo método de Azul de Trypan do produto celular do co-cultivo variou de 90,5% a 95% (média de $89,5 \pm 5,5$).

QUADRO 01- CONCENTRAÇÃO CELULAR DURANTE O CO-CULTIVO DE MIOBLASTOS ESQUELÉTICOS E CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS.

Variável	n	Valor mínimo	Valor máximo	Mediana	Média	Desvio padrão
CI	18	$2,50 \times 10^6$	$2,50 \times 10^6$	$2,50 \times 10^6$	$2,50 \times 10^6$	---
CF	18	$1,80 \times 10^5$	$1,20 \times 10^8$	$6,50 \times 10^6$	$1,61 \times 10^7$	$2,78 \times 10^7$
Diferença (CF- CI)	18	$-2,32 \times 10^6$	$1,18 \times 10^8$	$4,00 \times 10^6$	$1,36 \times 10^7$	$2,78 \times 10^7$

O teste de Wilcoxon, $p=0,0096$, para a diferença de concentração inicial (CI) e concentração final (CF). CF: após 14 dias de cultivo.

TABELA 01 - CONCENTRAÇÃO CELULAR/ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO CO-CULTIVO DE MIOBLASTOS ESQUELÉTICOS E CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS.

RATO	Concentração inicial	Concentração após 14 dias	Diferença (após 14 dias – inicial)	Índice de proliferação
01	2,50x10 ⁶	6,00x10 ⁶	3,50x10 ⁶	0,1714
02	2,50x10 ⁶	1,50x10 ⁷	1,25x10 ⁷	0,4286
03	2,50x10 ⁶	7,00x10 ⁶	4,50x10 ⁶	0,2000
04	2,50x10 ⁶	1,80x10 ⁵	-2,32x10 ⁶	0,0051
05	2,50x10 ⁶	1,10x10 ⁶	-1,40x10 ⁶	0,0314
06	2,50x10 ⁶	3,20x10 ⁶	7,00x10 ⁵	0,0914
07	2,50x10 ⁶	5,20x10 ⁵	-1,98x10 ⁶	0,0149
08	2,50x10 ⁶	4,80x10 ⁶	2,30x10 ⁶	0,1371
09	2,50x10 ⁶	6,80x10 ⁵	-1,82x10 ⁶	0,0194
10	2,50x10 ⁶	2,80x10 ⁵	-2,22x10 ⁶	0,0080
11	2,50x10 ⁶	2,70x10 ⁷	2,45x10 ⁷	0,7714
12	2,50x10 ⁶	3,00x10 ⁶	5,00x10 ⁵	0,0857
13	2,50x10 ⁶	2,00x10 ⁷	1,75x10 ⁷	0,5714
14	2,50x10 ⁶	1,20x10 ⁸	1,18x10 ⁸	3,4286
15	2,50x10 ⁶	1,50x10 ⁷	1,25x10 ⁷	0,4286
16	2,50x10 ⁶	2,00x10 ⁷	1,75x10 ⁷	0,5714
17	2,50x10 ⁶	3,40x10 ⁷	3,15x10 ⁷	0,9714
18	2,50x10 ⁶	1,20x10 ⁷	9,50x10 ⁶	0,3429

4. 2 RESULTADOS DA SEGUNDA FASE

4.2.1 Resultados funcionais por ecocardiografia

Na comparação das FEVE médias dos grupos no ecocardiograma de base não encontrou-se diferença estatística ($p=0,276$) (quadro 02).

Na avaliação ecocardiográfica após um mês do transplante, foi encontrada diferença estatística significativa entre a FEVE média dos grupos ($p=0,001$) (quadro 02). Essa diferença ocorreu entre o grupo controle e o grupo ME ($p=0,037$), entre o grupo controle e o grupo de co-cultivo ($p=.0,001$) e entre o grupo de CTME e o grupo de co-cultivo ($p=0,025$). Não se encontrou diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o grupo de CTME ($p=0,372$), entre o grupo ME e o grupo CTME ($p=0,263$) e o grupo ME e o grupo de co-cultivo ($p=0,267$) (quadro 03).

Os resultados obtidos relacionados à FEVE são apresentados nos quadros 02 e 03.

Os resultados do volume diastólico final do ventrículo esquerdo demonstraram ausência de efeitos na re-modelação cardíaca nos grupos de co-cultivo e de ME, sendo que foi observada uma estabilização, quando transplantadas CTME isoladas e apresentados nos quadros 04 e 05.

Avaliações complementares foram demonstradas nos quadros 06 e 07.

QUADRO 02 - AVALIAÇÃO FUNCIONAL ECOCARDIOGRÁFICA. ANÁLISES: BASAL E APÓS UM MÊS DA FRAÇÃO DE EJEÇÃO VENTRÍCULO ESQUERDO.

Variáveis	Controle (n=22)	CTME (n=17)	ME (n=16)	Co-cultivo (n=17)	P*
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	
Basal FEVE	26,68 ± 6,92	26,80 ± 8,17	22,90 ± 6,25	23,52 ± 8,67	0,276
Após 1- mês	22,32 ± 6,94	24,80 ± 10,20	28,21 ± 9,15	31,45 ± 8,87	0,001**
p [†]	0,005	0,65	0,09	0,01	

Células-tronco mesenquimais (CTME); mioblastos esqueléticos (ME); Co-cultivo de ME e CTME (Co-cultivo) e Fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE).

(*) ANOVA (***) Ajustado para o basal (†) Teste t pareado (p<0,05)

QUADRO 03 - AVALIAÇÃO FUNCIONAL ECOCARDIOGRÁFICA - COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS DA FRAÇÃO DE EJEÇÃO DO VENTRÍCULO ESQUERDO APÓS UM MÊS.

Comparação entre grupos após 1-mês: FEVE	p*
Controle x ME	0,04
Controle x CTME	0,37
Controle x Co-cultivo	<0,01
ME x CTME	0,26
ME x Co-cultivo	0,27
CTME x Co-cultivo	0,02

Células-tronco mesenquimais (CTME); mioblastos esqueléticos (ME); Co-cultivo de ME e CTME (Co-cultivo) e Fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE). (*) Teste LSD (p<0,05).

QUADRO 04 - AVALIAÇÃO FUNCIONAL ECOCARDIOGRÁFICA - ANÁLISES: BASAL E APÓS UM MÊS DO VOLUME DIASTÓLICO FINAL DO VENTRÍCULO ESQUERDO.

Variáveis	Controle (n=22)	CTME (n=17)	ME (n=16)	Co-cultivo (n=17)	p*
	Média ± DP	Média ± DP	Média ±SD	Média ±SD	
Basal VDFVE	0,63 ± 0,15	0,53 ± 0,12	0,53 ± 0,10	0,51±0,09	0,009
Após 1-mês	0,76 ± 0,17	0,70 ± 0,17	0,64 ± 0,12	0,68±0,12	0,43**
p [◇]	<0,01	<0,01	0,04	<0,01	

Células-tronco mesenquimais (CTME); mioblastos esqueléticos (ME); Co-cultivo de ME e CTME (Co-cultivo) e volume diastólico final do ventrículo esquerdo (VDFVE).
 (*) ANOVA (**) Ajustado para o basal (◇) Teste t pareado (p<0,05).

QUADRO 05 - AVALIAÇÃO FUNCIONAL ECOCARDIOGRÁFICA - COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS DO VOLUME DIASTÓLICO FINAL DO VENTRÍCULO ESQUERDO APÓS UM MÊS.

Comparação entre grupos após 1-mês: VDFVE	p*
Controle x ME	0,01
Controle x CTME	0,02
Controle x Co-cultivo	0,002
ME x CTME	0,94
ME x Co-cultivo	0,56
CTME x Co-cultivo	0,51

Células-tronco mesenquimais (CTME); mioblastos esqueléticos (ME); co-cultivo de ME e CTME (Co-cultivo) e volume diastólico final do ventrículo esquerdo (VDFVE).
 (*) Teste LSD (p<0,05).

QUADRO 06 - Avaliação funcional ecocardiográfica - Resultados após um mês da fração de ejeção do ventrículo esquerdo.

FEVE	Grupos			
	Controle	CTME	ME	Co-cultivo
Melhorados ou estáveis %	6 (27,3%)	9 (52,9%)	10 (62,5%)	15 (88,2%)
Agravados %	16 (72,7%)	8 (47,1%)	6 (37,5%)	2 (11,8%)
Total %	22	17	16	17

Células-tronco mesenquimais (CTME); mioblastos esqueléticos (ME); co-cultivo de ME e CTME (Co-cultivo) e fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE).

QUADRO 07 - AVALIAÇÃO FUNCIONAL ECOCARDIOGRÁFICA - COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS DA FRAÇÃO DE EJEÇÃO DO VENTRÍCULO ESQUERDO.

Comparação entre Grupos FEVE	p*
Controle x ME	0,05
Controle x CTME	0,18
Controle x Co-cultivo	<0,01
ME x CTME	0,73
ME x Co-cultivo	0,12
CTME x Co-cultivo	0,06

Células-tronco mesenquimais (CTME); mioblastos esqueléticos (ME); Co-cultivo de ME e CTME (Co-cultivo) e fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE).

(*) Teste exato de Fisher (p<0,05).

4.2. 2 Resultados do estudo imunocitoquímico

No estudo imunocitoquímico *in-vitro* identificaram-se as CTME, quando marcadas com anti-vimentina e células musculares, com anticorpo antimiosina rápida.

4.2.3 Resultados do estudo histopatológico

Na interpretação dos cortes corados com HE e tricrômio de Gomori, identificou-se tecidos musculares esqueléticos imaturos de aspecto miotubular na zona do infarto, nos grupos de ME e de co-cultivo, onde os ME foram transplantados. Nos grupos de CTME e co-cultivo em que, se transplantaram CTME, identificou-se a presença de angiogênese na zona do infarto. No grupo exclusivo de co-cultivo, foram identificados ambos: tecido muscular esquelético e angiogênese na zona do infarto. Nos cortes, dos espécimes do grupo controle, outros tipos celulares não foram identificados apenas cicatrizes avasculares nas zonas dos infartos (figuras 18-24).

Nestas colorações de rotina, sem imunomarcção, foram consideradas células transplantadas, aquelas células circundadas por tecido cicatricial, como ilhas celulares de padrão morfológico distinto da citoarquitetura do miocárdio.

Figura 18 – Fotomicrografia de corte histológico onde se vê aspectos da angiogênese e miogênese na cicatriz da miocardiopatia isquêmica crônica após o transplante de co-cultivo de ME e CTME (Tricrômio de Gomori, 400X).

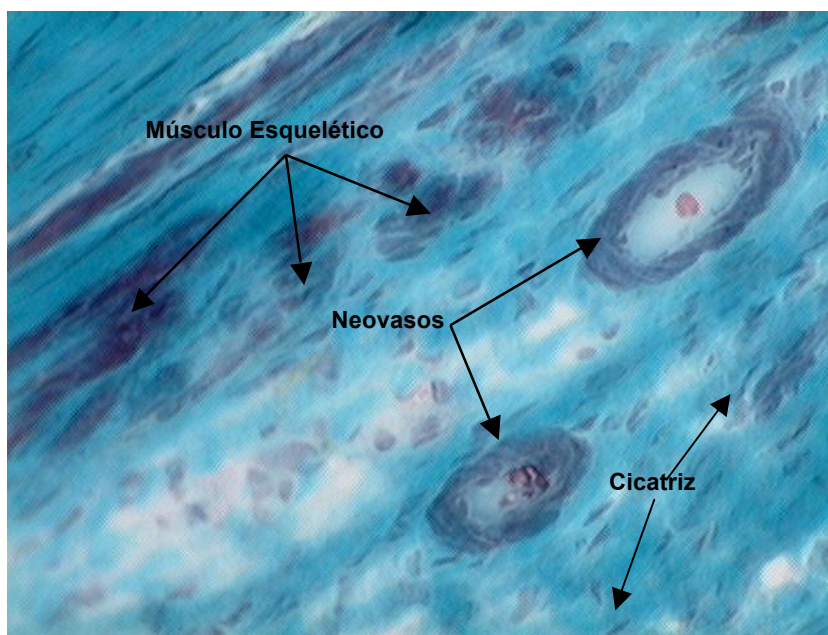


Figura 19 – Fotomicrografia de corte histológico demonstrando a angiogênese e a miogênese na cicatriz da miocardiopatia isquêmica crônica após o transplante de co-cultivo de ME e CTME (Tricrômio de Gomori, 100X).

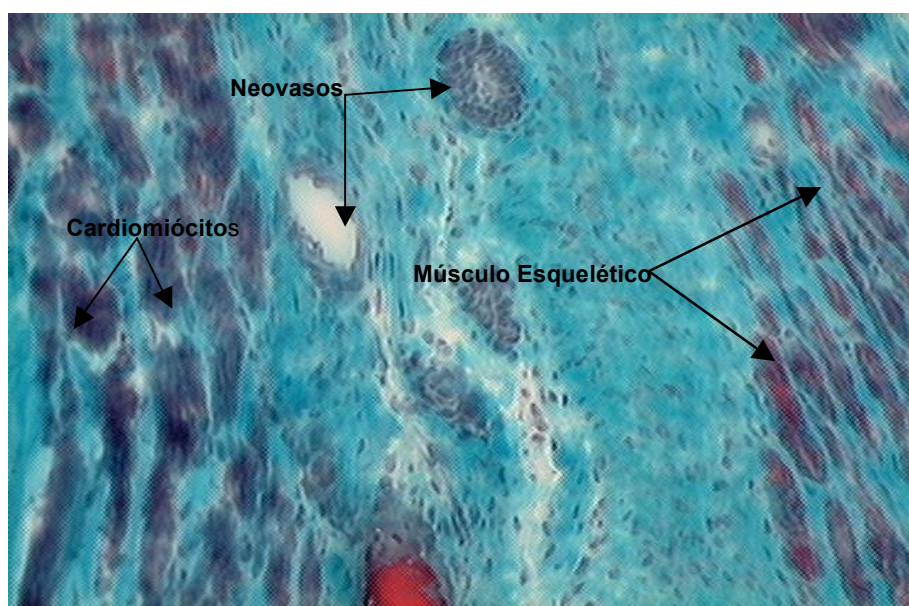


Figura 20 – Fotomicrografia de corte histológico com aspectos da miogênese na cicatriz da miocardiopatia isquêmica crônica após o transplante de ME (H&E, 40X).

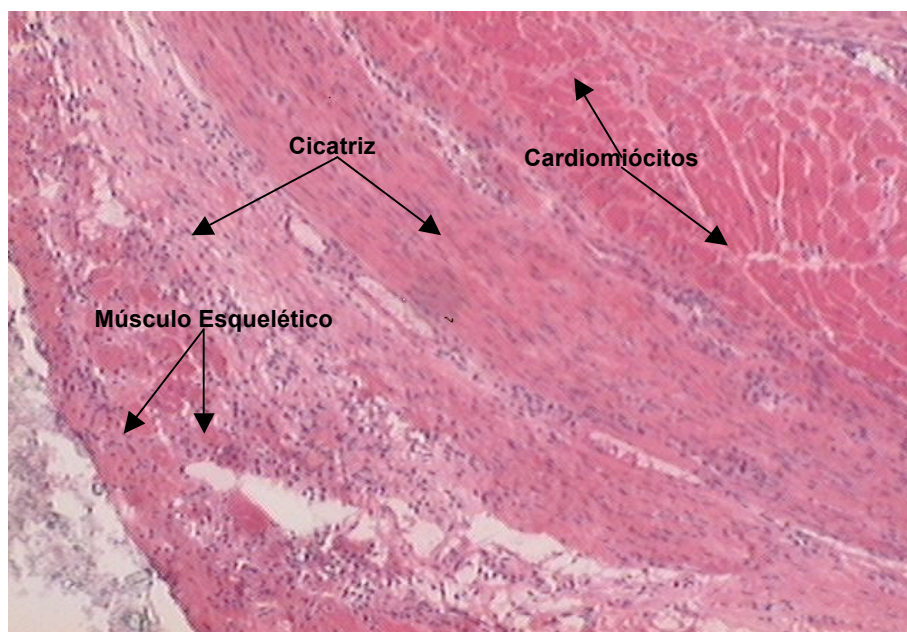


Figura 21 – Aspectos histológicos da miogênese na cicatriz da miocardiopatia isquêmica crônica após o transplante de ME (H&E, 100X).



Figura 22 – Detalhes histológicos da cicatriz avascular na miocardiopatia isquêmica crônica (área do infarto) (Tricrômio de Gomori, 100X).

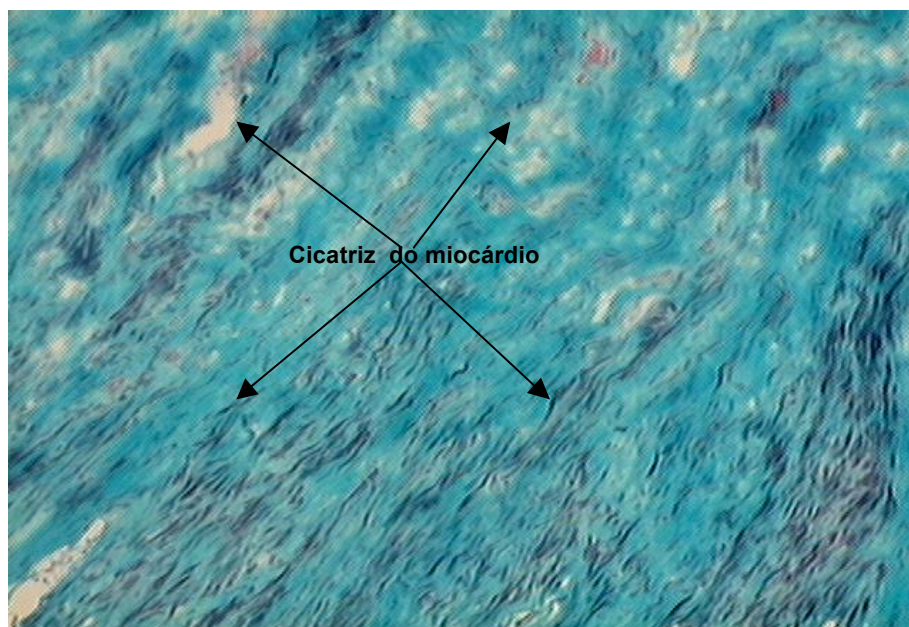


Figura 23 – Fotomicrografia de corte histológico de miocárdio normal. (Tricrômio de Gomori, 100X).

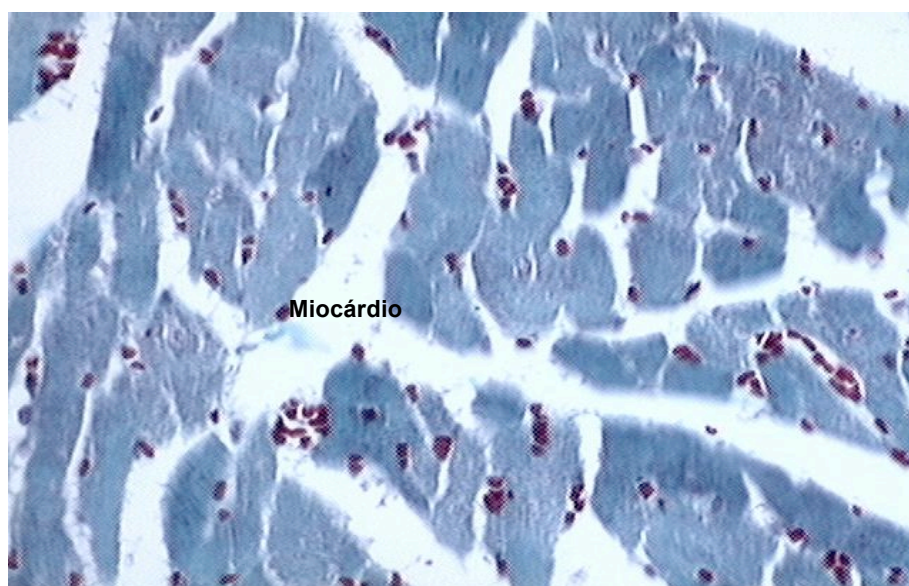
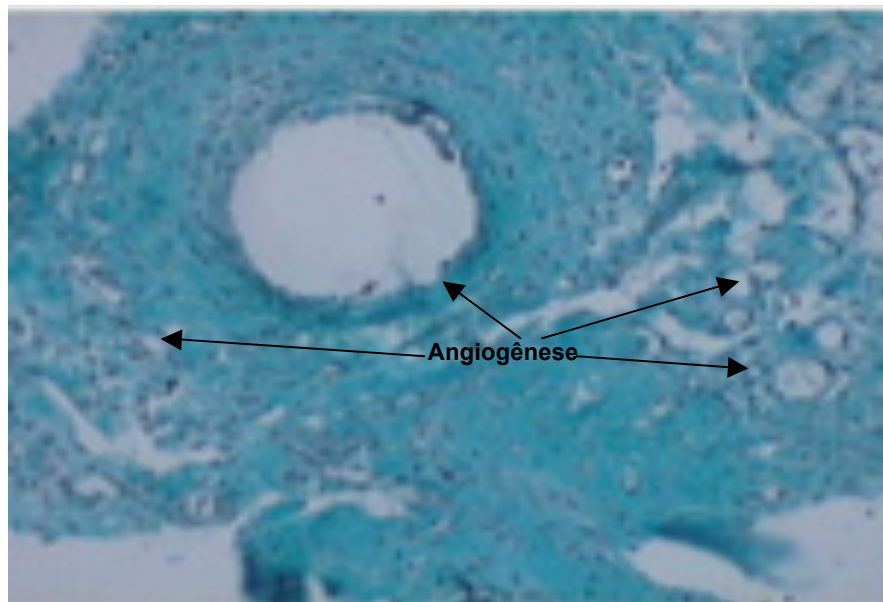


Figura 24 - Aspectos da angiogênese na cicatriz da miocardiopatia isquêmica crônica após o transplante de CTME (Tricrômio de Gomori, 40X).



4.3 RESULTADOS DA TERCEIRA FASE

4.3.1 Resultados das análises funcionais por ecocardiografia

Dos 80 animais, 15 desenvolveram a miocardiopatia chagásica e foram randomizados em dois grupos para transplante, controle (n=8): 200 μ L de DMEN e terapia com células do produto de co-cultivo (n=7): $5,4 \times 10^6 \pm 8,0 \times 10^6$ diluídas em volume de 200 μ L de DMEN.

Um mês após os procedimentos de transplantes, a FEVE permaneceu estável no grupo controle ($36,21 \pm 3,70$ para $38,19 \pm 7,03$; $p=0,426$). O grupo que, recebeu o produto celular do co-cultivo demonstrou uma melhora significativa na FEVE ($31,10 \pm 5,78$ para $53,37 \pm 5,84$; $p < 0,001$) e o VSFVE permaneceu estável no grupo controle ($0,43 \pm 0,08$ para $0,45 \pm 0,14$; $p=0,777$) e apresentou um decréscimo no grupo que, recebeu o produto celular do co-cultivo ($0,56 \pm 0,06$ para $0,30 \pm 0,10$) (quadro 08, figuras 25 e 26). O VDFVE permaneceu estável no grupo controle ($0,68 \pm 0,12$ para

0,72±0,16; p=0,642) e apresentou diminuição significativa no grupo que, recebeu o produto celular do-cultivo (0,83±0,08 para 0,64± 0,16; p=0,005) (quadro 09, figura 27). Outros estudos complementares no quadro 10.

QUADRO 08 - AVALIAÇÃO FUNCIONAL ECOCARDIOGRÁFICA, ANTES E APÓS O TRANSPLANTE CELULAR DENTRO DOS GRUPOS CONTROLE E CO-CULTIVO NA MIOCARDIOPATIA CHAGÁSICA.

Variáveis	Controle (n=8)	Co-cultivo (n=7)
	Média± DP	Média± DP
Basal VDFVE	0,68 ± 0,12	0,83 ± 0,08
Após 1-mês VDFVE	0,72 ± 0,16	0,64 ± 0,16
<i>p*</i>	<i>0,642</i>	<i>0,005</i>
Basal VSFVE	0,43 ± 0,08	0,56 ± 0,06
Após 1-mês VSFVE	0,45 ± 0,14	0,30 ± 0,10
<i>p*</i>	<i>0,777</i>	<i>0,001</i>
Basal FEVE	36,21 ± 3,70	31,10 ± 5,78
Após 1-mês FEVE	38,19 ± 7,03	53,37 ± 5,84
<i>p*</i>	<i>0,426</i>	<i><0,001</i>

Volume diastólico final do ventrículo esquerdo (VDFVE); volume sistólico final do ventrículo esquerdo (VSFVE) e fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE). Co-cultivo de ME e CTME (Co-cultivo). (*) Teste de Student (p<0,05).

QUADRO 09 - AVALIAÇÃO FUNCIONAL ECOCARDIOGRÁFICA DO VOLUME DIASTÓLICO VENTRICULAR ESQUERDO. ANTES E APÓS O TRANSPLANTE CELULAR ENTRE OS GRUPOS CONTROLE E CO-CULTIVO NA MIOCARDIOPATIA CHAGÁSICA.

Variáveis	Controle (n=8)	Co-cultivo (n=7)	<i>p*</i>
	Mean ± SD	Mean ± SD	
Basal VDFVE	0,68±0,12	0,82±0,08	0,008
Após 1-mês VDFVE	0,72±0,16	0,64±0,16	0,446
<i>p*</i>	0,642	0,002	

Volume diastólico final do ventrículo esquerdo (VDFVE). Co-cultivo de ME e CTM (Co-cultivo). (*) Teste de Student ($p < 0,05$). (◇) Teste t pareado ($p < 0,05$).

QUADRO 10 - AVALIAÇÃO FUNCIONAL ECOCARDIOGRÁFICA APÓS UM MÊS DE EVOLUÇÃO - COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS, ANTES E APÓS O TRANSPLANTE, NA MIOCARDIOPATIA CHAGÁSICA.

Variáveis	Controle (n=8)	Co-cultivo (n=7)	Valor de p*
	Média ± DP	Média ± DP	
VDFVE (após-antes)	0,04 ± 0,23	- 0,19 ± 0,12	0,034
VSFVE (após-antes)	0,02 ± 0,18	- 0,26 ± 0,10	0,003
FEVE%	1,98 ± 6,63	22,27 ± 8,21	<0,001

Volume diastólico final do ventrículo esquerdo (VDFVE); volume sistólico final do ventrículo esquerdo (VSFVE) e fração de ejeção do ventrículo esquerdo. Co-cultivo de ME e CTME (Co-cultivo). (*) Teste de Student ($p < 0,05$).

FIGURA 25 – FRAÇÃO DE EJEÇÃO DO VENTRÍCULO ESQUERDO ANTES E APÓS O TRANSPLANTE CELULAR DENTRO DOS GRUPOS CONTROLE E CO-CULTIVO NA MIOCARDIOPATIA CHAGÁSICA

Fração de ejeção (FE); Co-cultura de ME e CTME (Co-cultura). (*) Teste de Student ($p < 0,05$).

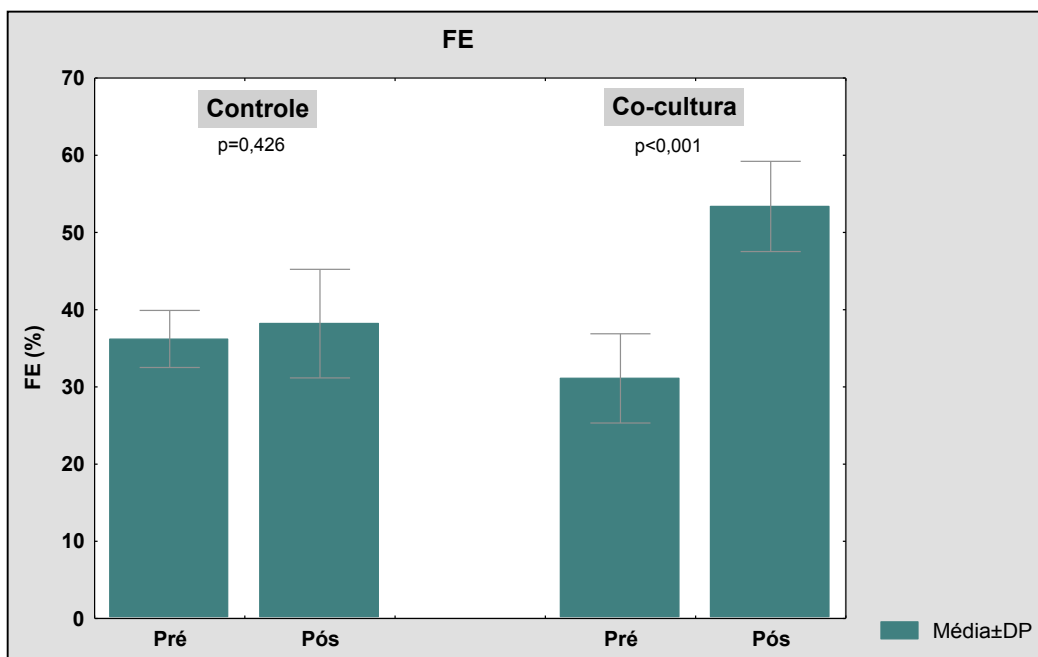


FIGURA 26 – VOLUME SISTÓLICO FINAL DO VENTRÍCULO ESQUERDO ANTES E APÓS O TRANSPLANTE CELULAR DENTRO DOS GRUPOS CONTROLE E CO-CULTIVO NA MIOCARDIOPATIA CHAGÁSICA

Volume sistólico final do ventrículo esquerdo (VSFVE); Co-cultura de ME e CTME (Co-cultura). (*) Teste de Student ($p < 0,05$).

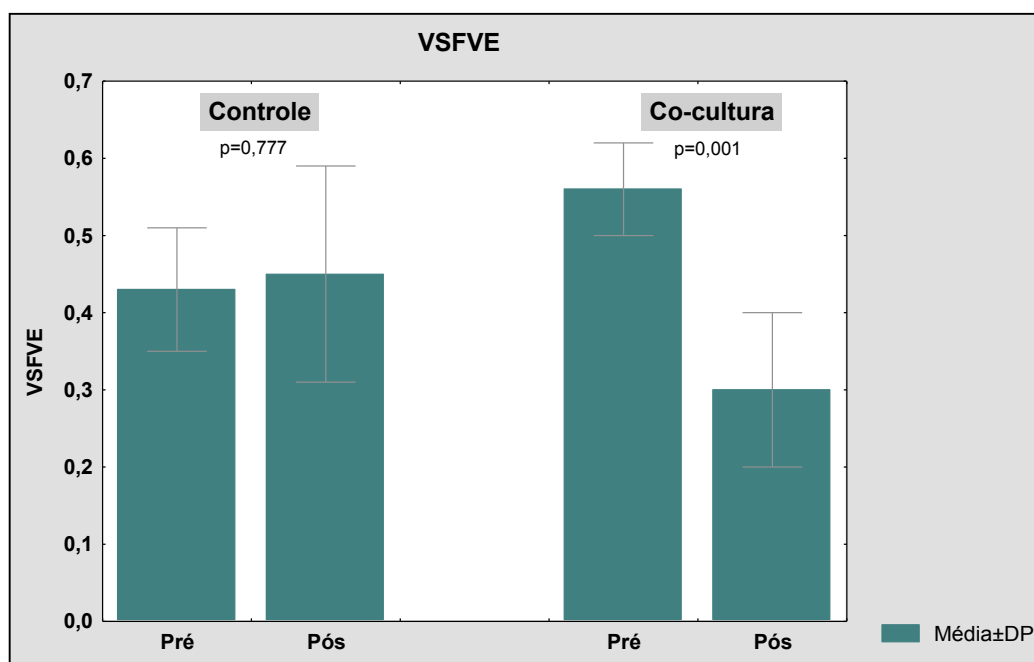
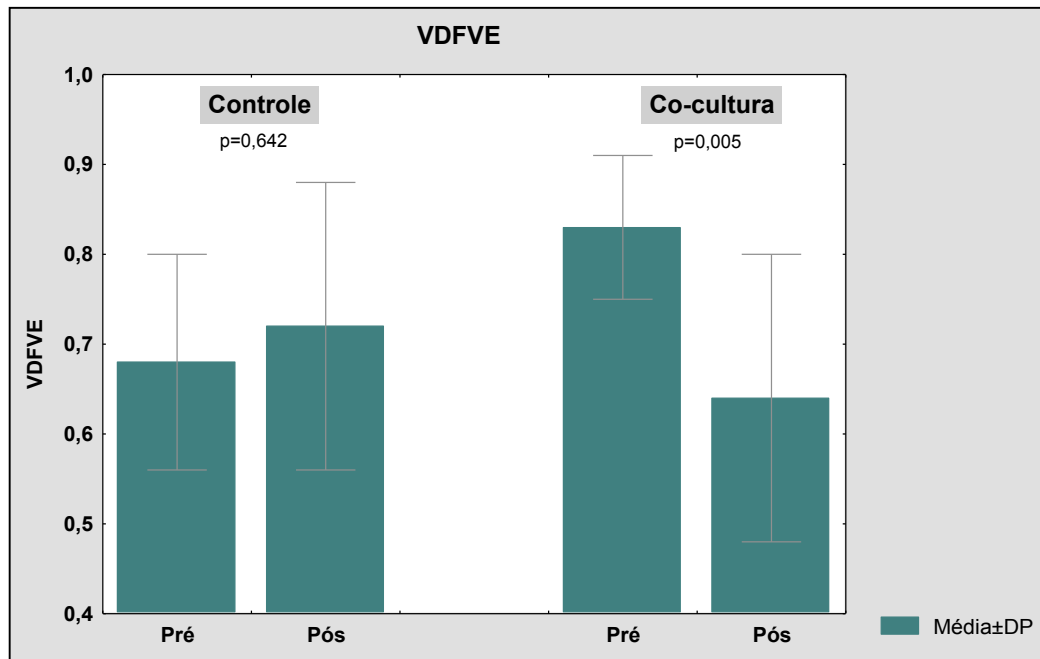


FIGURA 27 – VOLUME DIASTÓLICO FINAL DO VENTRÍCULO ESQUERDO ANTES E APÓS O TRANSPLANTE CELULAR DENTRO DOS GRUPOS CONTROLE E CO-CULTIVO NA MIOCARDIOPATIA CHAGÁSICA

Volume diastólico final do ventrículo esquerdo (VDFVE); Co-cultura de ME e CTME (Co-cultura). (*) Teste de Student ($p < 0,05$).



4.3.2 Resultados do estudo histopatológico

Em análise histopatológica, ambos os grupos demonstraram uma desestruturação da citoarquitetura do miocárdio, com áreas de fibrose, o que caracteriza a doença de Chagas. No grupo que, recebeu o produto celular do co-cultivo foram demonstradas células musculares esqueléticas com características miotubulares, células endoteliais e novos vasos em formação, principalmente no epicárdio, local onde foram realizadas as injeções celulares (figuras 28-32). A origem dos músculos esqueléticos foi confirmada nos espécimes pela marcação positiva de antimiosina rápida e a angiogênese demonstrada pela marcação positiva do fator VIII, sendo esta última apresentada em figura (figura 33).

FIGURA 28 – ASPECTOS MICROSCÓPICOS DA ANGIOGÊNESE APÓS TRANSPLANTE DE CO-CULTIVO DE ME E CTME NA MIOCARDIOPATIA CHAGÁSICA (H&E, 1000X).

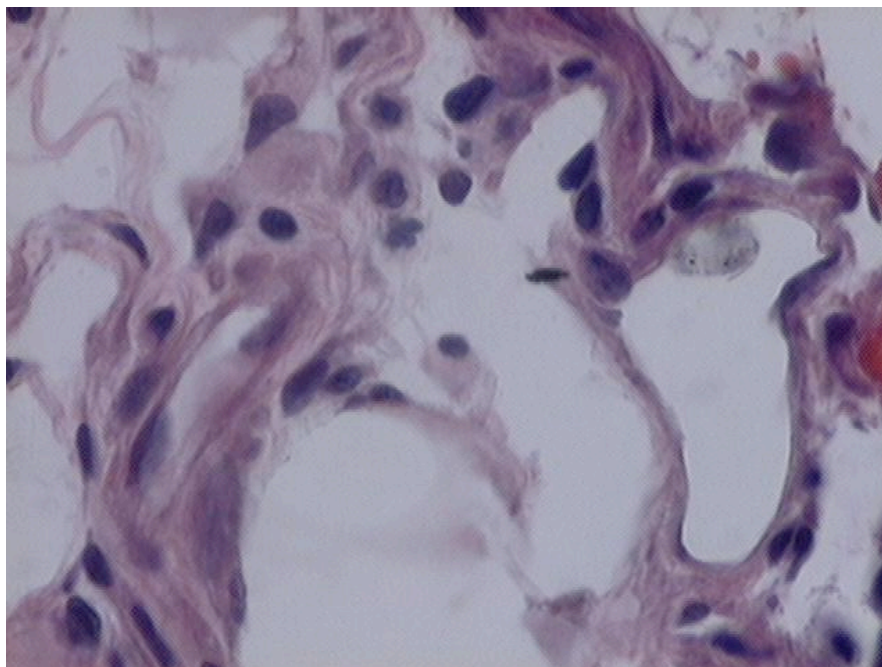


FIGURA 29 - DETALHES MICROSCÓPICOS DA MIOGÊNESE E ANGIOGÊNESE APÓS O TRANSPLANTE DE CO-CULTIVO DE ME E CTME NA MIOCARDIOPATIA CHAGÁSICA (H&E, 100X).

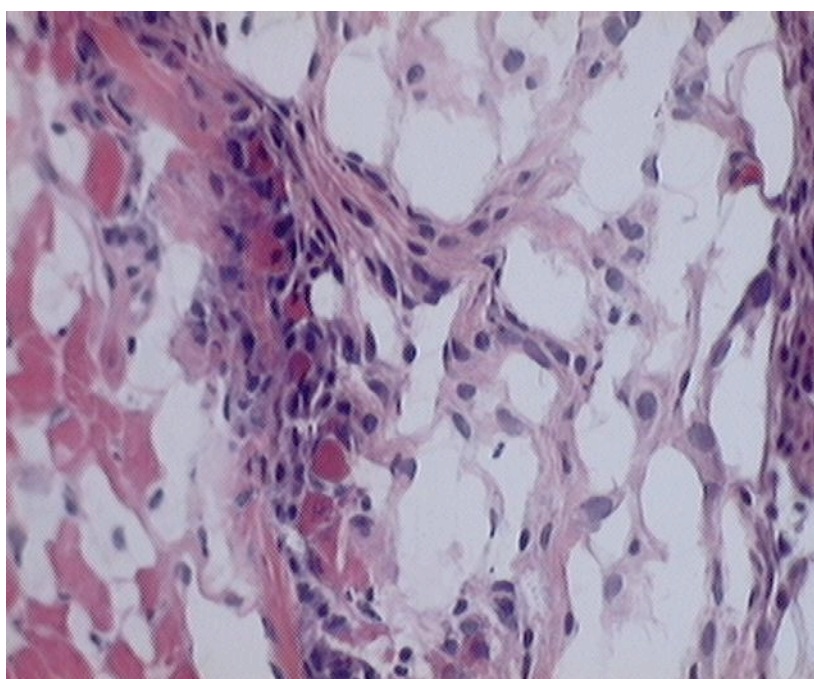


FIGURA 30 – FOTOMICROGRAFIA DEMONSTRANDO A MIOGÊNESE APÓS O TRANSPLANTE DE CO-CULTIVO DE ME E CTME NA MIOCARDIOPATIA CHAGÁSICA (H&E, 1000X).

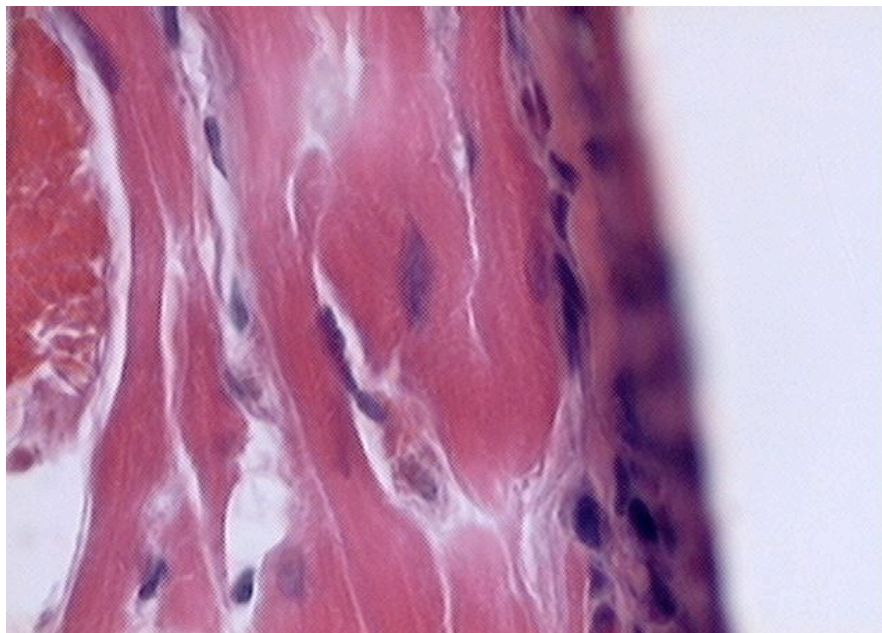


FIGURA 31 - MIOCARDIOPATIA CHAGÁSICA APÓS O TRANSPLANTE DE MEIO, SEM CÉLULAS (GRUPO CONTROLE). OBSERVA-SE A DESORGANIZAÇÃO DA CITOARQUITETURA DO MIOCÁRDIO, EM CORTE LONGITUDINAL (H&E, 400X).

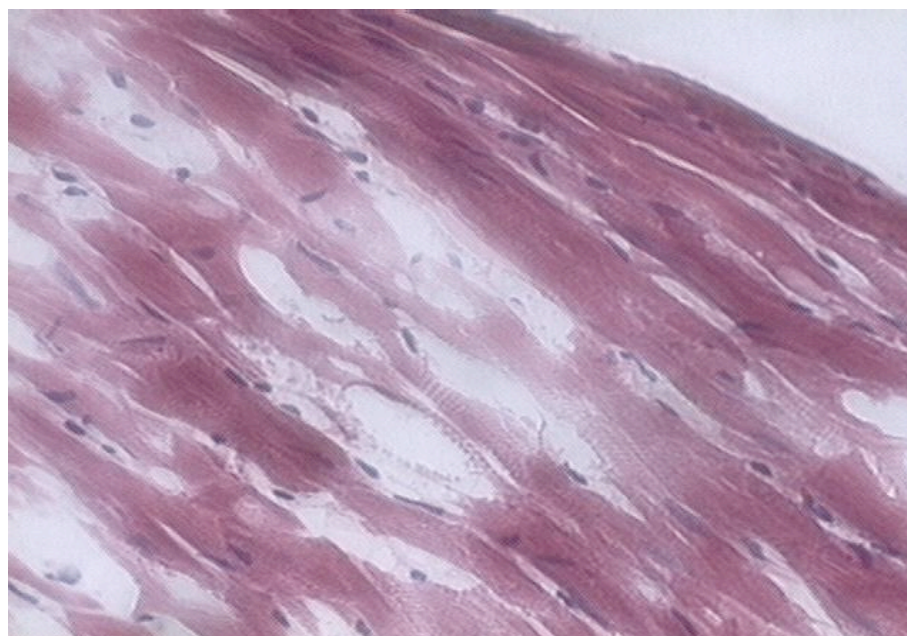
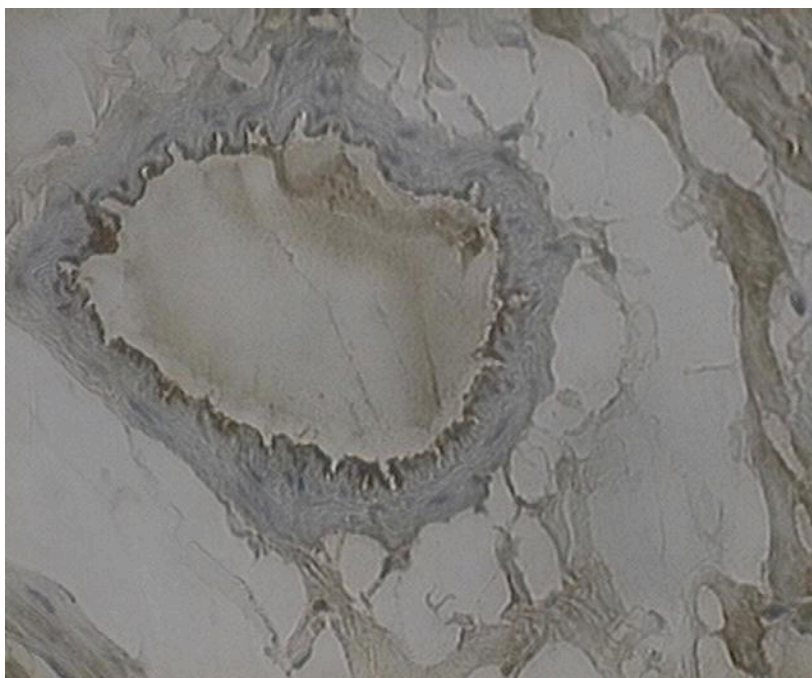


FIGURA 32 - MIOCARDIOPATIA CHAGÁSICA APÓS O TRANSPLANTE DE MEIO, SEM CÉLULAS (GRUPO CONTROLE), CORTE TRANSVERSAL: ANTICORPO ANTI-FATOR VIII, CONTROLE NEGATIVO (IMUNOPEROXIDASE, 100X).



FIGURA 33 - MIOCARDIOPATIA CHAGÁSICA APÓS O TRANSPLANTE DE CO-CULTIVO, EM CORTE TRANSVERSAL: DEMONSTRANDO POSITIVIDADE PARA O ANTICORPO ANTI-FATOR VIII (IMUNOPEROXIDASE, 1000X).



5. CONCLUSÕES

5.1 CONCLUSÃO DA PRIMEIRA FASE

O co-cultivo destes dois tipos celulares: ME e CTME é possível, possibilitando uma interação celular *in vitro*, gerando um produto celular com potencial de angiogênese e miogênese e tornando exeqüíveis os transplantes precedidos de co-cultivos.

5.2 CONCLUSÃO DA SEGUNDA FASE

5.2.1 Avaliação Funcional

A FEVE melhorou exclusivamente naqueles grupos onde se transplantou os ME isolados ou provenientes do co-cultivo. E no grupo de co-cultivo a recuperação dessa medida foi mais significativa entre os grupos utilizados neste estudo.

5.2.2 Avaliação Histopatológica

Em análise histopatológica demonstrou que os diferentes tipos de células foram encontrados isoladamente ou em conjunto, de acordo com as células injetadas e que, no grupo de CTME, foi encontrado apenas angiogênese; no grupo ME, apenas miogênese e no grupo de co-cultivo, a presença de angiogênese e miogênese.

5.3 CONCLUSÃO DA TERCEIRA FASE

5.3.1 Avaliação Funcional

A FEVE melhorou exclusivamente naquele grupo que, se transplantou o produto celular do co-cultivo de ME e CTME.

5.3.2 Avaliação Histopatológica

A análise histopatológica demonstrou presença de angiogênese e miogênese naquele grupo que, se transplantou o produto celular do co-cultivo de ME e CTME.

5.4 CONCLUSÃO GERAL

Estes resultados validam o produto celular do co-cultivo de mioblastos esqueléticos e de células-tronco mesenquimais para o tratamento dessas duas doenças.

6. DISCUSSÕES

A limitada capacidade de regeneração das células-tronco do miocárdio e da mobilização de células-tronco reparadoras da MO e as conseqüentes modificações de sua forma elíptica para dilatações segmentares (remodelamento), nas áreas onde há cicatriz, levam a disfunção cardíaca e a síndrome clínica de insuficiência cardíaca (ANVERSA et al, 2006).

A idéia da utilização dos dois tipos celulares propostos: ME e CTME vem ao encontro e na tentativa de solucionar a regeneração insuficiente e incompleta demonstrada pela aplicação de um único tipo celular como descritos na revisão: cardiomiócitos fetais e/ou adultos; fibroblastos; células-tronco da MO fração mononuclear; músculos lisos e os também demonstrados em nosso trabalho de pesquisa: os ME e CTME derivadas da MO.

O miocárdio assim como outros tecidos, não é constituído por um único tipo celular, ora seria uma idéia “maniqueísta” e “minimalista”, acreditarmos que, um único tipo celular seria capaz de regenerar uma citoarquitetura de extrema complexidade.

Partindo do princípio de que, as células-tronco da medula óssea mesenquimais são pluripotentes, estas seriam as células mais indicadas, pois teriam em seu *pool*, precursores de células contráteis e de células endoteliais, capazes de se diferenciar de acordo com o meio. No entanto, isto não foi demonstrado neste

trabalho, onde após a injeção destas células, houve apenas a demonstração de angiogênese, sem haver identificação de modo indireto da presença de “novo tecido” contrátil, uma vez que, a aplicação dessas células na miocardiopatia isquêmica crônica não demonstrou uma melhora funcional nos parâmetros deste estudo. Outros autores são controversos quanto à capacidade de diferenciação em miocárdio (QU-PETERSEN et al, 2002; GUARITA-SOUZA et al, 2005).

A capacidade de diferenciação das CTME *in vitro* é incontestável nos diversos tipos celulares de origem mesodérmica, pois vários autores conseguiram a reprodução da diferenciação em laboratório.

No entanto, o contexto da diferenciação dessas células, quando transplantadas *in vivo*, a frequência de sua ocorrência ainda não foi estabelecida; na hipótese da possibilidade de sua ocorrência, a relação entre a quantidade de células que se diferenciariam e a suficiência destas para alcançar a regeneração tissular permanece desconhecida.

Por outro todas as células contráteis testadas e descritas na literatura, já diferenciadas para músculo, quer cardiomiócitos adultos ou fetais, músculo liso, mioblastos esqueléticos e fibroblastos geneticamente modificados transplantados, obtiveram integração no miocárdio, após uma isquemia crônica e/ou modelos de criolesão, inclusive com mudança de fenótipo: expressão de enzimas de cardiomiócitos e tiveram de forma unânime melhora da FEVE.

Entretanto, uma das limitações do uso da mais promissora das células contráteis: ME, é que uma vez transplantadas, a sua integração ocorre de forma incompleta (não formam GAP) no miocárdio hospedeiro. E foi também demonstrado que, essas células acabam por sofrer a mesma lesão do cardiomiócito: isquemia e falta de nutrição com a sua conseqüente morte celular, muito embora, essas células sejam mais resistentes à isquemia (MURRY et al, 2005).

A facilidade de obtenção de sangue da medula óssea e do isolamento de células-tronco mesenquimais (angiogênicas) e ampliação de sua quantidade por expansão *in vitro*, associados à grande massa de tecido muscular esquelético periférico (20% do peso corporal), fácil acesso, isolamento, cultivo *ex-vivo*, bem estabelecidos na literatura, tornam esses dois tipos celulares fortes candidatos para a sua associação no transplante visando à regeneração angio-muscular.

Somam-se as facilidades descritas acima à possibilidade de seu uso em procedimentos autólogos, sem os inconvenientes da imunossupressão e esses dois tipos celulares tornam-se uma opção unânime, na falta das células ideais para a regeneração angio-muscular do miocárdio: na miogênese: o cardiomiócito ou precursores de cardiomiócito e para as células promotoras de angiogênese, diversas como as células que expressam o CD133 e as células endoteliais.

Em um estudo clínico pioneiro, realizado na França, com transplantes de ME, foi demonstrada haver melhora da função ventricular, mas também foi descrita incidência de arritmias ventriculares, responsivas aos antiarrítmicos como a amiodarona ou β -bloqueadores. E os marcapassos com ressincronização ou desfibriladores automáticos foram indicados antes dos procedimentos de transplantes celulares para a prevenção das arritmias, tornando-as não impeditivas para a indicação de transplantes de ME. Uma possível explicação para a ocorrência das arritmias seria que, os ME formando novas fibras musculares em tecido sem vascularização, uma fonte de arritmias e por não formariam *gap*. Como alguns autores demonstraram que, as células-tronco da MO apresentam o potencial angiogênico, sugere-se que a associação dessas células transplantadas, poderia ser capaz de eliminar ou diminuir a ocorrência das arritmias. No entanto, em nossos animais não foram detectadas as arritmias, muito embora o exame de ecocardiografia não seja exame de eleição para tal e por excelência a este fim, podendo-se surpreender alguma arritmia. Haveria necessidade de monitorização eletrocardiográfica contínua (HAGÈGE et al, 2006).

Mediante ao exposto acima, conclui-se que, para doenças do miocárdio, de natureza isquêmica crônica quer doenças coronarianas ou como doença de Chagas, com isquemia da macrovasculatura e/ou microvasculatura, a regeneração deve-se contemplar a reposição de dois tipos celulares: células contráteis e células angiogênicas. A associação destes dois tipos celulares parece-nos óbvia e com a hipótese dos resultados serem benéficos com a utilização combinada.

Este modelo de co-cultivo de ME e de CTME foi proposto objetivando proporcionar a regeneração angio-muscular; sendo que, as escolhas dessas doenças nesta pesquisa: miocardiopatias isquêmica crônica e chagásica, decorrem da presença de mecanismos fisiopatológicos determinantes e comuns para ambas:

diminuição do suprimento sangüíneo e sua conseqüente perda do cardiomiócito, e visaram testar e validar o modelo proposto de bioprocisso na regeneração angio-muscular no miocárdio.

A hipótese do co-cultivo transcende a simples combinação dos dois tipos celulares: ME e CTME; sugere-se que, a presença de ME ao lado de CTME, pré-condicione estas células, por interação entre elas *in vitro*, a se diferenciarem em células contráteis e angiogênicas, previamente ao transplante, baseados no conceito de nichos e/ou microambientes. E os resultados, já obtidos com o transplante isolado destas células, poderiam ser otimados a partir do co-transplante precedido de co-cultivo.

No presente estudo demonstrou-se que o co-cultivo destes dois tipos celulares: ME e CTME é possível e possibilitou uma interação celular *in vitro* antes do transplante no miocárdio (resultados da fase primeira fase). Embora esta interação celular necessite de estudos mais detalhados, ora já iniciados, mas sem a conclusão definida (CARVALHO et al, 2004). No modelo de miocardiopatia isquêmica crônica, o produto celular do bioprocisso de co-cultivo de ME e CTME foi capaz de promover melhora da função ventricular esquerda representada pelo acréscimo da FEVE, e somadas à estabilidade FEVE, perfazem 88,2% versus 27,3% do controle e foi demonstrada a redução dos volumes sistólico e diastólicos finais do ventrículo esquerdo. Quando comparados na miocardiopatia isquêmica crônica com o transplante de ME isolados não houve diferença significativa, ambos promoveram a melhora da FEVE, no entanto, o grande diferencial foi que, além da melhora da função ventricular pela análise ecocardiográfica, o estudo histopatológico também demonstrou a presença de fibras musculares esqueléticas e novos vasos sanguíneos nas áreas transplantadas (resultados da segunda fase). No entanto, não preveniram o remodelamento ventricular, diferentemente do que, foi identificado na miocardiopatia Chagásica (resultados da terceira fase), sugerindo que, isso possa ter ocorrido devido às células terem sido injetadas apenas na parede anterior do ventrículo, no caso da miocardiopatia isquêmica crônica e nas paredes anterior e lateral do ventrículo esquerdo, na miocardiopatia Chagásica (GUARITA-SOUZA et al, 2006; CARVALHO et al 2006b).

É importante relatar que, embora ambos os grupos das segunda e terceira fases tenham sido randomizados, eles inicialmente no momento basal não eram homogêneos para a FEVE, isto se deu ao acaso; em ambas as situações os grupos controles estavam melhores do que, os testados com o implante de células; na segunda fase e na terceira fase, se tornando homogêneos e comparáveis pelo VDFVE ($p=0,009$), na segunda fase e ($p=0,008$) na terceira fase (quadros 04 e 09, respectivamente).

Salienta-se que, ambos os modelos de miocardiopatia apresentam particularidades, e outros estudos ainda serão necessários para verificar se o remodelamento ventricular é dependente do modelo de miocardiopatia tratado e do modo de injeção das células.

Vários autores salientam a necessidade de se proporcionar um maior número de células, visto que, há uma perda muito grande de células prevista, logo após os procedimentos de transplantes pela reação inflamatória, mesmo naqueles autólogos. Além do que, á despeito da demonstração de uma viabilidade pelo método de azul de Trypan acima de 85%, o processo de apoptose não é freqüentemente contabilizado.

O processo de co-cultivo e expansão celular *in vitro* foi realizado com o intuito de transplantar o maior número de células possíveis e cultivadas em curto período (14 dias) para evitar transformações indesejáveis: transformações fenotípicas deletérias (descritas após várias subculturas >60) e as células foram retiradas no período exponencial (fase de proliferação), visando a sua melhor integração no miocárdio hospedeiro (VERFAILLE et al, 2002; CARVALHO et al, 2004).

Em nosso estudo experimental, as injeções foram a céu aberto para garantirmos a entrega das células.

Ressalta-se que, o produto celular do co-cultivo de ME e CTME, o classificamos como bioproduto, por ser o resultado de uma série bioprocessos sequenciados. E saliento que, sempre haverá uma variabilidade de seu conteúdo celular (variabilidade individual), no entanto isto não o invalida na categoria de bioprocessos, pois este deverá pressupor: os mesmos métodos de isolamento e distribuição (2:1) e as mesmas condições de cultivo e expansão. Isto se fundamenta,

pelo ritmo cinético e de seu crescimento exponencial que, é dado pelo ME (CARVALHO et al, 2006a).

A semelhança como os hemogramas dos mamíferos, o perfil celular deste produto celular deverá variar em função das particularidades de cada indivíduo: capacidade de proliferação de seu tecido muscular esquelético e de sua MO.

Em síntese, o nosso estudo conseguiu alcançar os objetivos da etapa pré-clínica experimental que, deve anteceder a transferência de pesquisa padrão-ouro para a fase I de terapêutica experimental de humanos. A fase II está em curso para a miocardiopatia isquêmica crônica, liberado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) (figura 34). E estaremos encaminhando para a liberação da CONEP, para a fase I na miocardiopatia chagásica em caso de encontrarmos órgãos fomentadores para dar continuidade a essa pesquisa.

Esta pesquisa apresenta uma limitação importante, que não pode ser omitida, não pudemos realizar a caracterização imunofenotípica do produto celular, em virtude de falta de recursos, o que foi motivo de outro estudo, ainda em andamento; o que felizmente não ocorreu com o estudo Humano, onde estas foram caracterizadas.

A transferência deste modelo animal para o Humano obedeceu algumas particularidades da espécie Humana e encontra-se protegida por sigilo de patente, no que concernem vários de seus aspectos.

Do ponto de vista de desenvolvimento sustentável biotecnológico, este modelo proposto atende aos princípios de processo biodegradável e nada mais ecológico do que o “homem reparando a si próprio”.

A pesquisa do **“Desenvolvimento do bioprocesso de co-cultivo de mioblastos esqueléticos e de células-tronco mesenquimais para a regeneração do miocárdio. Modelo em murinos”** não se esgota nesta defesa e dissertação nem tão pouco na sua já realizada transferência para o ser Humano, há muito para se aprimorar.

FIGURA 34 - APROVAÇÃO PARA A FASE I DE PESQUISA EXPERIMENTAL EM HUMANOS.



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde

Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.

PARECER N° 1224/2003

Registro CONEP: 6028

Registro CEP: 67. Processo: n°250000.141005/2002-92

Projeto aprovado com recomendação: Transplante autólogo de células mioblásticas esqueléticas e células-tronco no Infarto do Miocárdio.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Caracterização imunofenotípica cinética do co-cultivo de ME e células-tronco mesenquimais e de seu produto celular *versus* os cultivos isolados de ME e de células-tronco mesenquimais.

Estabelecimento da rotina de citometria de fluxo para imunofenotipagem do produto celular do co-cultivo de ME e células-tronco mesenquimais.

Identificar no produto final do co-cultivo de ME e células-tronco mesenquimais algoritmos prognósticos.

Caracterização da expressão gênica por *microarray* do produto celular do co-cultivo de ME e CTME.

Transferência do co-cultivo de ME e CTME para escala industrial em Biorreatores individuais para cada paciente, podendo controlar as diversas etapas

do cultivo celular, com implantação de sistemas fechados e minimizando as etapas de manipulação humana e seus riscos de contaminações.

REFERÊNCIAS

- AL ATTAR, N.; RAZAK, A. B.; SCORSIN, M. Cellular transplantation: new horizons in the surgical management of heart failure. **J R Coll Edinb**, 47(6): 749-752, 2002.
- ANVERSA, P.; KAJSTURA, J.; LERI, A.; BOLLI, R. Life and death of cardiac stem cells: a paradigm shift in cardiac biology. **Circulation**, 113(11):1451-1463, 2006.
- ARAÚJO, D. V.; TAVARES, L. R.; VERÍSSIMO, R.; FERRAZ, M. B.; MESQUITA, E. T. Custo da insuficiência cardíaca no sistema único de saúde. **Arq Bras Cardiol**, 84(5): 422-27, 2005
- ASAKURA, A.; SEALE, P.; GIRGIS-GABARDO, A.; RUDNICKI, M. A. Myogenic specification side population cells in skeletal muscle. **JCB**, 159(1):123-34, 2002.
- ASSMUS, B.; SCHACHINGER, V.; TEUPE, C.; BRITTEN, M.; LEHMANN, R.; DOBERT, N et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). **Circulation**, 106 (24):3009 –3017, 2002.
- BACIGALUPO, A. Mesenchymal stem cells and haematopoietic stem cell transplantation. **Best practice & Research Clinical Haematology**, 17(3): 387- 399, 2004.
- BADORFF, C.; BRANDES, R. P.; POPP, R.; RUPP, S.; URBICH, C.; AICHER, A et al. Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. **Circulation**, 107(7):1024, 2003.
- BAYES-GENIS, A.; SALIDO, M.; SOLE, R. F.; PUIG, M.; BROSSA, V.; CAMPRECIOS, M et al. Host cell-derived cardiomyocytes em sex-mismatch cardiac allografts. **Cardiovasc Res**, 56(3):404-10, 2002.
- BARBERI, T.; WILLIS, L. M.; SOCCI, N. D.; STUDER, L. Derivation of multipotent mesenchymal precursors from human embryonic stem cells. **PloS Med**, 2(6):161, 2005.
- BAUMGARTHER, I.; PIECZEK, A.; MANOR, O., BLAIR, R., KEARNEY, M.; WALSH, K et al. Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia [Report]. **Circulation**, 97(12):1114-23, 1998.
- BIANCO, P.; RIMINUCCI, M.; GRONTHOS, S.; OBEY, P. G. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. **Stem Cells**,. 19(3):180-92, 2001.
- BLAND, J. M and ALTMAN, D. G. Measuring agreement in method comparison studies. **Stat Methods Med Res**, 8(2):135-60, 1999.
- BOCCHI, E. A.; BELLOTTI, G.; MOCELIN, A. O.; UIP, D.; BACAL, F.; HIGUCHI, M. L et al. Heart Transplantation for Chronic Chagas' Heart Disease. **Ann Thorac Surg**, 61: 1727-1733, 1996.

BOHELER, K. R.; CZYZ, J.; TWEEDIE, D.; YANG, H.T.; ANISIMOV, S. V., WOBUS, A. M. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes [review]. **Circ Res**, 91(3):189-201, 2002.

BOYÜM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. **Scan J Clin Lab Invest**, 21(suppl):77-89, 1968.

CARVALHO, K. A.; GUARITA-SOUZA, L. C.; REBELATTO, C. L.; SENEGAGLIA, A. C.; HANSEN, P.; MENDONÇA, J. G et al. Could the coculture of skeletal myoblasts and mesenchymal stem cells be a solution for postinfarction myocardial scar? **Transp Proc**, 36(4):1023-4, 2004.

CARVALHO, K. A.; GUARITA-SOUZA, L. C.; SIMEONE, R. B.; FRANCISCO, J. C.; OLANDOSKI, M.; GREMSKI, W. Proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells, skeletal muscle cells and co-culture of both for cell myocardium therapy in Wistar rats. **Transplant Proc**, 38(6):1955-6, 2006a.

CARVALHO, K. A.; GUARITA-SOUZA, L. C.; HANSEN, P.; REBELATTO, C. L.; SENEGAGLIA, A. C.; MIYAGUE, N et al. Cell transplantation after the coculture of skeletal myoblasts and mesenchymal stem cells in the regeneration of the myocardium scar: an experimental study in rats. **Transplant Proc**, 38(6):1596-602, 2006b.

CHACHQUES, J. C.; ACAR, C.; HERREROS, J.; TRAININI, J. C.; PROSPER, F.; D'ATTELLIS, N et al. Cellular cardiomyoplasty: clinical application. **Ann Thorac Surg**, 77(3):1121-30, 2004.

CHACHQUES, J. C.; HERREROS, J.; TRAININI, J.; JUFFE, A.; RENDAL, E.; PROSPER, F.; GENOVESE, J. Autologous human serum for cell culture avoids the implantation of cardiovectorsdesfibrilators in cellular cardiomyoplasty. **Int J Cardiol**, 95(suppl II):S29-33, 2004.

CHACHQUES, J. C.; SALANSON-LAJOS, C.; LAJOS, P.; SHAFY, A.; ALSHAMRY, A.; CARPENTIER, A. Cellular cardiomyoplasty for myocardial regeneration [review paper]. **Asian Cardio Thorac Ann**, 13(3):287-96, 2005.

CHEDRAWY, E. G.; WANG, J. S.; NGUYEN, D. M.; SHUM-TIM, D.; CHIU, R. C. J. Incorporation and integration of implanted myogenic and stem cells into native myocardial fibers: anatomic basis for functional improvements. **J Thorac Cardiovasc Surg**, 124(3):584-90, 2002.

CHEN, S. L.; FANG, W.W.; YE, F.; LIU, Y. H.; QIAN, J.; SHAN, S. J et al. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. **Am J Cardiol**, 94(1):92-95, 2004.

CIVIN, C. I. Stem cell research: back to the future [editorial]. **Stem Cells**, 19(5):356-7, 2001.

- CONBOY, I.M.; CONBOY, M. J.; SMYTHE, G. M.; RANDO, T. A. Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle. **Science**, 302(5650):1575-7, 2003.
- COWAN, C. A.; KLIMANSKAYA, I.; MCMAHON, J.; ATIENZA, J.; WITMYER, J.; ZUCKER, J. P et al. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts [special report]. **NEJM**, 350(13):1353-6, 2004.
- DEANS, R. J.; MOSELEY, A. B. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses [review]. **Exp Hematol**, 28(8):875-84, 2000.
- DED, A.; WANG, S.; SKELDING, K. A.; MILLER, D.; SIMPER, D.; CAPLICE, N. M. Bone Marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart: a study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients. **Circulation**, 107(9):1247-9, 2003.
- DELAPORTE, C.; DEHAUPAS, M.; FARDEAU, M. Comparison between the growth pattern of cell cultures from normal and Duchenne dystrophy muscle. **J Neurol Sci**, 64(2):149-60, 1984.
- FERRARI, G.; CUSELLA, G.; DE ANGELIS, G. C.; COLETTA, M.; PAOLUCCI, E.; STORNAIUOLO, A et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. **Science**, 279(5356):1528-30, 1998.
- FONTES, P. A.; THOMSON, A. W. Stem cell technology. **BMJ**, 319(7220):1308, 1999.
- FUKUDA, K. Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering. **Artificial Organs**, 25(3):187-93, 2001.
- GRAF, T. Differentiation plasticity of hematopoietic cells. **Blood**, 99(9):3089-3101, 2002.
- GROUND, M. D.; WHITE, J. D.; ROSENTHAL, N.; BOGOYEVITCH, M. A. The role of stem cells in skeletal and cardiac muscle repair. **J Histochem Cytochem**, 50(5):589-610, 2002.
- GUARITA-SOUZA, L. C.; CARVALHO, K. A. T.; REBELATTO, C.; SENEGAGLIA, A.; HANSEN, P.; FURUTA, M et al. Cell transplantation: differential effects of myoblasts and mesenchymal stem cells. **Int J Cardiol**, 111(3):423-9, 2005.
- GUARITA-SOUZA, L. C.; CARVALHO, K. A. T.; WOITOWICZ, V.; REBELATTO, C.; SENEGAGLIA, A.; HANSEN, P et al. Simultaneous autologous transplantation of cocultured mesenchymal stem cells and skeletal myoblasts improves ventricular function in a murine model of Chagas disease. **Circulation**, 114(1)Suppl :120-4, 2006.
- HAGÈGE, A. A.; MAROLLEAU, J-P.; VILQUIN, J-T.; ALHÉRITIÈRE, A.; PEYRARD, S.; DUBOC, D et al. Skeletal myoblast transplantation in ischemic heart failure: long-term follow-up of the first phase I Cohort of patients. **Circulation**, 114(1) Suppl:108-13, 2006.
- HAWLEY, R. G. National stem cell resource: stem cells find a niche [editorial]. **Stem Cells**, 19(6):475-6, 2001.

HENNINGSON, J. R. C. T.; STANISLAUS, M. A.; GEWIRTZ, A. M. Embryonic and adult stem cell therapy. **J Allergy Clin Immunol**, 111(2):S745-53, 2003.

HESCHELER, J.; FLEISCHMANN, B. K. Indispensable tools: embryonic stem cells yield insights into the human heart. [commentary]. **J Clin Invest**, 108(3):363-364, 2001.

IANNI, B. M.; MADY, C. Terapêutica da forma crônica da doença de Chagas. É eficaz o tratamento etiológico? **Arq Bras Cardiol**, 70(1): 59-61, 1998.

ISNER, J. M.; PIECZEK, A.; SCHAINFELD, R.; BLAIR, R.; HALEY, L.; ASAHARA, T et al. Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb [Report]. **Lancet**, 348(9024):370-4, 1996.

JACKSON, K. A.; MAJKA, S. M.; WANG, H.; POCIUS, J.; HARTLEY, C. J.; MAJESKY, M. W et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. **J Clin Invest**, 107(11):1395-1402, 2001.

JACKSON, K. A.; MI, T.; GOODELL, M. A. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. **PNAS**, 96(25):14482-6, 1999.

KAWADA, H.; OGAWA, M. Bone marrow origin of hematopoietic progenitors and stem cells in murine muscle. **Blood**, 98(7):2008-13, 2001.

KAWAMOTO, A.; GWON, H. C.; IWAGURO, H.; YAMAGUCHI, J-I.; UCHIDA, S.; MASUDA, H et al. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. **Circulation**, 103(5):634-39, 2001.

KEREIAKES, D. J. Stem cells: the chameleon fountain of youth [mini-review]. **Circulation**, 107(7):939-40, 2003.

KOH, G. Y.; KLUG, M.G.; SOONPAA, M. H.; FIELD, L. J. Long term survival of AT-1 cardiomyocytes grafts in syngeneic myocardium. **Am J Physiol**, 264:H1727-H1733, 1993.

KUEHNLE, I.; GOODELL, M. A. The therapeutic potential of stem cells from adults. **BMJ**, 325(7360):372-6, 2002.

LAFLAMME, M. A.; MYERSON, D.; SAFFITZ, J. E.; MURRY, C. Evidence for cardiomyocyte repopulation by extracardiac progenitors in transplanted human hearts. **Circ Res**, 90(6):634-40, 2002.

LAW, P. K.; HAIDER, K.; FANG, G.; JIANG, S.; CHUA, F.; LIM, Y. T et al. Human VEGF165-myoblasts produce concomitant angiogenesis/myogenesis in the regenerative heart. **Mol Cell Biochem**, 263(1-2):173-8, 2004.

LAUGWITZ, K-L.; MORETTI, A.; LAM, J.; GRUBER, P.; CHEM, Y.; WOODARD, S et al. Postnatal Isl 1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. **Nature**, 433(7026):647-53, 2005.

LEE, H-S.; HUANG, G-T.; CHIANG, H.; CHIOU, L-L.; CHEN, M-H.; HSIEH, C-H et al. Multipotential mesenchymal stem cells from femoral bone marrow near the site of osteonecrosis. **Stem Cells**, 21(2):190-9, 2003.

LEE, M. S.; LIL, M.; MAKKAR, R. R. Stem cell transplantation in myocardial infarction. **Cardiovasc Med**, 5(2):82-98, 2004.

LEE, M. S.; MAKKAR, R. R. Stem-cell transplantation in myocardial infarction: a status report [review]. **Ann Intern Med**, 140(9):729-37, 2004.

LI, Y.; FOSTER, W.; DEASY, B. M.; CHAN, Y.; PRISK, V.; TANG, Y et al. Transforming Growth Factor-1 Induces the Differentiation of Myogenic Cells into Fibrotic Cells in Injured Skeletal Muscle. A Key Event in Muscle Fibrogenesis. **AJP**, 164 (3): 1007–1019, 2004.

LI, R.K.; JIA, Z-Q.; WEISEL, R. D.; MICKLE, D. A. G.; ZHANG, J.; MOHABEER, M. K, et al. Cardiomyocyte transplantation improves heart function. **Ann Thorac Surg**, 62:654-61, 1996.

LI, R. K.; JIA, Z-Q.; WEISEL, R. D.; MICKLE, D. A. G.; CHOI, A.; YAU, T. M. Survival and function of bioengineered cardiac grafts. **Circulation**, 100(19) Suppl: II-63, 1999a.

LI, R. K.; JIA, Z-Q.; WEISEL, R. D.; MERANTE, F.; MICKLE, D. A. Smooth muscle cell transplantation into myocardial scar tissue improves heart function. **J Mol Cell Cardiol**, 31:513–522, 1999b.

LOSORDO, D.W.; VALE, P. R.; SYMES, J. F.; DUNNINGTON, C.H.; ESAKOF, D. D.; MAYSKY, M et al. Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia **Circulation**, 98(25):2800-4, 1998.

MACHADO, F.; MARTINS, G. A.; ALIBERTI, J. C.; MESTRINER, F. L.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J.S. Trypanosoma cruzi-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependen trypanocidal activity. **Circulation**, 102(24):3003-8, 2000.

MAJKA, S. M.; JACKSON, K. A.; KIENSTRA, K. A.; MAJESKY, M. W.; GOODELL, M. A.; HIRSCHI, K. K. Distinct progenitor populations in skeletal muscle are bone marrow derived and exhibit different cell fates during vascular regeneration. **J Clin Invest**, 11(1):71-9, 2003.

MARTIN-RENDON, E.; WATT, S. M. Exploitation of stem cell plasticity [review article]. **Transf Med**, 13(6):325-49, 2003.

MCKINNEY-FREEMAN, S. L.; JACKSON, K. A.; CAMARGO, F. D.; FERRARI, G.; MAVILIO, F.; GOODELL, M. A. Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin. **PNAS**, 99(3):1341-6, 2002.

MINGUELL, J. J.; ERICES, A.; CONGET, P. Mesenchymal stem cells [minireview]. **Exp Biol Med**, 226(6):507-20, 2001.

MONTECINO-RODRIGUEZ, E.; LEATHERS, H.; DORSHKIND, K. Expression of connexin 43 (Cx43) is critical for normal hematopoiesis. **Blood**, 96(3):917-24, 2000.

MULLER-EHMSSEN, J.; WHITTAKER, P.; KLONER, R. A.; DOW, J. S.; SAKODA, T.; LONG, T. I et al. Survival and development of neonatal rat cardiomyocytes transplanted into adult myocardium. **J Mol Cell Cardiol**, 34(2):107-16, 2002.

MUROHARA, T.; ASAHARA, T.; SILVER, M.; SILVER, M.; BAUTERS, C.; MASUDA, H.; KALKA, C et al. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. **J Clin Invest**, 101(11):2567-78, 1998.

MURRY, C. E.; FIELD, L. J.; MENASCHÉ, P. Cell-Based Cardiac Repair: Reflections at the 10-Year Point. **Circulation**, 112(20):3174-83, 2005.

NAGAYA, N.; KANGAWA, K.; ITOH, T.; IWASE, T.; MURAKAMI, S.; MIYAHARA, Y et al. Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. **Circulation**, 112(83):1128-35, 2005.

ODORICO, J. S.; KAUFMAN, D. S.; THOMSON, J. A. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines [concise review]. **Stem Cells**, 19(3):193-204, 2001.

ÓRGÃO OFICIAL DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS - ABTO. **Registro Brasileiro de Transplantes**. Janeiro/ Junho; 1: 2-6, 2006 .

ORLIC, D.; KAJSTURA, J.; CHIMENTI, S.; JAKONIUK, I.; ANDERSON, S. M.; LI, B et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. **Nature**, 410(6829):701-5, 2001a.

ORLIC, D.; KAJSTURA, J.; CHIMENTI, S.; LIMANA, F.; JAKONIUK, I.; QUAINI, F et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. **PNAS**, 98(18):10344-9, 2001b.

OSWALD, J.; BOXBERGER, S.; JORGENSEN, B.; FELDMANN, S.; EHNINGER, G.; BORNHÄUSER, M et al. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. **Stem Cells**, 22(3):377-8, 2004.

PENN, M. S.; FRANCIS, G. S.; ELLIS, S. G.; YOUNG, J. B.; MCCARTHY, P. M.; TOPOL, E. J. Autologous cell transplantation for the treatment of damaged myocardium [review article]. **Pcad**, 45(1):21-32, 2002.

PERIN, E. C.; DOHMANN, H. F.; BOROJEVIC, R.; SILVA, S. A.; SOUSA, A. L.; MESQUITA, C. T et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. **Circulation**, 107 (18):2294 -2302, 2003a.

PERIN, E. C.; GENG, Y.; WILLERSON, J. T. Adult stem cell therapy in perspective. [Minireview]. **Circulation**, 107(7):935-8, 2003b.

PIETERNELLA, S. A.; NOORT, W. A.; SCHERJON, A. S.; KLEUBURG-VAN DER KEUR, C.; KRUISSELBRINK, A. B.; VAN-BEZOOIJEN, R. L et al. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. **Haematologica**, 88(8):845-2, 2003.

PITTENGER, M. F.; MACKAY, A. M.; BECK, S. C.; JAISWAL, R. K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J. D et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, 284(5411):143-7, 1999.

PITTENGER, M. F.; MARTIN, B. J. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics [Reviews]. **Circ Res**, 95(1):9-20, 2004.

POUZET, B.; VILQUIN, J.-T.; HAGÈGE, A. A.; SCORSIN, M.; MESSAS, E.; FISZMAN, M et al. Intramyocardial Transplantation of Autologous Myoblasts Can Tissue Processing Be Optimized? **Circulation**, 102[suppl III]:III-210-III-215, 2000.

PRÓSPER, F.; PEREZ, A.; MERINO, J.; RÁBAGO, G.; CHACHQUES, J.C.; HERNANDEZ, M et al. Adult stem cells for myocardial repair. **Basic appl Myol**, 13(1):15-22, 2003.

QUAINI, F.; URBANEK, K.; BELTRAMI, A. P.; FINATO, N.; BELTRAMI, C. A.; NADALGINARD, B et al. Chimerism of the transplanted heart. **NEJM**, 346(1):5-15, 2002.

QU-PETERSEN, Z.; DEASY, B.; JANKOWSKI, R.; IKEZAWA, M.; CUMMINS, J.; PRUCHNIC, R et al. Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. **JCB**, 147(5):851-64, 2002.

REINECKE, H.; ZHANG, M.; BARTOSEK, T.; MURRY, C.E. Survival, integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts: A study in normal and injured rat hearts. **Circulation**, 100:193-202, 1999.

REYES, M.; DUDEK, A.; JAHAGIRDAR, B.; KOODIE, L.; MARKER, P. H.; VERFAILLIE, C. M. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. **J Clin Invest**, 109(3): 337-46, 2002.

REYES, M.; LUND, T.; LENVIK, T.; AGUIAR, D.; KOODIE, L.; VERFAILLIE, C. M. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. **Blood**, 98(9):2615-25, 2001.

ROSSI, M.; BESTETTI, R. B. The challenge of Chagas' cardiomyopathy: the pathologic roles of autonomic abnormalities, autoimmune mechanisms and microvascular changes, and therapeutic implications. **Cardiology**, 86(1):1-7, 1995.

SCHIEKER, M.; PAUTKE, C.; REITZ, K.; HEMRAJ, I.; NETH, P.; MUTSCHLER, W et al. The use of four-color immunofluorescence techniques to identify mesenchymal stem cells. **J Anat**, 204(2):133-9, 2004.

SCORSIN, M.; HAGÈGE, A.; VILQUIN, J-T.; FISZMAN, M.; MAROTTE, F.; SAMUEL, J-L et al. Comparison of the effects of fetal cardiomyocyte and skeletal myoblast transplantation on postinfarction left ventricular function. **J Thorac Cardiovasc Surg**, 119(6):1169-1175, 2000.

SIMINIAK, T.; URPI SZ, M. Myocardial replacement therapy. **Circulation**, 108(10):1167-75, 2003.

STAMM, C.; STEINHOFF, G. Bone marrow stem cell transplantation for myocardial regeneration. **BIOforum Europe**, 5(4):1-4, 2003.

STEINHELPER, M. E.; FIELD, L. J. SV40 Large T-antigen induces cardiomyocytes proliferation in transgenic mice. **In the development and regenerative potential of cardiac muscle**. 1990. Edited by J. Oberpriner New York Academic.

STRAUER, B. E.; BREHM, M.; ZEUS, T.; KOSTERING, M.; HERNANDEZ, A.; SORG, R. V et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. **Circulation**, 106 (15):1913–1918, 2002.

SOLTER, D.; GEARHART, J. Enhanced: putting stem cells to work. **Science**, 283(5407):1468-70, 1999.

SOUZA, L. C, CARVALHO, K. A.; REBELATTO, C.; SENEGAGLIA, A.; FURUTA, M.; MIYAGUE, N et al. Combined transplantation of skeletal myoblasts and mesenchymal cells (cocultivation) in ventricular dysfunction after myocardial infarction. **Arq Bras Cardio**, 83(4):294-9, 2004.

TAKESHITA, S.; ZHENG, L. P.; BROGI, E.; KEARNEY, M.; PU, L. Q.; BUNTING, S et al. Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. **J Clin Invest**, 93(2):662-70, 1994.

TOMA, C.; PITTENGER, M. F.; CAHILL, K. S.; BYRNE, B. J.; KESSLER, P. D. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. **Circulation**, 105(1):93-8, 2002.

TOMITA, S.; LI, R. K.; WEISEL, R. D.; MICKLE, D. A. G.; KIM, E-J.; SAKAI, T et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. **Circulation**, 100(19) Suppl: II-247, 1999.

UCHIDA, N.; BUCK, D. W.; HE, D.; REITSMA, M. J.; MASEK, M.; PHAN, T. V et al. Direct isolation of human central nervous stem cells. **PNAS**, 97(26):14720-5, 2000.

VERFAILLIE, C. M.; PERA, M. F.; LANDSDORP, P. M. Stem cell: hype and reality. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, 369-91, 2002.

WATT, F. M.; HOGAN, B. L. M. Out of Eden: stem cells and their niches. **Science**, 287(5457):1427-30, 2000.

WATT, S. M.; BÜHRING, H.J.; RAPPOLD, I.; CHAN, J. Y.; LEE-PRUDHOE, J.; JONES, T et al. CD164, a novel sialomucine on CD34+ and erythroid subsets, is located on human chromosome 6q21. **Blood**, 92(3): 849-66, 1998.

WEISSMAN, I. L. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. **Cell**, 100(1):157-68, 2000.

WOLLERT, K. C.; MEYER, G. P.; LOTZ, J.; RINGES-LICHTENBERG, S.; LIPPOLT, P.; BREIDENBACH, C et al. Intracoronary autologous bonemarrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomized controlled clinical trial. **Lancet**, 364 (9429):141–148, 2004.

WOLLERT, K. C.; DREXLER, H. Clinical applications of stem cells for heart. **Circ Res**, 96(2):151-63, 2005.

YANNAKI, E.; PAPAYANNOPOULOU, T. H. Stem cells have an identity crisis [review article]. **Haema**, 4(3):158-66, 2001.

YOO, K. J.; LI, R-K.; WEISEL, R. D.; MICKLE, D. A. G.; JIA, Z-Q.; KIM, E-J et al. Heart cell transplantation improves heart function in dilated cardiomyopathic hamsters. **Circulation**, 102:III204 –III209, 2000.

ZAMMIT, P. S.; BEAUCHAMP, J.R. The skeletal muscle satellite cell: stem cell or son of stem cell? **Differentiation**, 68(4-5):193-204, 2001.

ZVAIFLER, N. J.; MARINOVA-MUTAFCHIEVA, L.; ADAMS, G.; EDWARDS, C. J.; MOSS, J.; BURGUER, J. A et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. **Arthritis Res**, 2(6):477-88, 2000.