



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Victor Hugo Martins de Miranda

**TERAPIA CELULAR COM CÉLULAS MONONUCLEARES DE
MEDULA ÓSSEA PREVINE A DISFUNÇÃO VENTRICULAR
ESQUERDA EM MODELO DE SOBRECARGA VOLUMÉTRICA
EM RATOS?**

Botucatu

2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Victor Hugo Martins de Miranda

**TERAPIA CELULAR COM CÉLULAS MONONUCLEARES DE
MEDULA ÓSSEA PREVINE A DISFUNÇÃO VENTRICULAR
ESQUERDA EM MODELO DE SOBRECARGA VOLUMÉTRICA
EM RATOS?**

Monografia apresentada como parte do estágio obrigatório do curso de Ciências Biológicas, para a obtenção do título de Bacharel junto ao Departamento de Fisiologia, do Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Patrícia Fidelis de Oliveira Gregolini e co – orientação da Prof^a. Dr^a, Juliana Irani Fratucci de Gobbi.

Botucatu

2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Miranda, Victor Hugo Martins de.

Terapia celular com células mononucleares de medula óssea previne a disfunção ventricular esquerda em modelo de sobrecarga volumétrica em ratos? / Victor Hugo Martins de Miranda. - Botucatu, 2015

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Patrícia Fidelis de Oliveira Gregoline
Coorientador: Juliana Irani Fratucci de Gobbi
Capes: 20702027

1. Coração - Doenças. 2. Barorreflexo. 3. Células da medula óssea. 4. Ecocardiografia. 5. Insuficiência aórtica.

Palavras-chave: barorreflexo; células mononucleares de medula óssea; ecocardiografia; insuficiência aórtica; remodelamento cardíaco.

Agradecimentos

Quero mostrar os meus sinceros agradecimentos à instituição de ensino, por me proporcionar uma formação sólida, em Ciências Biológicas, modalidade bacharelado;

A professora e orientadora Patrícia Fidelis de Oliveira, pela sua atenção, ajuda e disponibilidade de tempo para solucionar as dúvidas e correção do trabalho, e também por demonstrar toda sua confiança para a realização deste projeto;

A professora e co-orientadora Juliana Irani Fratucci de Gobbi, pela sua contribuição no desenvolvimento do projeto e por disponibilizar o seu tempo na solução das dúvidas;

A Samanta e a Mariana, alunas do laboratório de terapia celular e doenças cardiovasculares;

A Paloma e a Ana Carolina, alunas do laboratório de regulação hidromineral e cardiovascular;

Aos meus pais, que sempre acreditaram na minha dedicação e que me ajudaram nessa minha grande luta e na jornada ao longo da minha formação acadêmica.

“Se atravessarmos a vida convencidos de que a nossa é a única maneira de pensar que existe, vamos acabar perdendo todas as oportunidades que surgem a cada dia”

Akio Morita

LISTA DE ABREVIATURAS

AE/AO: Relação do átrio esquerdo sobre a aorta;

AE (mm): átrio esquerdo;

CT: Célula tronco;

CMMO: Células mononucleares de medula óssea;

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium (meio de cultura);

DC (mL/ min): Débito cardíaco;

DPDT- (mmHg/s): índice de relaxamento cardíaco;

DPDT+ (mmHg/s): índice de contratilidade cardíaca;

E/A: razão entre velocidade do fluxo durante a fase de enchimento ventricular passivo e velocidade do fluxo durante a fase de contração atrial;

E'Mitral: velocidade de deslocamento tissular do ânulo da mitral no momento do enchimento ventricular passivo;

Emitral/ E'mitral: Razão entre a velocidade do fluxo passivo do sangue no ventrículo esquerdo com a velocidade de deslocamento tissular do ânulo da mitral no momento do enchimento ventricular passivo;

FC (bpm): frequência cardíaca;

FCI (bpm): Frequência cardíaca intrínseca;

FENIL: Fenilefrina;

FEA %: Fração de encurtamento relacionado à sístole do ventrículo esquerdo;

IC: Insuficiência cardíaca;

IP: Intervalo de pulso

IAo: Insuficiência aórtica;

Índ. De Esf.: Relação do L maior e L menor;

I.m.: Administração intramiocárdica

Iv: Intravenoso;

Lmenor: maior diâmetro do corte transversal;

Massa do VE: Massa do ventrículo esquerdo;

MSC: células mesenquimais estromais de medula óssea

NPS: Nitroprussiato de sódio;

PVE (mmHg): Pressão do ventrículo esquerdo;

PDFVE (mmHg): Pressão diastólica final do ventrículo esquerdo;

PA (mmHg): Pressão arterial;

PAM (mmHg): Pressão arterial média;

PAD (mmHg): Pressão diastólica;

PAS (mmHg): Pressão sistólica;

S`Mitral: Medida da velocidade de deslocamento tissular do ânulo da valva mitral durante a sístole ventricular esquerda;

VE: Ventrículo esquerdo;

VTI (cm): Integral do fluxo da aorta;

VED (mm): Diâmetro do ventrículo esquerdo em diástole;

VES (mm): Diâmetro do ventrículo esquerdo em sístole;

V AE 4C (cm³): Volume do átrio esquerdo obtido no corte de quatro câmaras;

Resumo

A insuficiência cardíaca (IC) é o estágio final de diferentes doenças cardíacas incluindo a sobrecarga volumétrica decorrente de insuficiência aórtica (IAo). Devido à alta taxa de mortalidade, terapias alternativas utilizando célula-tronco (CT) contidas na porção de células mononucleares da medula óssea (CMMO) têm sido investigadas. Uma vez que a hipótese de regeneração cardíaca com uso de CT tem sido debatida e que diferentes mecanismos (ação citoprotetora, antifibrótica e anti-inflamatória) têm sido aventados, a utilização de CT em modelo de doença cardíaca sem perda tecidual significativa torna-se pertinente. Dentro deste contexto, a atual proposta visou investigar o efeito da administração intramiocárdica (im) de CMMO sobre o processo de remodelamento e balanço autonômico cardíaco em ratos Wistar com IAo. Para tanto as CMMO foram obtidas a partir da medula óssea total por gradiente de ficoll. A IAo foi induzida experimentalmente e confirmada por ecocardiografia após uma semana da indução. Os animais foram submetidos aleatoriamente à administração *im* de DMEM ou CMMO (5×10^6 células/100 μ L). Animais SHAM foram utilizados como padrão de normalidade. Foram feitas avaliações ecocardiográficas pré-tratamento (1 semana após IAo) e na 3ª e 7ª semana após tratamento por administração *im*. Na 7ª semana foram feitos registros de pressão arterial e frequência cardíaca para obtenção da sensibilidade do barorreflexo e avaliação do tônus autonômico. Ao final do estudo o coração foi coletado para análise do percentual de fibrose. Após a 1ª semana de indução de IAo (ECO pré-tratamento), observamos dilatação de ventrículo (IE) e átrio esquerdo (AE/Ao) bem como hipertrofia (IH) nos grupos IAo+DMEM (IE: $0,78 \pm 0,06$; AE/Ao: $1,65 \pm 0,17$; IH: $0,77 \pm 0,07$ cm^3/kg) e IAo+CMMO (IE: $0,85 \pm 0,03$; AE/Ao: $1,72 \pm 0,10$; IH: $0,70 \pm 0,08$ cm^3/kg) quando comparados ($p < 0,05$) ao SHAM (IE: $0,62 \pm 0,03$; AE/Ao: $1,28 \pm 0,08$; IH: $0,58 \pm 0,04$ cm^3/kg). Portanto, os grupos com IAo partiram do mesmo grau de disfunção. Após

3semanas, observamos que a administração im de CMMO não promoveu alterações dos parâmetros do ECO quando comparada a administração im de DMEM (IE: $0,79 \pm 0,04$ vs $0,88 \pm 0,04$; AE/Ao: $1,49 \pm 0,08$ vs $1,67 \pm 0,12$; IH: $1,06 \pm 0,08$ cm³/kg vs $1,16 \pm 0,09$ cm³/kg; FEA: $47 \pm 3\%$ vs $41 \pm 2\%$; E/A: $1,71 \pm 0,20$ vs $1,88 \pm 0,27$). Resultados similares de ECO foram obtidos na 7^a semana, demonstrando que a administração im de CMMO não preveniu as alterações morfofuncionais cardíacas. Não houve modificação da sensibilidade do barorreflexo e do tônus autonômico. Os dados da PVE também não mostraram diferença significativa entre os grupo IAo+CMMO e IAo+DMEM para os parâmetros pressão diastólica final do VE (6 ± 2 vs 10 ± 3 mmHg), contratilidade (6115 ± 315 vs 4900 ± 446 mmHg/s) e relaxamento cardíaco (-3731 ± 175 vs -3438 ± 313 mmHg/s). Não foi observado aumento de fibrose cardíaca no modelo de IAo e a terapia celular não modificou este parâmetro histológico. A administração im de CMMO, uma semana após indução de IAo, não foi capaz de promover melhora morfofuncional cardíaca na terceira e sétima semana após tratamento bem como não modificou a sensibilidade do barorreflexo, tônus autonômico e fibrose cardíaca.

Palavras-chaves: insuficiência aórtica, células mononucleares de medula óssea, remodelamento cardíaco, ecocardiografia, barorreflexo.

ABSTRACT

Heart failure (HF) is the end stage of different cardiac diseases including volume overload associated to aortic regurgitation (AR). Due to high mortality related to HF, alternative therapies using stem cell (SC) contained in bone marrow mononuclear cells (BMMNC) portion have been investigated. Since the cardiac regeneration hypothesis by SC has been debated and considering that different mechanisms (cytoprotective, anti-inflammatory and antifibrotic action) have been suggested, the use of SC in cardiac disease model without significant tissue loss becomes relevant. Within this context, the present study aims to investigate the effect of BMMNC intramyocardial administration (*im*) on remodeling and cardiac autonomic balance in AR Wistar rats. BMMNC were obtained from total bone marrow by ficoll gradient. The AR was induced experimentally and confirmed by echocardiography (ECHO) one week after. The animals were randomly assigned to *im* administration of DMEM (control) or BMMNC (5×10^6 cells/100 μ L). SHAM animals were used for normal parameters acquisition. Echocardiographic evaluations were obtained at pre treatment (1 week after AR) and in the 3th and 7th week after treatment by *im* administration. In 7th week blood pressure and heart rate were recorded aiming to obtain the baroreflex sensitivity and the evaluation of autonomic tonus. At the final of the study, the heart was collected for analyses of the fibrosis percentage. After 1 week of AR induction (ECHO pré-treatment), we observed left ventricle (SI) and left atrium (LA/Ao) dilatation and the hypertrophy (HI) in the groups AR+DMEM (SI= $0,85 \pm 0,03$; LA/Ao= $1,65 \pm 0,17$; HI= $0,77 \pm 0,07$ cm³/kg) when compared ($p < 0,05$) with the SHAM (SI= $0,62 \pm 0,03$; LA/Ao= $1,28 \pm 0,08$; HI= $0,58 \pm 0,04$ cm³/kg). Therefore, the groups with AR departed from the same degree of dysfunction. After 3 weeks, we observed that the *im* administration of BMMNC didn't change the ECHO parameters when compared to DMEM *im* administration (SI: $0,79 \pm 0,04$

vs $0,88 \pm 0,04$; LA/Ao: $1,49 \pm 0,08$ vs $1,67 \pm 0,12$; HI: $1,06 \pm 0,08$ cm³/kg vs $1,16 \pm 0,09$ cm³/kg; FS: $47 \pm 3\%$ vs $41 \pm 2\%$; E/A: $1,71 \pm 0,20$ vs $1,88 \pm 0,27$). Similar results were obtained in the ECHO at 7 weeks after treatment, showing that the administration of BMMNC did not prevent heart morphological changes. There were no modification of baroreflex sensitivity and autonomic tonus. LVP data were not significantly different between AR+BMMNC and AR+DMEM groups for LV end-diastolic pressure (6 ± 2 vs 10 ± 3 mmHg), cardiac contractility (6115 ± 315 vs 4900 ± 446 mmHg/s) and relaxation (-3731 ± 175 vs -3438 ± 313 mmHg/s). Cardiac fibrosis was not augmented in AR model and cell therapy did not modify this histological parameter. The administration of BMMNC, one week after induction of AR, was not able to improve cardiac morphofunction in the third and seventh week after treatment and did not modify the baroreflex sensitivity, autonomic tonus and cardiac fibrosis.

Key-words: aortic regurgitation, bone marrow mononuclear cells, cardiac remodeling, echocardiography, baroreflex.

Sumário

	Páginas
1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo geral	18
2.2. Objetivos específicos	18
3.MATERIAL E METODOS	19
3.1. Animais	19
3.2.Indução da Insuficiência Aórtica (IAo)	19
3.3. Obtenção de células mononucleares de medula óssea (CMMO)	20
3.4. Delineamento e protocolo experimental	21
3.4.1. Período de pré-tratamento e administração i.m.	21
3.4.2. Período pós-tratamento	22
3.5. Avaliações funcionais	23
3.5.1. Avaliações ecocardiográficas	23
3.5.2. Registro de pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC)	25
3.5.3. Estudo do controle barorreflexo da frequência cardíaca	26
3.5.4. Obtenção da frequência cardíaca intrínseca (FCI) e estudo da modulação autonômica	27
3.5.5. Registro de pressão ventricular esquerda	28
3.6. Análise morfométrica	28
3.7. Análise estatística	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1. Mortalidade dos animais ao longo do protocolo experimental de IAo	30
4.2. Caracterização ecocardiográfica do modelo de IAo	32
4.2.1. Indicativos de função valvar	33
4.2.2. Indicativos morfológicos	34
4.2.3. Indicativos de função sistólica	39
4.2.4. Indicativos de função diastólica	41
4.3. Obtenção e viabilidade das CMMO	43
4.4. Avaliação da administração de CMMO sobre os aspectos funcionais cardíacos	44

4.4.2. Pesos dos animais no período pós-tratamento	45
4.4.3. Indicativos de função valvar no período pós-tratamento	46
4.4.4. Indicativos morfológicos no período pós-tratamento	51
4.4.5. Indicativos de função sistólica no período pós-tratamento	53
4.4.6. Indicativos de função diastólica no período de pós-tratamento	55
4.4.7. Pressão arterial e frequência cardíaca	55
4.4.8. Sensibilidade do barorreflexo	60
4.4.9. Análise da frequência cardíaca intrínseca de marcapasso	61
4.4.10. Efeito vagal e simpático	62
4.4.11. Tônus vagal e simpático	63
4.4.12. Pressão ventricular esquerda	63
4.5. Investigação tecidual cardíaca da presença de CMMO	65
4.6. Quantificação de fibrose	66
5. CONCLUSÕES	69
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares representam a principal causa de morte no mundo (WHO, 2011), sendo a insuficiência cardíaca (IC) o estágio final comum a doenças cardíacas de diferentes etiologias. A IC representa uma condição com prevalência crescente na população e estima-se que, em 2025, haverá 5 milhões de casos no Brasil (Roscani et al., 2010). Apesar da ampla utilização do termo, não há um consenso simples para definir IC, visto tratar-se de uma condição associada à ampla diversidade de sinais, sintomas e etiologia (Coronel et al., 2001). De uma forma geral, a IC pode ser entendida como uma síndrome clínica complexa de sintomas e sinais que sugerem deficiência do coração como bomba de suporte fisiológico à circulação. A IC é causada por anomalias estruturais e/ou funcionais do coração que prejudicam a capacidade do ventrículo em encher-se de sangue e/ou ejetá-lo. Etiologicamente a IC é classificada como qualquer anormalidade mecânica (sobrecarga de pressão/volume, doença pericárdica, doença restritiva), falência miocárdica ou arritmias (bradiarritmias, taquiarritmias) (Purcell & Poole-Wilson, 1999).

Devido à alta taxa de mortalidade e morbidade relacionadas à IC, terapias alternativas utilizando célula-tronco e células progenitoras têm sido investigadas em animais experimentais e em humanos (Orlic et al., 2001; Perin et al., 2003). Por definição, a célula-tronco (CT) é uma célula indiferenciada, sem especialização funcional e marcadores de diferenciação tecido-específico, com capacidade de proliferação, auto-renovação e plasticidade (Herzog e cols., 2003). As CT podem ser obtidas de diferentes tecidos adultos, sendo a medula óssea uma das fontes mais estudadas (Strauer et al., 2002; Perin et al., 2003). Trata-se de um tecido complexo que contém CT hematopoiéticas, capazes de se diferenciar em todos os tipos celulares das linhagens mielóide e linfóide, e CT não hematopoiéticas com característica de células

multipotentes denominadas células mesenquimais estromais de medula óssea (MSC) (Pittenger e cols., 1999; Hung e cols., 2002). As MSC apresentam capacidade de se diferenciar em diferentes tipos celulares (osteoblastos, condrócitos, adipócitos, miócitos) quando em cultura sob condições específicas (Pittenger e cols., 1999; Herzog e cols., 2003).

Partindo-se da premissa que MSC de medula óssea apresentam capacidade proliferativa e plasticidade *in vitro*, a terapia celular foi proposta como uma alternativa terapêutica direcionada à regeneração cardíaca por meio da diferenciação das células injetadas em cardiomiócitos funcionais (Orlic e cols., 2001; Perin e cols., 2003). Entretanto, a esperada diferenciação das CT parece não ocorrer *in vitro* e *in vivo* em taxa suficiente para explicar a melhora funcional (Rose et al., 2008). Assim, os mecanismos pelos quais as CT estariam promovendo melhora da função cardíaca ainda são controversos (Gnecchi e cols., 2005; Quevedo et al., 2009; Koninckx et al., 2009). Atualmente, atribui-se, pelo menos em parte, a melhora funcional cardíaca após transplante de CT de medula óssea a um mecanismo parácrino resultante da liberação de fatores anti-necróticos, anti-apoptóticos, anti-fibróticos e angiogênicos (Gnecchi et al., 2005; Fidelis-de-Oliveira et al., 2012).

O fato da medula óssea ser a fonte de CT mais estudada é atribuído ao fácil acesso cirúrgico aliado à vantagem de permitir transplante autólogo e dispensar tratamento com imunossupressores (Strauer et al., 2002; Herzog et al., 2003). Em seres humanos, a medula óssea é coletada a partir da crista ilíaca. Através de fracionamento da medula óssea total por gradiente de ficoll, a porção de células mononucleares de medula óssea (CMMO), a qual contém as MSC, é facilmente obtida e separada das hemácias e células polimorfonucleares. Assim, a maioria dos estudos clínicos no mundo que investigam o benefício da terapia celular em doenças cardiovasculares utiliza a

porção de CMMO, ainda que esta porção apresente uma heterogeneidade nos tipos celulares incluindo, além das MSC, linfócitos, monócitos, células progenitoras endoteliais e progenitoras hematopoiéticas (Strauer et al., 2010; Arnous et al., 2012). Estudos de meta-análise apontam para uma melhora funcional cardíaca após transplante de CMMO em corações infartos (Lipinsk et al., 2007, Martin-Rendon et al., 2008, Ye et al., 2012). Logo, apesar dos mecanismos responsáveis pela melhora funcional cardíaca após terapia celular não serem completamente compreendidos, parece existir um consenso na literatura no sentido de afirmar que a terapia celular com CMMO após infarto do miocárdio promove melhora da função cardíaca (Arnous et al., 2012).

Considerando a capacidade regenerativa das CT como justificativa imediata para a terapia celular, tem-se que a maioria dos estudos na literatura tem investigado o uso de CT em condição de perda tecidual como aquela observada no infarto do miocárdio (Orlic et al., 2001; Shake et al., 2002; Amado et al., 2005). Entretanto, uma vez que outros mecanismos de ação tais como a secreção de fatores citoprotetores (Gnecchi et al., 2005), antifibróticos (Ohnishi et al., 2007) e hipertróficos (Xu et al., 2009) tem sido aventados, a utilização de CT em modelos de doenças cardíacas que envolvam alterações morfológicas e funcionais sem perda tecidual significativa torna-se pertinente. Neste contexto, ainda existem poucos estudos que investiguem o potencial terapêutico de CT derivadas da medula óssea em IC resultante de sobrecarga volumétrica como aquela observada em condição de insuficiência aórtica grave (IAo).

A IAo é caracterizada pelo refluxo diastólico do sangue da aorta refluindo para o ventrículo esquerdo (VE) devido ao mal fechamento das cúspides aórticas. As causas da IAo são múltiplas incluindo anormalidades congênitas, endocardite, degeneração valvar, dilatação aórtica idiopática, uso de drogas anoréticas e a cardiopatia reumática crônica (Borer et al., 1998; Tarasoutchi et al., 2003). Dentre estas, a cardiopatia

reumática crônica é a principal responsável por degenerações valvares. Estatísticas revelam que 10-35% de todas as internações por problemas cardíacos correspondem a pacientes com febre reumática ou cardiopatia reumática crônica (WHO, 2001; Alhuda, 2013). Existem pelo menos 15,6 milhões de casos de cardiopatia reumática crônica no mundo, sendo a maior prevalência entre crianças de países em desenvolvimento como na África subsariana (Carapetis et al., 2005; Alhuda, 2013). Por outro lado, em países desenvolvidos, as doenças valvares degenerativas vêm se tornando uma causa comum de doenças cardiovasculares somado ao aumento na expectativa de vida da população (Maganti et al., 2010).

Na IAO, a sobrecarga hemodinâmica provoca aumento da tensão de parede na diástole, causando a replicação em série dos sarcômeros, alongamento dos miócitos, aumento do diâmetro da cavidade ventricular e hipertrofia excêntrica (Roscani et al., 2010). Numa fase compensada dessa adaptação o aumento proporcional da espessura da parede é capaz de normalizar a tensão parietal e preservar a função ventricular. No entanto, havendo manutenção da sobrecarga, ocorre aumento progressivo do diâmetro da cavidade sem incremento adicional da espessura da parede miocárdica, fato que culmina na condição de hipertrofia excêntrica descompensada com falência progressiva do ventrículo esquerdo (VE) (Matsubara et al., 2006). Em adição, o desbalanço autonômico caracterizado por redução do tônus parassimpático e exacerbação do tônus simpático consiste em elemento fundamental da fisiopatologia da insuficiência cardíaca sendo acompanhado de alteração do barorreflexo (Ellenbogen et al., 1983; Jankowska et al., 2006).

Até o presente momento, nenhuma terapia farmacológica têm se mostrado claramente eficaz em prevenir ou reduzir a dilatação de VE, em reduzir a perda de função sistólica e/ou diastólica ou mesmo ter impacto sobre a mortalidade e morbidade

em pacientes com sobrecarga de volume decorrente de IAo grave (Bonow et al., 2006). Para nosso conhecimento, não há relatos na literatura sobre o uso de CMMO em quadros de IAo e sobrecarga de volume. Existem apenas alguns estudos que investigam o uso de CT derivadas da medula óssea em modelo de sobrecarga pressórica (Wairiuko et al., 2007; Molina et al., 2008). Portanto, o presente estudo visou investigar se a terapia com CMMO previne o processo de remodelamento cardíaco descompensado e promove melhora no balanço autonômico cardíaco em modelo de sobrecarga volumétrica resultante de IAo grave induzida experimentalmente em ratos. Considerando os relatos da literatura sobre terapia celular e seu efeito benéfico sobre a contratilidade cardíaca (Boomsma et al., 2007), ação antifibrótica (Ohnishi et al., 2007) e antiinflamatória (Ortiz et al., 2007), formulou-se a hipótese que a administração de CMMO pudesse prevenir o remodelamento descompensado por melhorar a contratilidade e relaxamento cardíaco, por restringir a dilatação progressiva do VE, por reduzir o grau de fibrose miocárdica, refletindo assim em melhora do controle autonômico cardíaco.

Vale ressaltar que a opção pelo estudo da porção CMMO foi baseada no fato da maior parte dos estudos clínicos com terapia celular e IM utilizarem esse tipo celular (Strauer et al., 2002; Lunde et al., 2006). Em adição, a obtenção de CMMO a partir da medula óssea de ratos, ao dispensar a etapa de cultivo celular, reduziu o custo financeiro do projeto e se adequou à proposta de 17 meses, tempo destinado ao desenvolvimento por aluno de iniciação científica para obtenção do título de Bacharelado em Ciências Biológicas. Em adição, o presente estudo envolveu diferentes pesquisadores que permeiam as áreas básicas e clínica e, portanto, acredita-se que o presente estudo representou a oportunidade para formação e fortalecimento de parcerias colaborativas em um núcleo de abordagem cardiovascular translacional.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo geral avaliar se a administração intramiocárdica (i.m.) de CMMO em modelo de sobrecarga volumétrica em ratos induzida por IAo previne a disfunção e alteração morfológica de ventrículo esquerdo e se a eventual melhora funcional cardíaca reflete em melhora do controle autonômico cardíaco e sensibilidade do barorreflexo.

2.2 Objetivos específicos

Foram objetivos específicos do presente estudo:

- a) Obter ratos com IAo induzida experimentalmente;
- b) Obter a porção de CMMO a partir da medula óssea total para administração i.m. em ratos com IAo;
- c) Avaliar aspectos morfofuncionais cardíacos obtidos por ecocardiografia;
- d) Avaliar se o eventual benefício funcional cardíaco reflete em melhora da sensibilidade do barorreflexo e tônus autonômico;
- e) Avaliar a função sistólica e diastólica do VE por meio de cateterização transcutânea;
- f) Investigar a presença de CMMO no tecido cardíaco ao final do protocolo experimental;
- g) Avaliar o efeito da terapia celular com CMMO sobre o percentual de fibrose no tecido cardíaco.

3. MATERIAL E METODOS

3.1 Animais

O estudo foi realizado utilizando-se ratos Wistar machos fornecidos pelo Biotério Central do Campus da Unesp de Botucatu. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, em ambiente com temperatura controlada ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$), ciclo claro-escuro (12-12 h) e livre acesso à ração e água. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com aprovação pelo comitê de ética local (CEUA-588) desta universidade (ANEXO I).

3.2 Indução da Insuficiência Aórtica (IAo)

Para este procedimento, foram utilizados ratos pesando entre 220 - 250g com idade aproximada de 50 dias. O modelo de IAo foi realizado através de uma modificação da técnica descrita por Arsenault e colaboradores (Arsenault et al., 2002). Inicialmente, sob anestesia com cloridrato de ketamina (80mg/kg, Dopalen®, Vetbrands) associada a cloridrato de xilazina (20 mg/kg, Anasedan®, Vetbrands) os animais tiveram a artéria carótida comum direita dissecada e cateterizada por meio de um cateter de silicone. Em seguida, um fio guia de aço (próprio do cateter de anestesia epidural - 0,34mm) foi introduzido através do cateter carotídeo de modo a lesionar a valva aórtica com várias perfurações até não haver mais resistência ao movimento de introdução do fio guia (Plante et al., 2004). Animais do grupo controle com cirurgia fictícia (SHAM) foram submetidos aos mesmos procedimentos, porém sem a perfuração valvar, tendo apenas a carótida isolada e ligada cranialmente. A presença e quantificação da gravidade da IAo foi feita por ecocardiograma, ao final de uma semana

após a indução da IAo (período pré – tratamento). Foram incluídos no estudo animais com jato regurgitante na via de saída do ventrículo esquerdo maior ou igual a 50%.

3.3 Obtenção de células mononucleares de medula óssea (CMMO)

As CMMO foram obtidas a partir de medula óssea total de ratos Wistar machos pesando entre 340 - 390g e idade aproximada de 90 dias. Após 30 minutos de heparinização intraperitoneal (0,2 mL de heparina sódica 5000 UI/mL) o animal foi anestesiado (Ketamina: 80 mg/kg e Xilazina: 20 mg/kg) e eutanasiado por guilhotina. Os fêmures e tíbias foram isolados e o material biológico transferido para capela de fluxo laminar onde os demais procedimentos foram realizados. As epífises ósseas foram cortadas para acesso à cavidade medular e o conteúdo medular total foi obtido por centrifugação direta dos ossos a 700xg por 10 minutos (Dobson et al., 1999). Em seguida o conteúdo medular total foi ressuspense em 4 mL de meio de cultura DMEM sem soro o qual foi adicionado cuidadosamente sobre 4 mL de Ficoll (densidade 1,083 g/ml). O conteúdo passou por uma nova centrifugação (400xg por 30 min) e ao final foi observado o anel na interface DMEM-Ficoll contendo as CMMO. Este anel foi coletado cuidadosamente e ressuspense em um novo tubo do tipo falcon de 15 mL e lavado em meio DMEM sem soro por meio de 3 centrifugações seriadas (250xg por 5 min). Da segunda para a terceira lavagem, o pellet foi ressuspense em 2mL para a retirada de 10 μ L de células que foram adicionados a eppendorf contendo 190 μ L de DMEM sem soro. Desse volume de 200 μ L, foi coletado 10 μ L que por sua vez foi adicionado a 10 μ L de solução de azul de Trypan para a contagem e avaliação da viabilidade celular em hematocítômetro. Em seguida, as células remanescentes nos 2 mL foram marcadas com o corante nuclear HOECHST 33342 (10 μ g/ mL) por uma hora em estufa de CO₂ a 37° para posterior investigação tecidual. Após marcação, as células foram lavadas com

DMEM sem soro por meio de 3 centrifugações seriadas (250xg) e ressuspensas em meio DMEM sem soro de forma que 100µL contivessem 5×10^6 CMMO. O sobrenadante resultante da última lavagem (DMEM livre de célula) foi utilizado para a administração *in vivo* no grupo IAoDMEM (controle) e grupo SHAM.

3.4 Delineamento e protocolo experimental

3.4.1 Período de pré-tratamento e administração i.m.

A figura 1 mostra esquematicamente o protocolo experimental do estudo referente ao período pré - tratamento. Após uma semana da indução de IAo, foram feitas análises ecocardiográficas para a confirmação do quadro de IAo e aquisição dos parâmetros morfofuncionais cardíacos pré-tratamento. Animais com jato regurgitante na via de saída do VE inferior a 50% não foram incluídos no estudo. Em seguida, os animais foram divididos em três grupos experimentais de acordo com a presença (grupo IAo) ou não de IAo (SHAM) e de acordo com a administração i.m. a ser recebida:

- **1º GRUPO – SHAM (n=6):** ratos controle de normalidade que receberam 100 µL de meio de cultura DMEM sem soro sem células;
- **2º GRUPO – IAo+DMEM (n=6):** ratos controle com IAo que receberam 100 µL de meio de cultura DMEM sem soro sem células;
- **3º GRUPO – IAo+CMMO (n=8):** ratos com IAo que receberam 100 µL de meio de cultura DMEM sem soro contendo 5×10^6 CMMO (grupo IAo-CMMO).

A administração i.m. foi feita na segunda semana após IAo (3 a 8 dias após IAo) por meio de uma toracotomia seguida de manipulação da região do tórax para a rápida exteriorização do coração, entre a 4º e 5º costela, procedimento normalmente utilizado para indução de IM (Zornoff et al., 2009).

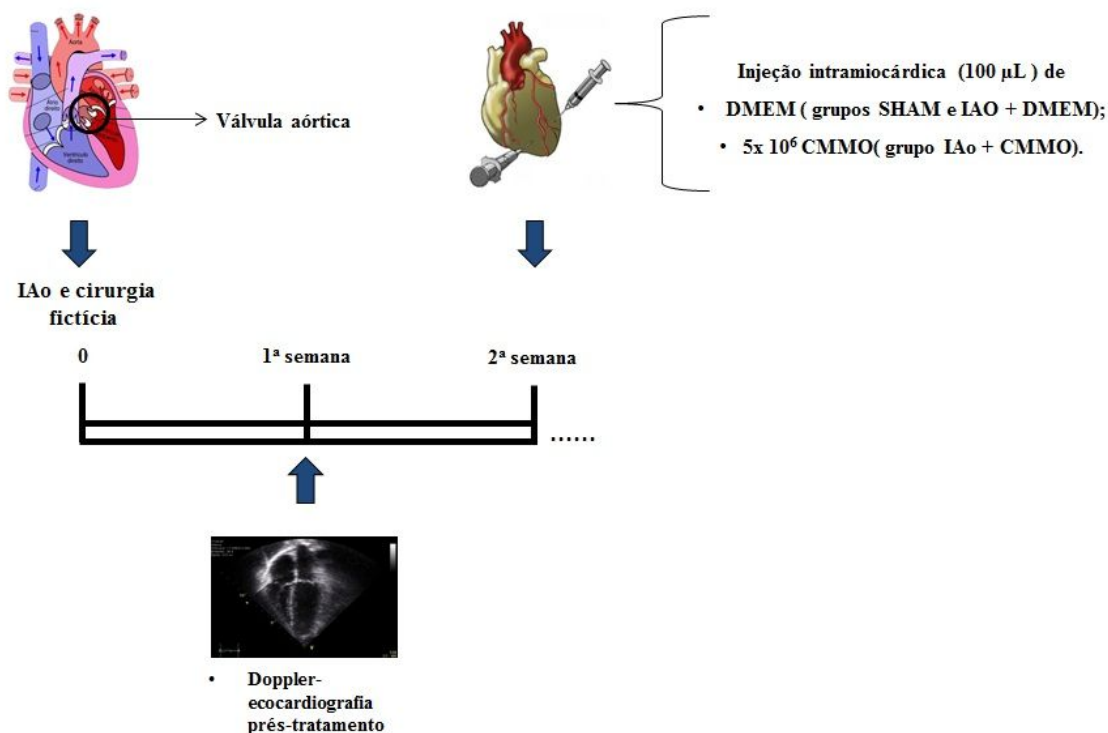


Figura 1 – Esquema do protocolo experimental referente ao período pré-tratamento e administração i.m. A Doppler-ecocardiografia foi realizada após uma semana do procedimento cirúrgico para confirmação da IAo e obtenção de parâmetros pré-tratamento. A administração i.m. foi realizada na 2ª semana após IAo. DMEM: meio de cultura desprovido de células destinado ao grupo controle IAo – DMEM e SHAM; CMMO: células mononucleares de medula óssea destinado ao grupo IAo– CMMO.

3.4.2 Período pós-tratamento

As análises morfofuncionais cardíacas pós-tratamento foram realizadas na 3^o e 7^o semana após administração i.m. por doppler-ecocardiografia, (Figura 2). Ao final da 7^o semana também foram realizados os procedimentos de cateterização de artéria e veia femoral para medidas de pressão arterial (PA), frequência cardíaca (FC), avaliação da sensibilidade do barorreflexo e tônus autonômico, cateterização de ventrículo esquerdo para a obtenção da pressão do ventrículo esquerdo (PVE) e respectivos índices de função sistólica e diastólica. Ao final do protocolo experimental, os animais foram sacrificados para retirada dos corações para análises histológicas de investigação tecidual de células previamente marcadas com HOECHST 33342 e quantificação de fibrose em lâminas coradas com Picrosirius Red.

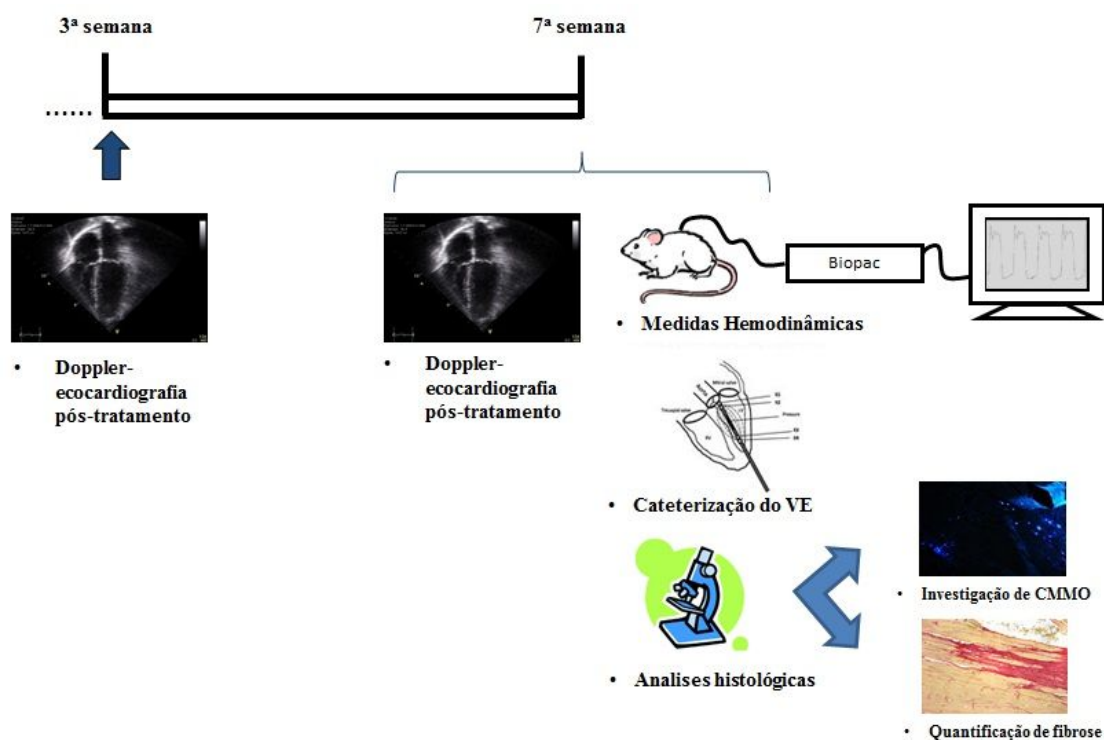


Figura 2 – Esquema do protocolo experimental referente ao período pós-tratamento. As análises ecocardiográficas foram feitas na 3ª e 7ª semana após a administração i.m. para coleta dos parâmetros pós-tratamento. Ao final da 7ª semana foram realizados os procedimentos de medidas hemodinâmicas, cateterização do VE e análises histológicas nos grupos SHAM-DMEM, IAo+DMEM e IAo+CMMO.

3.5 Avaliações Funcionais

3.5.1 Avaliações ecocardiográficas

O estudo *in vivo* dos animais foi efetuado por meio de Doppler-ecardiografia transtorácica convencional (Phillips TDI 5500; 7,5 a 12 MHz), seguindo-se a padronização descrita na literatura (Sanh et al., 1978) e sendo executado por ecocardiografista colaboradora do projeto. Os exames ecocardiográficos foram realizados na 1ª semana, referente ao período pré – tratamento, e na 3ª e 7ª semana após administração i.m. (período pós – tratamento). Ambos os ecos pós-tratamento foram realizados com o objetivo de acompanhar a progressão da regurgitação aórtica nos grupos experimentais e avaliar a influência do tratamento ao longo do tempo. Para tanto,

os ratos foram anestesiados (ketamina: 80mg/kg, xilazina: 20mg/kg) por via intraperitoneal seguida de tricotomia da região anterior do tórax para a obtenção das medidas de:

1) **Indicativos de disfunção valvar:** a) integral tempo-velocidade (VTI) na via de saída do fluxo aórtico; b) de $DC = (VSVE)^2 \cdot 0,785 \times VTI \times FC$, sendo DC o débito cardíaco (volume de fluxo sanguíneo pela válvula aórtica por minuto), VSVE é a via de saída do ventrículo esquerdo e FC (bpm) é a frequência cardíaca. Vale ressaltar que a medida de DC isoladamente não é um indicativo de disfunção valvar. Entretanto, considerando o modelo em questão e o parâmetro VTI, o esperado aumento de pré-carga neste modelo leva a um esperado aumento de DC, daí utilizarmos este parâmetro como indicativo de disfunção valvar.

2) **Indicativos morfológicos:** a) Diâmetro do Ventrículo esquerdo em diástole (VED (mm)); b) Diâmetro do Ventrículo esquerdo em sístole (VES (mm)); c) massa do VE = $\{1,04 \times (VED + PP + PP)^3 - [(VED)^3] + 0,6/1000 \text{ (cm}^3)\}$, onde VED é o diâmetro do ventrículo esquerdo (VE) e PP representa a parede posterior do VE; d) diâmetro do átrio esquerdo (AE (mm)); e) relação AE com o diâmetro da aorta (AE/AO); f) volume do AE obtido pela imagem de quatro câmaras (V AE 4C (cm³)); g) L menor (mm) é a medida do eixo menor do VE obtido em imagem 4 câmaras pelo ECO; e h) índice de esfericidade que é a relação entre o L menor/ L maior, onde o L maior representa o eixo longo do ventrículo esquerdo (Figura 1).

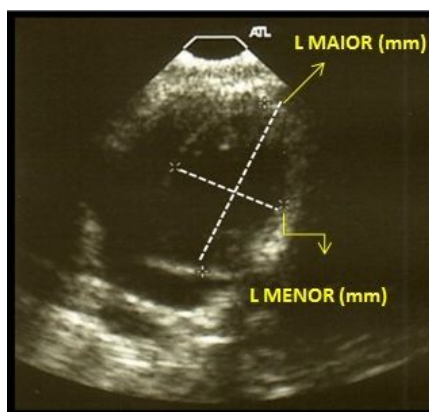


Figura 1– Imagem representativa do coração de um animal SHAM obtida por ecocardiografia em corte de 4 câmaras mostrando a mensuração do eixo menor (L menor, mm) e do eixo maior (L maior, mm) do ventrículo esquerdo. Pela relação L menor/Lmaior é obtido o parâmetro de índice de esfericidade.

3) **Indicativos de função sistólica:** a) Fração de encurtamento (FEA (%)) = $[(VED-VES) /VED) *100]$; b) S'MITRAL: medida da velocidade de deslocamento tissular do ânulo da valva mitral durante a sístole ventricular esquerda.

4) **Indicativos de função diastólica:** a) relação E/A, sendo a onda E (cm/s) a velocidade do sangue no momento do enchimento ventricular passivo e a onda A (cm/s) refere-se à velocidade de pico do sangue no momento da contração atrial; b) E' Mitral: velocidade de deslocamento tissular do ânulo da mitral no momento do enchimento ventricular passivo; c) relação E/E'.

3.5.2 Registro de pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC)

O registro de pressão arterial (PA) foi feito ao final de 7 semanas, um dia após o registro ecocardiográfico, em animais acordados e com livre movimentação. Após 24 horas de recuperação do exame ecocardiográfico, os animais foram anestesiados (ketamina: 80mg/kg, xilazina: 20mg/kg) e submetidos ao procedimento cirúrgico de cateterização de artéria e veia femoral para registro de PA e administração de drogas, respectivamente. Para tanto, utilizamos cânulas de polietileno de confecção artesanal

(PE – 50 soldado a polietileno de PE – 10). As cânulas foram mantidas com heparina (500 UI/mL) para evitar a formação de coágulos.

Após 24 horas de cirurgia de cateterização de artérias e veias femorais e recuperação dos animais, antes de iniciar o registro, foi administrada solução salina 0,9% heparinizada à cânula implantada de artéria e veia femoral para prevenção da formação de coágulo durante o experimento de registro e administração das drogas vasoativas. Para a aquisição de sinal de PA a cânula arterial PE-50 foi conectada ao transdutor de pressão mecanoelétrico (MP100, BIOPAC) cujo sinal foi amplificado, convertido de analógico para digital (BIOPAC, USA) e visualizado em um monitor de computador através do programa Acqknowlegde. Os dados foram adquiridos com a frequência de amostragem de 2000 pontos/segundo e armazenados para posterior análise. Os parâmetros obtidos a partir do registro de PA pulsátil foram: 1) frequência cardíaca (FC); 2) pressão arterial diastólica (PAD); 3) pressão arterial sistólica (PAS) e 4) pressão arterial média ($PAM = 1/3PAS + 2/3PAD$).

3.5.3 Estudo do controle barorreflexo da frequência cardíaca

O estudo do barorreflexo arterial foi feito por meio da mensuração das respostas reflexas de bradicardia (componente vagal) e taquicardia (componente simpático) frente a drogas vasoativas que promoveram aumento e redução da PA, respectivamente. Para tanto, foi feita administração *iv* em *bolus* de doses pressoras de fenilefrina (FENIL: 2,5, 5 e 10 µg/kg de peso) objetivando produzir aumento de PAM e bradicardia reflexa. Em adição, foi feita administração *iv* em *bolus* de nitroprussiato de sódio (NPS: 0,5, 1 e 5 µg/kg de peso) para produzir redução de PAM e aumento reflexo de FC. As drogas vasoativas foram administradas em volume de 0,1 mL/Kg de peso corporal, aleatoriamente, com intervalo de 5 minutos entre as doses ou após retorno da

PA e FC aos valores basais. As alterações máximas de FC foram convertidas em intervalo de pulso (IP) usando a fórmula: $IP \text{ (em milissegundos, ms)} = 60.000/FC$. A sensibilidade do barorreflexo foi estimada pela média aritmética das razões entre as alterações de IP (ms) e alterações da PAM (mmHg) para cada dose de FENIL e NPS utilizadas ($\Delta IP/\Delta PAM$, ms/mmHg), denominado índice de sensibilidade do barorreflexo(Borges, 2015; Campagnole-Santos,1988).

3.5.4 Obtenção da frequência cardíaca intrínseca (FCI) e estudo da modulação autonômica

A FCI e a modulação autonômica sobre este parâmetro foram determinadas pela técnica do duplo bloqueio farmacológico do sistema simpático e parassimpático para o coração descrito por Irigoyen e colaboradores (2000), com pequenas modificações. Foi feita a administração *iv* de metilatropina (3 mg/0,3 mL/kg, antagonista colinérgico) e atenolol (4 mg/0,2 mL/kg, antagonista β -adrenérgico). O duplo bloqueio foi realizado duas vezes no mesmo animal em dias consecutivos com a inversão da droga que se iniciava o bloqueio. Após administração de metilatropina e passados 10 minutos para estabilização do sinal, a FC foi registrada. Em seguida foi injetado atenolol e a FC após estabilização do sinal foi também registrada. O duplo bloqueio forneceu o valor de FCI e foi confirmado pela ausência de respostas reflexas da FC às drogas vasoativas. O efeito vagal foi calculado como a diferença entre a FC máxima após metilatropina e a FC basal. O efeito simpático foi calculado como a diferença entre a FC basal e a FC mínima após o atenolol. A diferença entre a FCI e a FC após atenolol determina o tônus vagal enquanto o tônus simpático foi obtido pela diferença entre a FC após metilatropina e a FCI.

3.5.5 Registro de pressão ventricular esquerda

Após aquisição do sinal de PA e realização do protocolo de estudo do barorreflexo e tônus autonômico, os ratos foram anestesiados com ketamina (80mg/kg) e xilazina (20mg/kg) e a pressão ventricular esquerda (PVE) foi obtida por meio da técnica de cateterização percutânea (Eskesen et al., 2012). Para tanto foi inserida, percutaneamente, uma agulha acoplada a cateter no ápice do coração do animal, em direção ao eixo longo do ventrículo esquerdo, em condição de tórax fechado. A porção distal do cateter foi acoplada a transdutor de pressão e o sinal foi convertido de analógico para digital com a frequência de amostragem de 200 pontos por segundo. Os parâmetros obtidos do registro de PVE foram: pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE), pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE), índices de contratilidade (dpdt+) e relaxamento (dpdt-) cardíaco.

3.6 Análise morfométrica

Após aquisição das mensurações hemodinâmicas e cateterização do ventrículo esquerdo para a análise de PVE, os animais foram eutanasiados por dose letal de ketamina (80 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg). Em seguida, os corações foram retirados e banhados em solução de NaCl 0,9% contendo KCl 30 mM para parada cardíaca em diástole. Os átrios e os grandes vasos foram desprezados e o coração foi fixado (48 horas) por imersão em solução tamponada de formalina 10% em tampão fosfato pH 7,4. Os corações foram cortados transversalmente em 4 fatias do ápice para a base (A, B, C, e D). A fatia C foi utilizada para investigação da presença de CMMO previamente marcadas com Hoechst e por isso foi incluída em meio próprio para criopreservação, congelada e mantida no freezer -80° C até o corte em criostato. Foram obtidos cortes de 5 µm em criostato e as imagens representativas foram adquiridas em microscópio de

fluorescência com luz ultra-violeta Nikon Eclipse 80i acoplado a sistema de aquisição de imagens NIS-Elements AR 3.10.

As demais fatias do coração (A, B e D) foram utilizadas para as análises morfométricas (ANEXO II) e, portanto, colocadas em cassetes (pequenas caixas) para a retirada do formol 10% em água corrente no período de 24 horas. Depois as peças passaram por etapas de desidratação, que consistem em passagens crescentes e em série de solução de etanol (70%, 80%, 90% e 100%). A clarificação do tecido foi feita por meio de um banho de etanol 100%: Xilol (1:1) e dois banhos Xilol (100%). Após a desidratação e clarificação, as peças foram banhadas com resina plástica (Paraplast), para que a mesma impregnasse dentro do tecido e seguida incluídas no mesmo material. O tecido cardíaco foi cortado em fatias de 5 μ m em micrótomo. Para fixação em lâminas de vidro, as fatias foram mergulhadas em solução de água e álcool (100%) e levadas ao banho maria a 40° C para manter o tecido esticado sobre a lâmina. Para os procedimentos de coloração, as lâminas foram previamente mantidas em uma estufa a 60° C, por 24 horas. Antes da coloração, as lâminas passaram por uma nova diafanização, utilizando Xilol 100% para a retirada do Paraplast. Em seguida, os cortes foram hidratados por meio de sequências decrescente de álcool (100%, 90%, 80 e 70%). No próximo passo, as lâminas foram coradas com Picro Sirius Red, por sua vez, para quantificação da fração de colágeno intersticial. Após a coloração, as lâminas foram desidratadas em ordem crescente de álcool (70%, 80%, 90% e 100%) e Xilol (100%), e montadas com lâminula e cola especial para este procedimento.

As imagens das lâminas coradas foram obtidas por microscopia óptica, em aumento de 400X, através do microscópio Leica, e auxílio do programa Leica Qwin Plus 2006. Foram obtidas 21 imagens aleatórias a partir do VE e septo, para a

localização e quantificação percentual de áreas com fibrose. As imagens e os dados foram gravados e analisados posteriormente.

3.7 Análise estatística

Os dados foram apresentados como média±erro padrão da média. Na condição de análise de um determinado parâmetro em dois grupos experimentais, foi utilizado Teste T de Student não pareado. Quando da avaliação de um determinado parâmetro em mais de dois grupos experimentais foi utilizada análise de variância de uma via (ANOVA ONE WAY) e diferença entre os grupos experimentais foi verificada pelo pós-teste de Bonferroni. Na avaliação ecocardiográfica ao longo do tempo nos diferentes grupos, foi utilizada análise de variância de duas vias (ANOVA TWO WAY) para medidas repetidas seguida de pós-teste de Dunnet ou Bonferroni. Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Mortalidade dos animais ao longo do protocolo experimental de IAo

Este estudo foi desenvolvido realizando-se dois lotes de experimento em momentos diferentes. Cada lote de experimento era constituído por animais que compunham os três grupos experimentais (SHAM, IAo+DMEM e IAo+CMMO). Esta repetição dos experimentos em lote se fez necessária para que pudessemos alcançar o número de animais por grupo experimental. Abaixo seguem os valores das taxas de mortalidade, em porcentagem, durante todo desenvolvimento dos protocolos experimentais que corresponde desde a indução de IAo até o final da 7^a semana. O maior índice de mortalidade ocorreu durante a cirurgia de IAo. O lote-1 apresentou 34% e o lote-2 23,80%, com média de 28,9%. Após a 1^a semana de indução de IAo, apenas o

lote-2 apresentou 7,14% de mortalidade com média de 3,57%, o que aconteceu também no dia da administração i.m(lote-2: 7,69% e média de 3,85%). Na 3ª semana após a indução de IAo, não teve índice de mortalidade em ambos os lotes. Após a 7ª de indução de IAo e durante os eventos de canulação, o lote-1 apresentou 21% e o lote-2 25% de mortalidade com média de 23%, (Tabela – 1).

	Cirurgia de IAo	1ª Semana após IAo	Administração i.m.	3ª Semana após administração i.m	Canulação –7ª Semana após administração i.m
Lote - 1	34%	0	0	S.M.	21%
Lote - 2	23,80%	7,14%	7,69%	S.M.	25%
Média e EPM	28,9 ±0,05%	3,57±0,04%	3,85±0,04%	S.M.	23±0,02%

Tabela 1 - Percentuais das taxas de mortalidade desde a cirurgia de indução de IAo até o final dos protocolos experimentais na 7ª semana após tratamento. S.M.: Sem mortalidade.

Em seguida seguem os valores em porcentagem dos animais, que apresentaram ou não IAo, após a confirmação do eco de 1ª semana. O lote -1 teve 72,73% e o lote-2 63,64%, com média de 68,19%, de animais que tiveram IAo. Dos animais que não tiveram IAo o lote-1 teve 27,27% e o lote-2 36,36%, com média de 31,82% (Tabela – 2). Estes dados mostram uma boa reprodutibilidade do modelo no sentido de afirmarmos que a cirurgia para indução de IAo apresenta uma eficácia em promover prejuízo de função valvar, em média, em 68% dos animais.

	Animais que apresentaram IAo após o eco de confirmação de 1ª semana	Animais que não tiveram IAo após o eco de confirmação de 1ª semana
Lote - 1	72,73%	27,27%
Lote - 2	63,64%	36,36%
Média e EPD	68,19±0,05%	31,82±0,05%

Tabela 2 - Percentuais das taxas de animais com presença de IAo e animais sem a presença de IAo, após o eco de primeira semana, feito para a confirmação da eficácia da cirurgia em promover disfunção valvar.

4.2 Caracterização ecocardiográfica do modelo de IAo

O modelo de IAo já é bem padronizado e descrito na literatura (Plante et al., 2003, Matsubara et al., 2006). Em nosso estudo, para melhor entendimento do modelo em nosso laboratório utilizando os ratos fornecidos pelo nosso biotério central, consideramos válido caracterizar o nosso modelo por meio da avaliação ecocardiográfica. Para tanto, após obtenção de animais SHAM e animais com IAo e previamente à administração i.m. no tempo de uma semana após a cirurgia, fizemos uma divisão dos animais em dois grupos experimentais (SHAM e IAo) caracterização funcional ecocardiográfica da confirmação de IAo. Animais SHAM foram utilizados como controle de normalidade e, portanto, ratos com fração de encurtamento inferior a 50% foram retirados do estudo por já apresentar comprometimento basal da função cardíaca.

No tempo de uma semana após IAo não observamos diferença significativa nos pesos dos animais dos dois grupos (SHAM: $247,5 \pm 7,61$; IAo: $256,07 \pm 6,29$), (Figura 2).

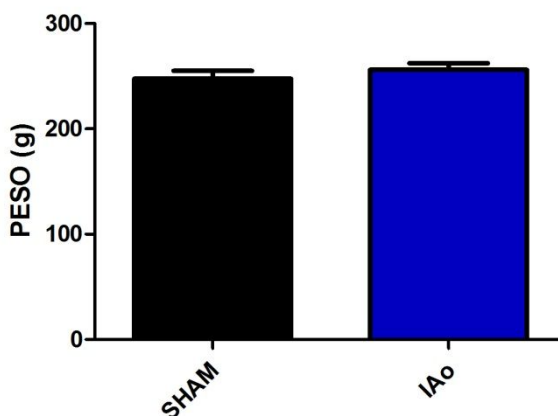


Figura2— Peso corporal dos animais do grupo SHAM (n=6) e grupo IAo (n=14) obtidos na primeira semana após indução de IAo.

Abaixo seguem os parâmetros ecocardiográficos obtidos uma semana após o estabelecimento da IAo que nos permitiram caracterizar o modelo.

4.2.1 Indicativos de função valvar

Em relação aos indicativos de função valvar o parâmetro de VTI (cm^2), apresentou diferença significativa ($p < 0,001$), visto que a IAo provocou aumento da integral do fluxo na aorta quando comparado com o grupo SHAM (IAo: $8,42 \pm 0,54 \text{cm}^2$ vs SHAM: $5,12 \pm 0,30 \text{cm}^2$) (Figura 2A). Este fato é explicado pelo aumento de pré-carga no VE, devido ao volume de sangue, que volta da artéria aorta, já que esta não possui mais os folhetos valvares, e se junta com o volume de sangue do átrio esquerdo (AE), após a sístole atrial. Durante a ejeção o aumento da quantidade de volume de sangue, então, é lançado para a artéria aorta, o que explica os altos valores de VTI nos animais com IAo neste estudo. Este resultado também serve para explicar, que no estudo os animais partiram de um mesmo dano semelhante da válvula aórtica. O débito cardíaco (DC mL/min) também mostrou ser significativamente maior ($p < 0,001$) em animais com IAo ($126,80 \pm 9,35 \text{ mL/min}$) quando comparados aos animais SHAM ($59,56 \pm 7,97 \text{ mL/min}$) (Figura 2B). Assim como mostram os resultados, o DC (mL/min), definido como volume de sangue bombeado por minuto e obtido pelo produto da FC pelo volume sistólico [$\text{DC} = \text{FC (bpm)} \times \text{VS (ml/batimento)}$], aumenta na IAo. Isto ocorre por causa do aumento do volume diastólico final no VE (pré-carga), proporcionando uma força maior de contração através do mecanismo de Frank-Starling, ocasionando num volume sistólico maior do que o normal para dentro da aorta, daí o

aumento do DC nos animais do grupo IAo comparado ao SHAM no nosso estudo.

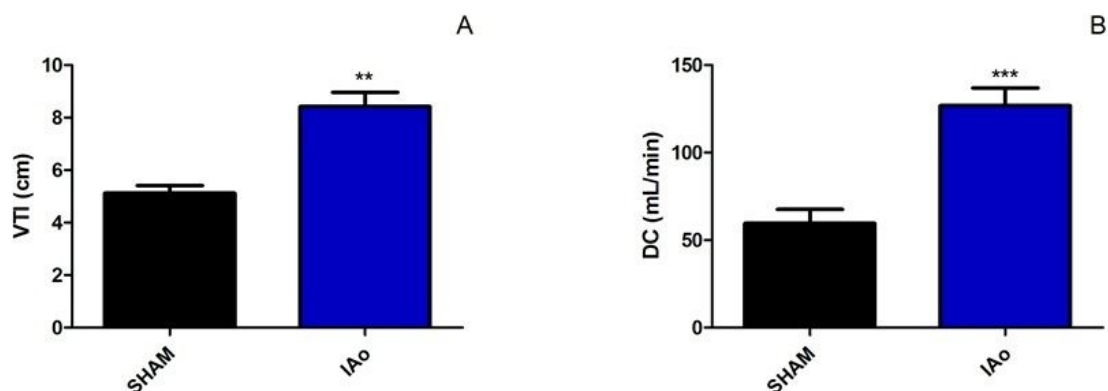


Figura 3– Parâmetros ecocardiográficos de indicativos de função valvar, obtidos na 1^a semana após a indução de IAo no período de pré-tratamento. Grupos SHAM (n=6) e IAo (n=14). **A**: VTI representa a integral tempo-velocidade do fluxo de sangue na aorta (VTI (cm)); **B**: débito cardíaco (DC (mL/min)). ** P<0,01 versus SHAM e ***P<0,001 versus SHAM após utilização de Test T de student não pareado.

4.2.2 Indicativos morfológicos

Em relação ao parâmetro VED (mm), o grupo IAo e SHAM apresentaram valores semelhantes, sem diferença significativa (IAo: $8,08 \pm 0,25$ mm vs SHAM: $7,41 \pm 0,25$ mm), (Figura 3A), dado que mostra que após uma semana de destruição dos folhetos valvares não há significativa dilatação do VE. O VES (mm), por sua vez, foi significativamente ($p < 0,05$) maior nos animais com IAo (IAo: $4,59 \pm 0,59$ mm), em relação ao SHAM (SHAM: $3,62 \pm 0,11$ mm) (Figura 3B). Nos estudos de Roscani e colaboradores (Roscani et. al, 2014), o diâmetro do VED (mm) apresentou valores significativos a partir da 8^a semana, parâmetro que continuou a aumentar até a 16^o semana. Já o diâmetro do VES (mm), foi significativo a partir da 4^o semana, continuando a aumentar na 8^a e 16^a semana. Em nosso estudo, o aumento do VES sem alteração do VED sugerem disfunção de encurtamento precoce. De fato, conforme será mostrado adiante, os animais do grupo IAo apresentaram redução da fração de encurtamento.

A massa do VE (cm^3), um parâmetro indicativo de hipertrofia cardíaca, foi semelhante entre os dois grupos (IAo: $0,73 \pm 0,05 \text{cm}^3$ vs SHAM: $0,58 \pm 0,05 \text{cm}^3$), (Figura

3C). Em doenças cardíacas onde ocorre sobrecarga de volume como aquela decorrente de IAo, há um aumento de sarcômeros em série, associado ao deslizamento de feixes de miócitos, resultando em hipertrofia excêntrica. A sobrecarga volumétrica, independente de estimulação neuro-hormonal, desencadeia maior síntese de sarcômeros. Como consequência, há aumento da massa ventricular como resposta compensatória no sentido de promover maior capacidade em gerar força. (Matsubara et al., 2006). Entretanto, estudos clínicos em humanos mostram que a hipertrofia cardíaca, mensurada por ecocardiograma, está associada ao pior prognóstico e maior risco de morte (Levy et al., 1990; Lorell&Carabello, 2000). Porém durante os dados de ecocardiografia de pré-tratamento neste estudo os animais do grupo IAo e SHAM tiveram valores semelhantes em relação ao parâmetro de massa do VE. Nos estudos de Plante e colaboradores a massa do VE foi significativamente maior, após duas semanas de cirurgia, confirmando que a hipertrofia já tinha se desenvolvido (Plante et. al., 2003). Portanto, considerando que o tempo de sobrecarga de volume não foi suficiente para promover aumento de VED é razoável admitirmos que não houve estímulo suficiente para que pudéssemos detectar aumento de hipertrofia no grupo IAo em relação ao grupo SHAM.

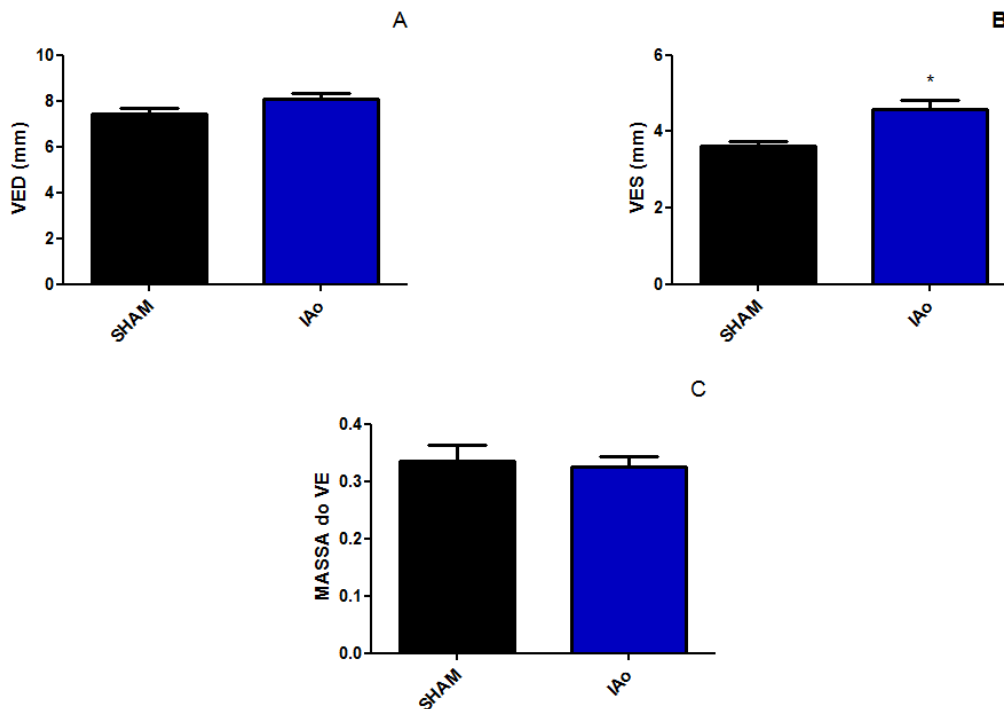


Figura 4– Parâmetros ecocardiográficos de indicativos de morfologia, obtidos na 1ª semana após a indução de IAo.. Grupos SHAM (n=6) e IAo (n=14). **A:** diâmetro do ventrículo esquerdo em diástole (VED(mm)); **B:** diâmetro do ventrículo esquerdo em sístole (VES (mm)); **C:** massa do VE (cm³). * P<0,05 versus SHAM após Test T de student não pareado.

Os valores da relação AE/AO, foram maiores no grupo IAo em comparação ao SHAM (grupo IAo: 1,69±0,09 vs grupo SHAM: 1,28±0,09; p<0,05). Estes valores podem ser confirmados ao observar o AE (mm), que foi maior (p<0,05) nos animais com IAo (5,72±0,09mm) em relação ao SHAM (4,49±0,29mm), (Figura 4B). De forma coerente, o tamanho do AE avaliado por extrapolação tridimensional (V AE 4C,cm³) foi maior (p<0,05) no grupo IAo (IAo: 0,15±0,01 cm³), do que nos animais do grupo SHAM (SHAM: 0,07±0,01cm³), (figura 4C). Esses valores, mostram o aumento do AE em ratos com IAo. A explicação se dá pelo aumento da pré-carga, fato que promove elevação da pressão diastólica final do VE e consequentemente, aumento retrógrado da pressão atrial esquerda. Mudança na pressão atrial esquerda e a longa duração da regurgitação acabam resultando na dilatação do AE (Klabunde, 2011), confirmando de fato que há sobrecarga de volume após uma semana de indução de IAo neste estudo.

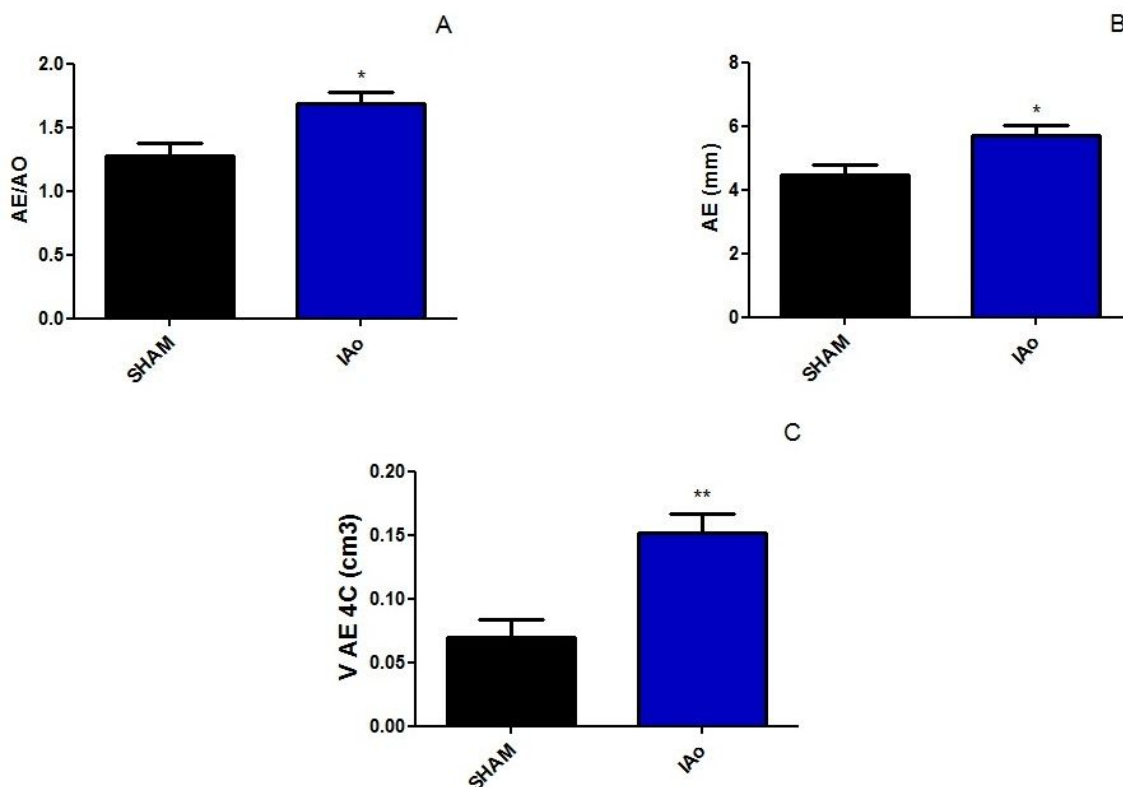


Figura 5– Parâmetros ecocardiográficos de indicativos de morfologia, obtidos na 1ª semana após a indução de IAo. Nos grupos SHAM (n=6) e IAo (n=14). **A:** relação átrio esquerdo e aorta (AE/AO); **B:** diâmetro do átrio esquerdo (AE(mm)); **C:** volume do átrio esquerdo obtido no corte de quatro câmaras (V AE 4C (cm³)); * P<0,05 versus SHAM e ** P<0,001 versus SHAM. Test T de student não pareado.

O parâmetro de L menor (cm) no grupo IAo foi maior quando comparado ao grupo SHAM (grupo IAo: $0,92 \pm 0,02$ cm VS grupo SHAM: $0,69 \pm 0,03$ cm; $p < 0,05$), (Figura 5A). Conseqüentemente, o índice de esfericidade nos animais com IAo (IAo: $0,82 \pm 0,03$), foi maior ($p < 0,001$) em relação ao SHAM (SHAM: $0,62 \pm 0,04$) (Figura 5B). No estudo de Roscani e colaboradores (Roscani et. al, 2014), as mudanças na geometria do VE, dadas pelo índice de esfericidade, só foram identificadas na 4ª semana após IAo por ecocardiografia. Portanto, observamos uma alteração precoce de morfologia ventricular em nosso estudo. Os mecanismos subjacentes a este processo ainda não estão claros, mas alguns argumentos podem ser tirados. A explicação se deve pelo fato que a sobrecarga de volume promove um aumento da pré-carga, e desencadeia mudanças bioquímicas celulares que interferem com o metabolismo e estrutura do tecido conjuntivo de suporte ao miocárdio (Ricci, 1982; Ross, 1974; Roscani et. al,

2014).O tecido conjuntivo de suporte é composto por vários elementos e proteínas, sendo a mais importante o colágeno. Esta proteína apresenta estruturas e características físicas que conferem elevada rigidez, permitindo a manutenção da geometria da câmara ventricular, apesar das variações de largura,peso e volume durante o ciclo cardíaco (Hein et. al., 2003;Roscani et. al, 2014). Devido à sobrecarga, há uma ativação imediata da enzima colagenase, que é capaz de degradar a matriz de colágeno intersticial em pontos específicos de maior tensão (Hein et. al., 2003, Plant et. al., 2003; Roscani et. al, 2014). Esta resposta permite o rearranjo de feixes musculares na espessura da parede do miocárdio e atua como uma adaptação do ventrículo. Em primeiro lugar, o volume em excesso pode ser contido no interior da câmara sem um aumento excessivo da pressão diastólica até que a hipertrofia excêntrica se desenvolva. Este mesmo mecanismo adaptativo fornece uma distribuição uniforme da tensão da parede em todas as direções, e conseqüentemente, há uma mudança de geometria ventricular para uma forma mais esférica(Arsenault et. al., 2013; Ross et. al., 1971, Zaid et. al., 2013;Roscani et. al, 2014). No nosso estudo os animais com IAo, já na primeira semana após a cirurgia apresentaram aumento do índice de esfericidade em relação ao grupo SHAM.O que nos mostra que a IAo foi acentuada.

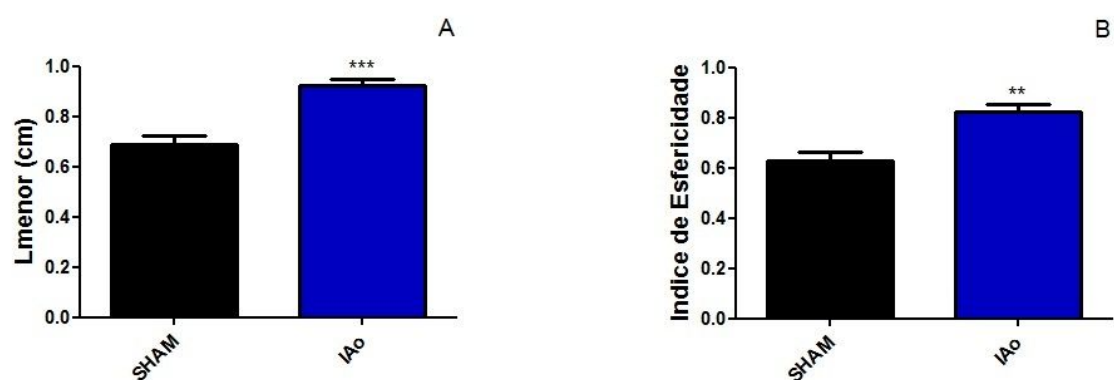


Figura 6– Parâmetros ecocardiográficos de indicativos de morfologia obtidos na 1ª semana após a indução de IAo no período de pré-tratamento. Grupos SHAM (n=6) e IAo (n=14). **A**: maior diâmetro do corte transversal do VE (Lmenor (mm)); **B**: índice de esfericidade. ** P<0,0001 versus SHAM e ** P<0,001 versus SHAM. Test T de student não pareado.

4.2.3 Indicativos de função sistólica

Em relação ao parâmetro S'MITRAL (cm/s), não observamos diferença entre os grupos IAo e SHAM (IAo: $4,68 \pm 0,15$ cm/s vs SHAM: $4,25 \pm 0,31$ cm/s), (Figura 6A), assim como os valores de FC (IAo: $262,50 \pm 0,54$ bpm vs SHAM: $267,33 \pm 7,99$ bpm), (Figura 6B). Por sua vez, o parâmetro de FEA(%) foi menor no grupo IAo quando relacionado com o SHAM (IAo: $43,35 \pm 2,02$ % vs SHAM: $51,06 \pm 1,15$ %; $p < 0,05$), mostrando que a IAo provoca prejuízos na função sistólica, (Figura 6C). No nosso estudo, o grupo IAo apresentou uma redução de 15% na FEA em comparação ao SHAM, já na primeira semana após a indução de IAo. Nos estudos de Roscani et al., só houve prejuízo de função sistólica na 8ª semana, sendo que os animais com IAo apresentaram uma redução de 39% da fração de encurtamento e que continuou diminuindo até o final de 16 semanas com o decaimento de 50% (Roscani et. al, 2014). Por outro lado, nossos estudos foram semelhantes ao de Plante e colaboradores os quais observaram uma diminuição da fração de encurtamento entre 2ª e 8ª semanas após a indução de IAo com deteriorização até o final do protocolo no tempo de 26 semanas (Plant et. al., 2003).

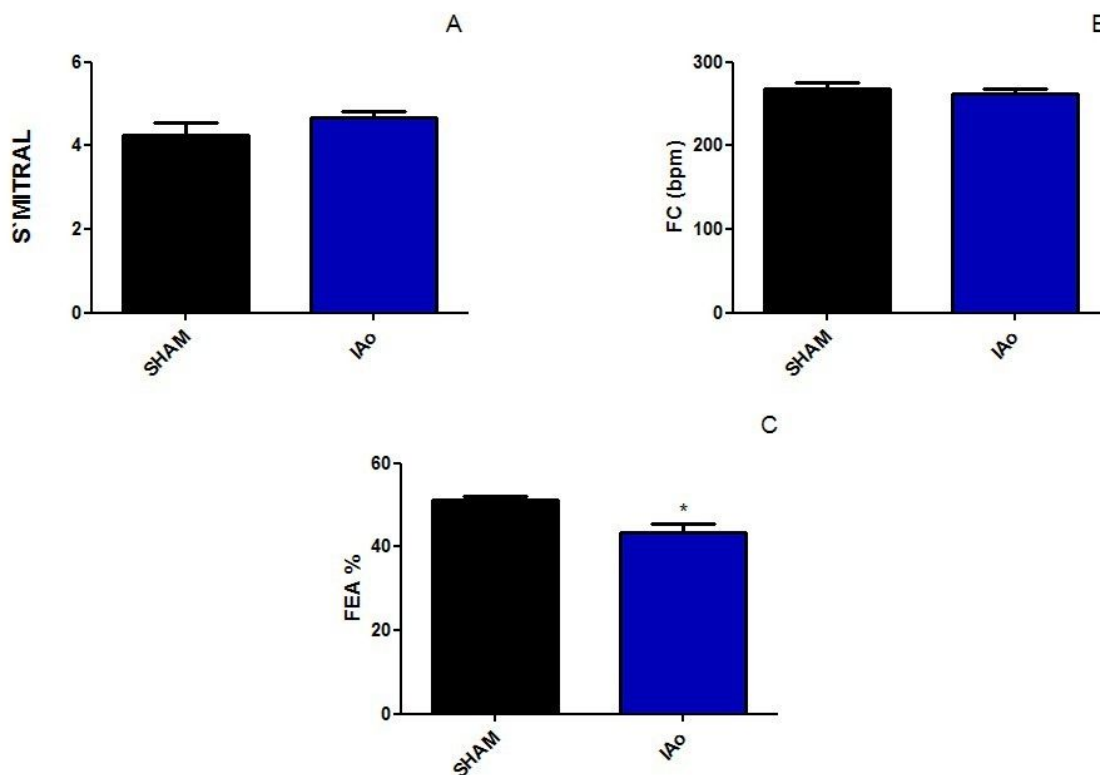


Figura 7– Parâmetros ecocardiográficos de indicativos de função sistólica, obtidos na 1ª semana após a indução de IAo no período de pré-tratamento. Grupos SHAM (n=6) e IAo (n=14). **A:** Medida da velocidade de deslocamento tissular do ânulo da valva mitral durante a sístole ventricular esquerda (S'MITRAL); **B:** Frequência cardíaca (FC, bpm) **C:**Fração de encurtamento (%). * P<0,05 versus SHAM. Test T de student não pareado.

4.2.4 Indicativos de função diastólica

Em relação aos indicativos de função diastólica a razão E/A não foi diferente entre os animais com IAo e SHAM (IAo: $2,46 \pm 0,27$ vs SHAM: $1,79 \pm 0,15$) (Figura 7A). O parâmetro de E'MITRAL (cm/s) foi significativamente maior no grupo IAo (IAo: $6,28 \pm 0,29$ cm/s) em comparação ao SHAM (SHAM: $4,65 \pm 0,48$ cm/s; $p < 0,001$), (Figura 7B). A relação Emitral/E'mitral não foi diferente em comparação do grupo IAo com o SHAM (IAo: $14,48 \pm 0,76$ vs SHAM: $17,01 \pm 1,23$), (Figura 7C).

A dinâmica do enchimento passivo do VE e a relação entre o volume e a pressão diastólica são influenciados pelo curso de tempo do relaxamento ativo e passiva, deformação de propriedades do miocárdio, incluindo a espessura da parede e sua composição, e da deposição de colágeno e sua arquitetura. O miócito hipertrofiado

em isolamento tem apenas um papel limitado no aumento da rigidez da câmara (Kaito, 1996; Lorell&Carabello, 2000). Técnicas com ecocardiografia Doppler são amplamente utilizados para avaliar curvas de velocidade de fluxo transmitiram da válvula, que caracterizam o esvaziamento do AE e enchimento diastólico ventricular (Little &Downey, 1990; Cohen, et. al., 1996; Lorell&Carabello, 2000). A taxa e a magnitude do enchimento diastólico ventricular logo após a abertura da válvula mitral é diretamente relacionado com o gradiente de pressão da válvula, que é determinado tanto pela pressão do AE e da queda ativa de pressão do VE para seu ponto mais baixo durante o período de relaxamento (Lorell&Carabello, 2000). Alguns padrões de enchimento do VE, pela avaliação do Doppler nas curvas de velocidade do fluxo são usados para a identificação de disfunção diastólica como: 1) Redução do relaxamento, caracterizado pela redução na velocidade do fluxo diastólico, com o aumento compensatório da contração do AE (diminuição da relação E/A); 2) Pseudonormalização, caracterizada pela preservação do enchimento diastólico inicial e contração atrial (relação E/A normal), mas com uma desaceleração rápida do fluxo mitral; 3) Padrão restritivo, na qual ocorre quase todo enchimento no início da diástole, associado com o curto tempo de desaceleração, o que é sugestivo da alta pressão do AE, que se dirige ao enchimento do VE enrijecido (Lorell&Carabello, 2000).

No estudo de Plante e colaboradores (Plante, et. al., 2003), após duas semanas de indução de IAo, alguns animais com regurgitação já apresentavam alterações significativas na relação E/A, fato que não foi identificado no nosso estudo após uma semana de indução de IAo. Apenas o parâmetro de E' MITRAL (cm/s) apresentou diferença do grupo IAo com o SHAM. O que sugere talvez um início de prejuízo causado pela IAo no momento do enchimento ventricular passivo.

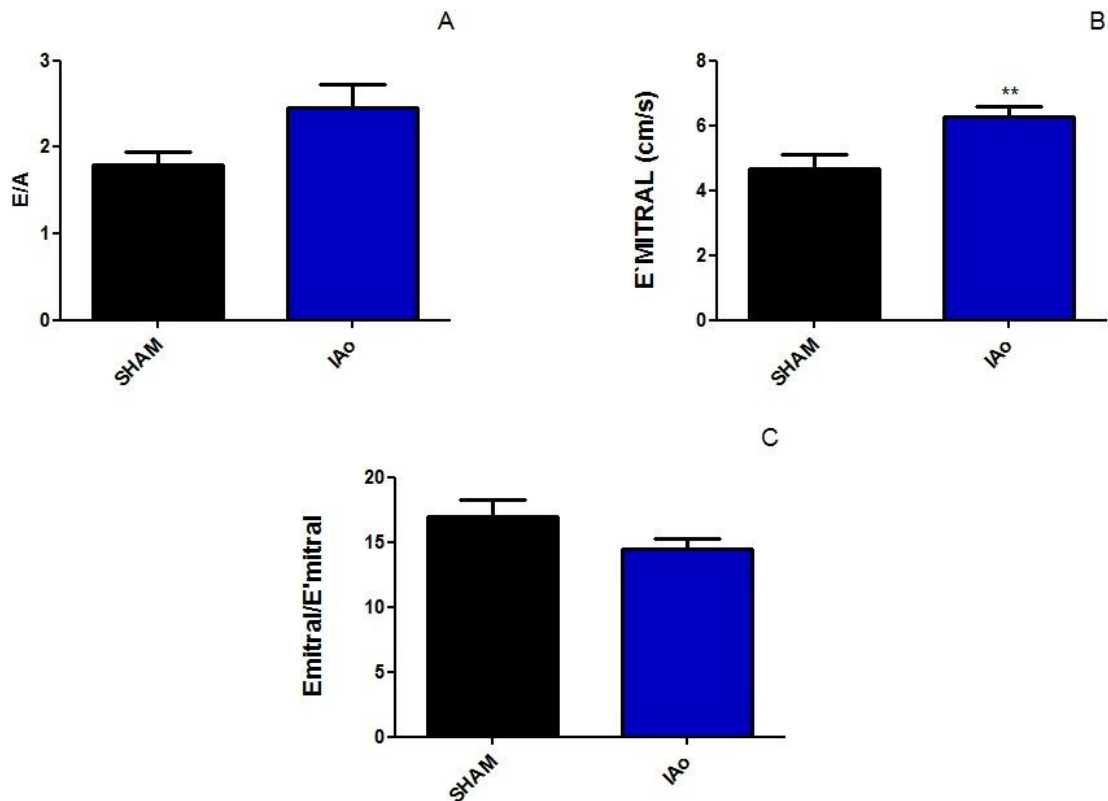


Figura 8– Parâmetros ecocardiográficos de indicativos de função diastólica, obtidos na 1ª semana após a indução de IAo no período de pré-tratamento. Grupos SHAM (n=6) e IAo (n=14). **A:** Relação onda E e onda A (E/A). **B:** Velocidade de deslocamento tissular do ânulo da mitral no momento do enchimento ventricular passivo (E' MITRAL). **C:** Razão entre a velocidade do fluxo passivo do sangue no ventrículo esquerdo com a velocidade de deslocamento tissular do ânulo da mitral no momento do enchimento ventricular passivo (E mitral/E' mitral).** P<0,001 versus SHAM. Test T de student não pareado.

4.3 Obtenção e viabilidade das CMMO

As CMMO foram obtidas a partir de um animal doador por meio de gradiente de ficoll e da coleta do anel contendo as CMMO, (Figura 9). A viabilidade total média foi de 81,17%, obtido após a avaliação com azul de Trypan em hematocítômetro.

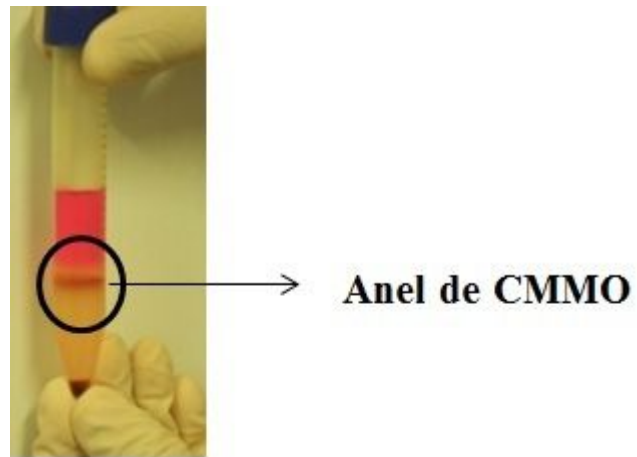


Figura 9 – Anel de CMMO obtido a partir da medula óssea total após gradiente de ficoll.

As CMMO foram marcadas com o intercalante nuclear Hoechst 33342 para posterior investigação destas células no miocárdio e a Figura10 mostra que a marcação se mostrou efetiva após os 50 minutos de incubação.

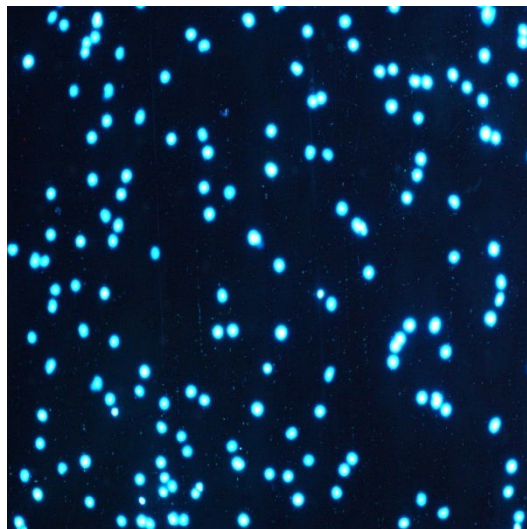


Figura 10 – Foto de microscopia com luz ultravioleta de células mononucleares de medula óssea (CMMO) marcadas com HOECHST 33342. Aumento de 100X.

4.4 Avaliação da administração de CMMO sobre os aspectos funcionais cardíacos

4.4.1 Pesos dos animais no período pós-tratamento

O ganho de peso foi semelhante nos três grupos, e não houve diferença significativa de peso corporal entre os grupos ao longo do protocolo experimental, (Figura 11). Sendo que os pesos entre os grupos experimentais foram semelhantes na 3ª semana após o tratamento (SHAM: $328,33 \pm 11,60$ g; IAo+DMEM: $330 \pm 14,78$ g; IAo+CMMO: $327,73 \pm 5,98$ g), assim como na 7ª semana (SHAM: $328,33 \pm 11,60$ g; IAo+DMEM: $330 \pm 14,78$ g; IAo+CMMO: $327,73 \pm 5,98$ g), (Figura 11).

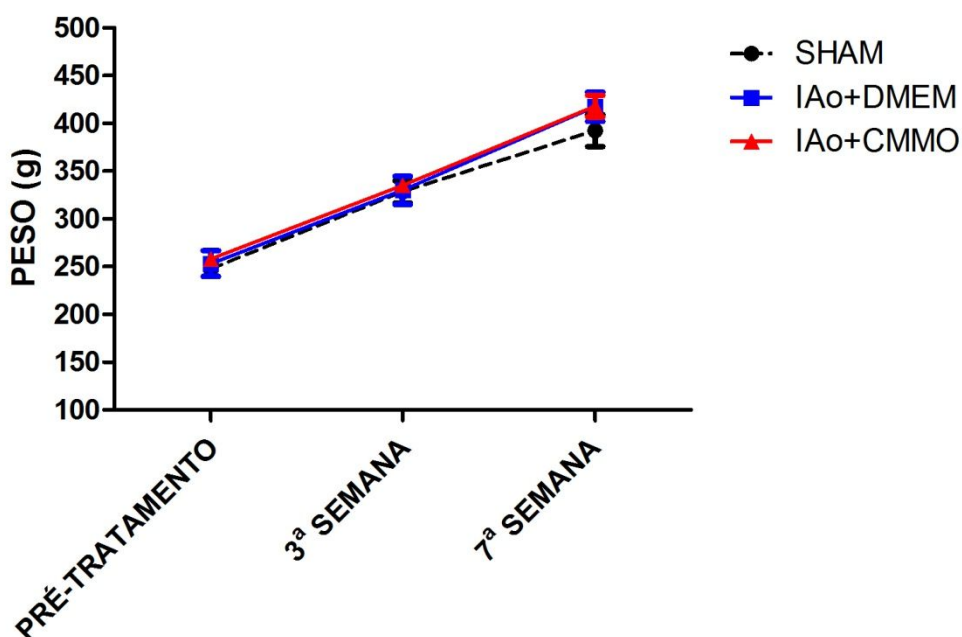


Figura 11– Ganho de peso (g) dos animais na 3ª e 7ª semana após tratamento por meio de administração intramiocárdica nos grupos SHAM (n=6), IAo+DMEM (n= 6) e IAo+CMMO (n=8). ANOVA TWO WAY seguido de pós-teste de Bonferroni.

4.4.2 Indicativos de função valvar no período pós-tratamento

Conforme ressaltado anteriormente, a cirurgia para indução de lesão valvar foi efetiva em promover, uma semana após IAo (pré-tratamento), aumento de pré-carga. Conseqüentemente, o fluxo direcionado para a aorta também se mostrou aumentado nos animais IAo+DMEM e IAo+CMMO quando comparados ao grupo SHAM conforme valores observados para o VTI, (Figura 12A). Quando comparados os grupos IAo+DMEM e IAo+CMMO, não observamos diferença significativa do VTI no período pré-tratamento, dado que sugere que os animais partiram de nível de disfunção valvar semelhante. Ao longo da 3ª e 7ª semana após tratamento, os animais do grupo IAo+CMMO permaneceram com um VTI aumentado em relação ao grupo SHAM, não diferindo do grupo IAo+DMEM. Estes dados sugerem que a terapia celular não modificou a magnitude de disfunção valvar. De fato, a proposta de terapia celular não foi pensada como alternativa para reconstituição valvar, mas sim como terapia que visasse a melhora da função cardíaca. Por isso, este resultado de não alteração do VTI com a terapia celular era esperado. Observação semelhante foi feita para os valores do DC, (Figura 12B). Conforme esperado, o aumento de pré-carga promove aumento de DC nos animais dos grupos IAo+DMEM e IAo+CMMO no período pré-tratamento e não houve diferença significativa entre esses dois grupos. Novamente, observamos que a terapia celular, pelo fato de não promover reconstituição valvar, não impede a regurgitação de volume para o VE durante a diástole e, portanto, o DC permanece alto nos animais com IAo, independente da administração i.m. recebida, (Figura 12B).

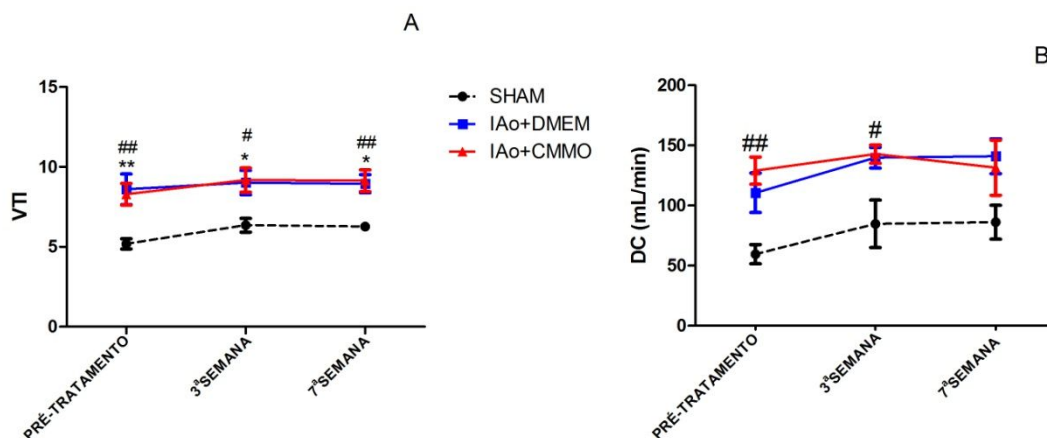


Figura 12– Parâmetros ecocardiográficos indicativos de função valvar, obtidos no período pré-tratamento e na 3^a e 7^a semana após administração intramiocárdica nos grupos SHAM (n=6), IAo+DMEM (n=6) e IAo+CMMO (n=8). **A:**VTI representa a integral tempo-velocidade do fluxo de sangue na aorta (VTI, cm); **B:**Débitocardiaco (DC, mL/min). *P<0,05 IAo+DMEM versus SHAM. #P<0,05 IAo+CMMO versus SHAM. ANOVA TWO WAY seguido de pós-teste de Bonferroni para múltiplas comparações.

4.4.3 Indicativos morfológicos no período pós-tratamento

O parâmetro de VED (mm) (Figura 13A), na 3^a semana foi significativamente maior ($p < 0,01$) entre o grupo IAo+DMEM ($9,14 \pm 0,47$ mm) em relação ao SHAM ($6,99 \pm 0,44$ mm). A administração de CMMO não promoveu diminuição deste parâmetro (IAo+CMMO: $8,66 \pm 0,34$ mm vs SHAM: $6,99 \pm 0,44$ mm $p < 0,05$). Na 7^a semana, o grupo IAo+DMEM continuou a ter dilatação de VE em comparação ao SHAM (IAo+DMEM: $9,07 \pm 0,48$ mm vs SHAM: $7,5 \pm 0,2$ mm $p < 0,05$). Novamente, os animais tratados com CMMO, não apresentaram melhora, mostrando que a IAo continuou a provocar dilatação de VE (IAo+CMMO: $9,20 \pm 0,50$ mm vs SHAM: $7,5 \pm 0,2$ mm, $p < 0,05$).

O VES (mm) na 3^a semana foi significativamente maior ($p < 0,01$) no grupo IAo+DMEM ($5,14 \pm 0,38$ mm) em comparação aos grupos SHAM ($3,04 \pm 0,41$ mm) e IAo CMMO ($4,50 \pm 0,46$ mm). Este resultado mostra que a terapia celular com CMMO foi capaz de impedir o anormal aumento do diâmetro do VE no final da sístole ventricular. Entretanto, na 7^a semana o parâmetro de VES (mm) não foi diferente entre os grupos experimentais (Figura 13B), mostrando que a terapia com CMMO, em longo

prazo, não foi capaz de impedir o anormal aumento do diâmetro de VE ao final da sístole.

A massa do VE (cm^3), parâmetro indicativo de hipertrofia cardíaca, (Figura 13C), mostrou-se aumentada na 3ª semana no grupo IAo+DMEM ($1,05 \pm 0,1 \text{ cm}^3$) em relação ao SHAM ($0,63 \pm 0,09 \text{ cm}^3$). Assim como discutido anteriormente observamos um padrão de hipertrofia excêntrica devido à sobrecarga de volume no VE, no tempo de três semanas após a indução de IAo. Nos estudos de Plante e colaboradores, ainda na 4ª semana a massa do VE continuou a aumentar, permanecendo assim até o final do protocolo de 28 semanas (Plante et. al., 2003). A hipertrofia na condição de sobrecarga de volume representa uma resposta compensatória de remodelamento cardíaco no sentido de reduzir a pressão intraventricular anormalmente aumentada por conta da sobrecarga de volume. Entretanto, a hipertrofia excêntrica com conseqüente aumento de raio e redução da espessura de parede, acaba por culminar em aumento do estresse de parede e efeitos deletérios associados tais como aumento no consumo de oxigênio, apoptose, disfunção sistólica e diastólica, aumento no risco de desenvolvimento de insuficiência cardíaca e morte prematura (Lorell&Carabello, 2000). Observamos que o grupo IAo+CMMO também apresentou aumento deste parâmetro na 3ª semana (IAo+CMMO: $1,15 \pm 0,01 \text{ cm}^3$ vs SHAM: $0,63 \pm 0,09 \text{ cm}^3$; $p < 0,01$). Ao final da 7ª semana, a IAo continuou a promover hipertrofia cardíaca (IAo+DMEM: $1,17 \pm 0,15 \text{ cm}^3$ vs SHAM: $0,6 \pm 0,0 \text{ cm}^3$; $p < 0,01$) e a administração de CMMO, por sua vez, não modificou este perfil (IAo+CMMO: $1,24 \pm 0,17 \text{ cm}^3$ vs SHAM: $0,6 \pm 0,0 \text{ cm}^3$; $p < 0,01$). Apesar de a literatura descrever que as MSC apresentam efeito hipertrófico sobre cardiomiócitos (Xuet al., 2009), em nosso estudo, a hipertrofia induzida pela sobrecarga de volume não foi incrementada pela terapia com CMMO.

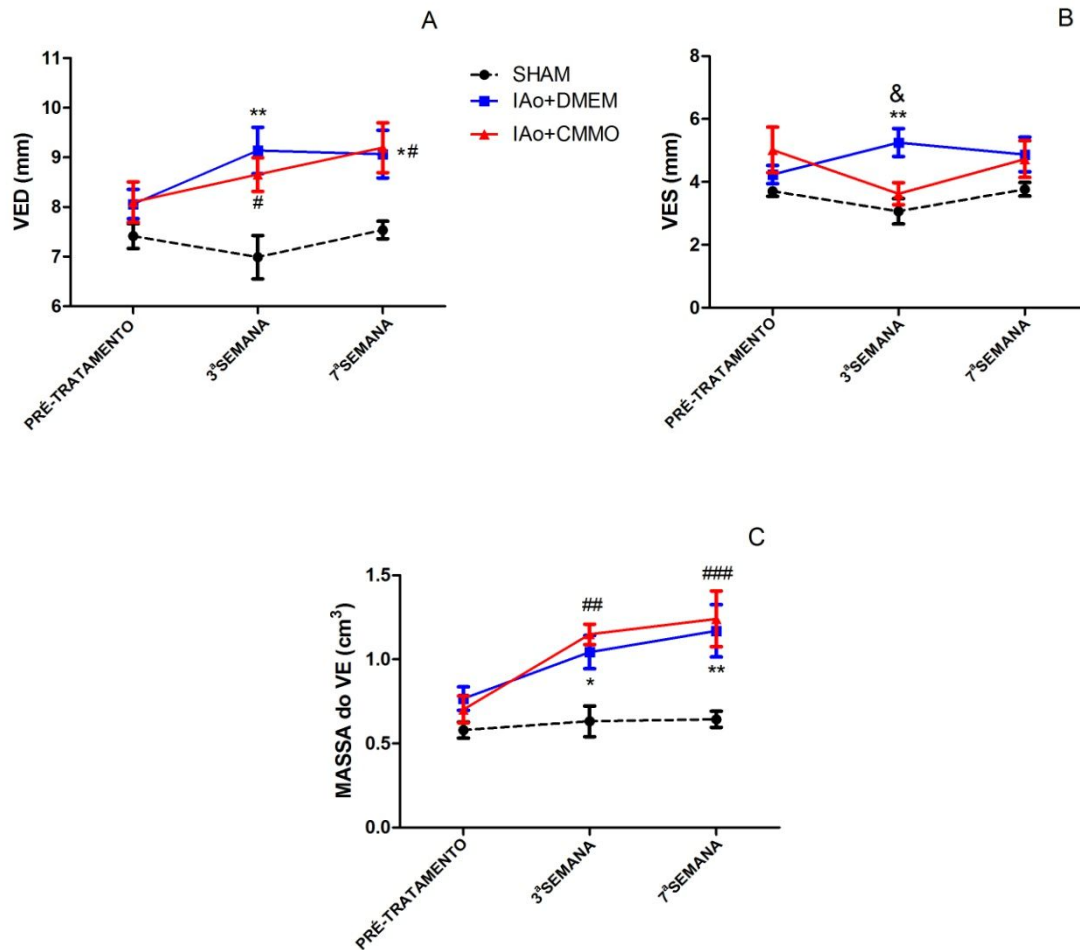


Figura 13– Parâmetros ecocardiográficos indicativos de morfologia cardíaca, obtidos no período pré-tratamento e na 3ª e 7ª semana após administração intramiocárdica nos grupos SHAM (n=6), IAo+DMEM (n=6) e IAo+CMMO (n=8). **A:** representa o diâmetro do ventrículo esquerdo em diástole (VED, mm); **B:** representa o diâmetro do ventrículo esquerdo em sístole (VES, mm); **C:** representa a massa do ventrículo esquerdo (MASSA do VE, cm³). *P<0,05 IAo+DMEM versus SHAM. #P<0,05 IAo+CMMO versus SHAM. & p<0,05 IAo+DMEM vs IAo+CMMO. ANOVA TWO WAY seguido de pós-teste de Bonferroni para múltiplas comparações.

Devido ao fato da sobrecarga de volume gerar aumento de pressão intraventricular esquerda, é esperado que essa pressão aumentada seja transmitida retrogradamente ao átrio esquerdo com consequente dilatação desta câmara (Abhayaratna et. al, 2006). Por isso, em nosso estudo, mensuramos parâmetros relacionados à morfologia do átrio esquerdo. Apesar do diâmetro do AE (mm), (Figura 14B), não ser diferente entre os grupos na 3ª e 7ª semana, a normalização deste parâmetro pelo diâmetro da aorta por meio da relação AE/AO, (Figura14A), mostrou-se

aumentada na 7^a semana no grupo IAo+DMEM (IAo+DMEM: $1,66 \pm 0,12$ vs SHAM: $1,2 \pm 0,1$; $p < 0,05$) e nos animais tratados com CMMO ($1,50 \pm 0,07$) observamos uma tendência das células em manter a estabilidade deste parâmetro. A morfologia atrial foi também avaliada por meio da imagem de quatro câmeras obtida pelo ECO, a qual forneceu dados para estimativa do volume do átrio esquerdo (V AE 4C, cm^3). Observamos uma dilatação de AE (Figura 14C), na 3^a semana, no grupo IAo+DMEM em comparação com o SHAM ($0,15 \pm 0,02 \text{ cm}^3$ vs $0,08 \pm 0,01 \text{ cm}^3$; $p < 0,05$). A administração i.m. de CMMO não foi capaz de impedir a dilatação de AE ($0,14 \pm 0,02 \text{ cm}^3$). Na 7^a semana, não foi observada diferença significativa entre os grupos experimentais (figura 14C).

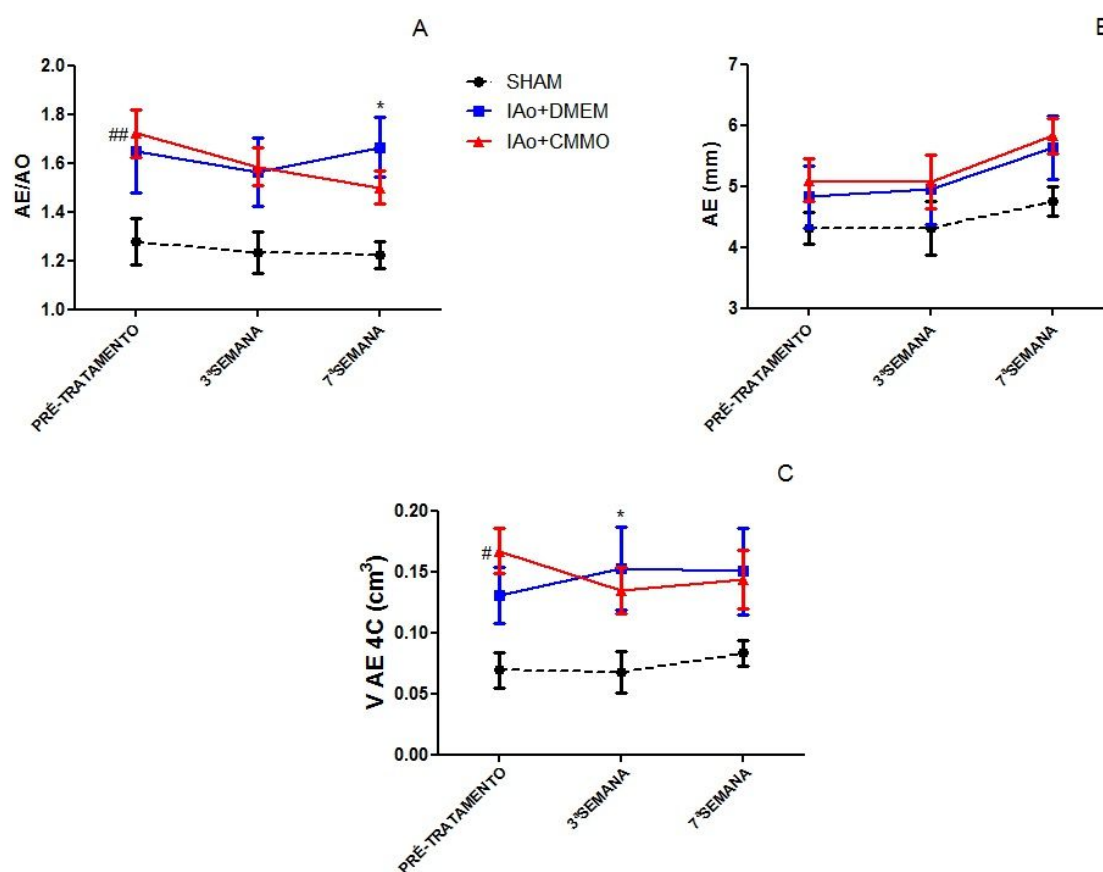


Figura 14– Parâmetros ecocardiográficos indicativos de morfologia cardíaca, obtidos no período pré-tratamento e na 3^a e 7^a semana após administração intramiocárdica nos grupos SHAM (n=6), IAo+DMEM (n=6) e IAo+CMMO (n=8). **A**: representa a relação do diâmetro do AE normalizado pelo diâmetro da Aorta (AE/Ao); **B**: representa o diâmetro do átrio esquerdo (AE, mm). * $P < 0,05$ IAo+DMEM

versus SHAM. #P<0,05 e ## P<0,01 IAo+CMMO versus SHAM. ANOVA TWO WAY seguido de pós-teste de Bonferroni para múltiplas comparações.

Conforme mostramos anteriormente, a sobrecarga de volume promove modificação da geometria cardíaca no sentido de tornar o VE anormalmente esférico. O parâmetro L menor (cm), (Figura 15A), já se apresenta aumentado nos grupos IAo+DMEM e IAo+CMMO no período pré-tratamento, mostrando que a dilatação de VE acontece precocemente. Na 3^a semana após administração i.m. observamos que o grupo IAo+DMEM prosseguiu com incrementos nos valores de L menor em relação ao grupo SHAM ($1,00 \pm 0,03$ cm vs $0,71 \pm 0,06$ cm no grupo SHAM, $p < 0,001$) enquanto o grupo IAo+CMMO apresentou redução deste parâmetro não mais diferindo do SHAM ($0,87 \pm 0,05$ cm vs $0,71 \pm 0,06$ no grupo SHAM, $p > 0,05$). Na 7^a semana a IAo continuou a provocar aumento do eixo menor (IAo+DMEM: $1,11 \pm 0,05$ cm vs SHAM: $0,80 \pm 0,05$ cm; $p < 0,001$) e a administração de CMMO manteve este parâmetro semelhante aos valores observados para o SHAM (IAo+CMMO: $0,96 \pm 0,06$ cm vs SHAM: $0,8 \pm 0,0$ cm; $p < 0,001$).

A alteração morfológica do VE induzida pelo aumento de pré-carga foi mensurada também pelo índice de esfericidade, uma medida que de certa forma normaliza as alterações do eixo menor pelo eixo maior e, portanto, representa avaliação mais fidedigna da morfologia ventricular que aquela apresentada isoladamente pelos valores de L menor. Dentro deste contexto, observamos que a dilatação precoce observada uma semana após IAo e referente ao período pré-tratamento, manteve-se na 3^a semana, maior nos grupos IAo+DMEM ($0,89 \pm 0,04$) e (IAo+CMMO: $0,83 \pm 0,05$) quando comparados ao SHAM ($0,67 \pm 0,04$). Na 7^a semana, a IAo continuou a promover aumento deste parâmetro conforme observado para o grupo IAo+DMEM em relação ao SHAM (IAo+DMEM: $0,90 \pm 0,04$ vs SHAM: $0,69 \pm 0,02$ $p < 0,01$). Porém, a administração

de CMMO não conseguiu prevenir a alteração morfológica de esfericidade do VE (IAo+CMMO: $0,84 \pm 0,02$ vs SHAM: $0,69 \pm 0,02$; $p < 0,05$). Apesar de a literatura demonstrar que as células MSC promovem melhora no remodelamento cardíaco e redução da dilatação do ventrículo esquerdo no infarto do miocárdio (Mirotsoy et. al., 2011; Berry et. al., 2006), em nosso estudo com sobrecarga de volume causada pela IAo não notamos mudanças morfológicas do VE ao final do protocolo experimental.

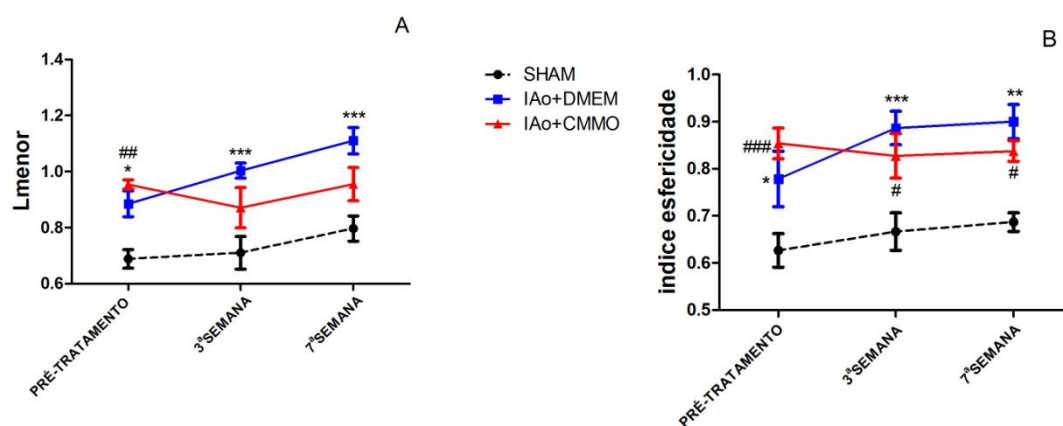


Figura 15– Parâmetros ecocardiográficos indicativos de morfologia cardíaca, obtidos no período pré-tratamento e na 3ª e 7ª semana após administração intramiocárdica nos grupos SHAM (n=6), IAo+DMEM (n=6) e IAo+CMMO (n=8). **A:** representa o comprimento do eixo menor do ventrículo esquerdo (L menor, cm); **B:** representa a relação entre o eixo menor e o eixo maior do ventrículo esquerdo denominado índice de esfericidade. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ para IAo+DMEM versus SHAM. # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$ e ### $P < 0,001$ para IAo+CMMO versus SHAM. ANOVA TWO WAY seguido de pós-teste de Bonferroni para múltiplas comparações.

4.4.4 Indicativos de função sistólica no período pós-tratamento

A função sistólica foi avaliada por meio dos parâmetros S'MITRAL e FEA. O S'MITRAL representa uma medida tissular que avalia a velocidade do deslocamento do ânulo da valva mitral no momento da sístole ventricular (Prunieret al., 2002), sendo, portanto, um indicativo de função contrátil. De fato a literatura mostra que este parâmetro é considerado mais sensível que outros parâmetros ecocardiográficos no sentido de detectar disfunção sistólica precoce e tem sido utilizado em humanos e animais de experimentação (Ommenet al., 2000; Kim et al., 2010). Em nosso estudo, o parâmetro S'MITRAL (cm/s), (Figura 16A), não foi diferente em nenhum dos tempos

analisados, seja no momento pré-tratamento, seja nas semanas após a administração intramiocárdica.

A análise da FEA (Figura 16C), por sua vez, nos mostrou que no tempo pré-tratamento, os animais do grupo IAo+CMMO já apresentaram prejuízo de função sistólica em relação ao grupo SHAM ($40\pm 3\%$ vs $51\pm 1\%$ no grupo SHAM, $p < 0,05$) não diferindo do grupo IAo+DMEM (FEA: $47\pm 2\%$). Apesar deste significativo prejuízo de base de função sistólica no grupo IAo+CMMO, na 3ª semana observamos que os animais tratados com CMMO não apresentaram prejuízo adicional de fração de encurtamento ao longo do tempo e, interessante, não mais diferiram dos animais do grupo SHAM ($49\pm 3\%$ vs 57 ± 4 no grupo SHAM, $p > 0,05$). Entretanto, nossa conclusão sobre a relativa melhora da terapia celular com CMMO, na 3ª semana, sobre a função sistólica torna-se limitada pelo fato do grupo IAo+CMMO, apesar de não diferir do grupo SHAM, também não apresentar melhora de função em relação ao grupo IAo+DMEM (FEA: $44\pm 2\%$). Entretanto, ainda que possamos admitir uma relativa melhora da função sistólica na 3ª semana nos animais tratados com CMMO, na 7ª semana, este efeito da administração de CMMO no sentido de estabilizar este parâmetro não se manteve de forma que a FEA foi significativamente menor no grupo IAo+CMMO quando comparado ao grupo SHAM (IAo+CMMO: $42,55\pm 2,83\%$ vs SHAM: $53,2\pm 2,2\%$; $p < 0,05$). O grupo IAo+DMEM, por sua vez, apesar do prejuízo contrátil observado na 3ª semana, apresentou normalização da FEA não diferindo do grupo SHAM (IAo+DMEM: $49,20\pm 2,71\%$ vs SHAM: $53,2\pm 2,2\%$). É válido ressaltar que todas as medidas de função sistólica foram obtidas em animais com FC semelhantes, visto que não houve diferença significativa deste parâmetro em quaisquer dos momentos analisados (Figura 16B). Esta observação torna-se importante no sentido de

excluirmos qualquer influência da FC e tempo de enchimento ventricular sobre os parâmetros de função sistólica.

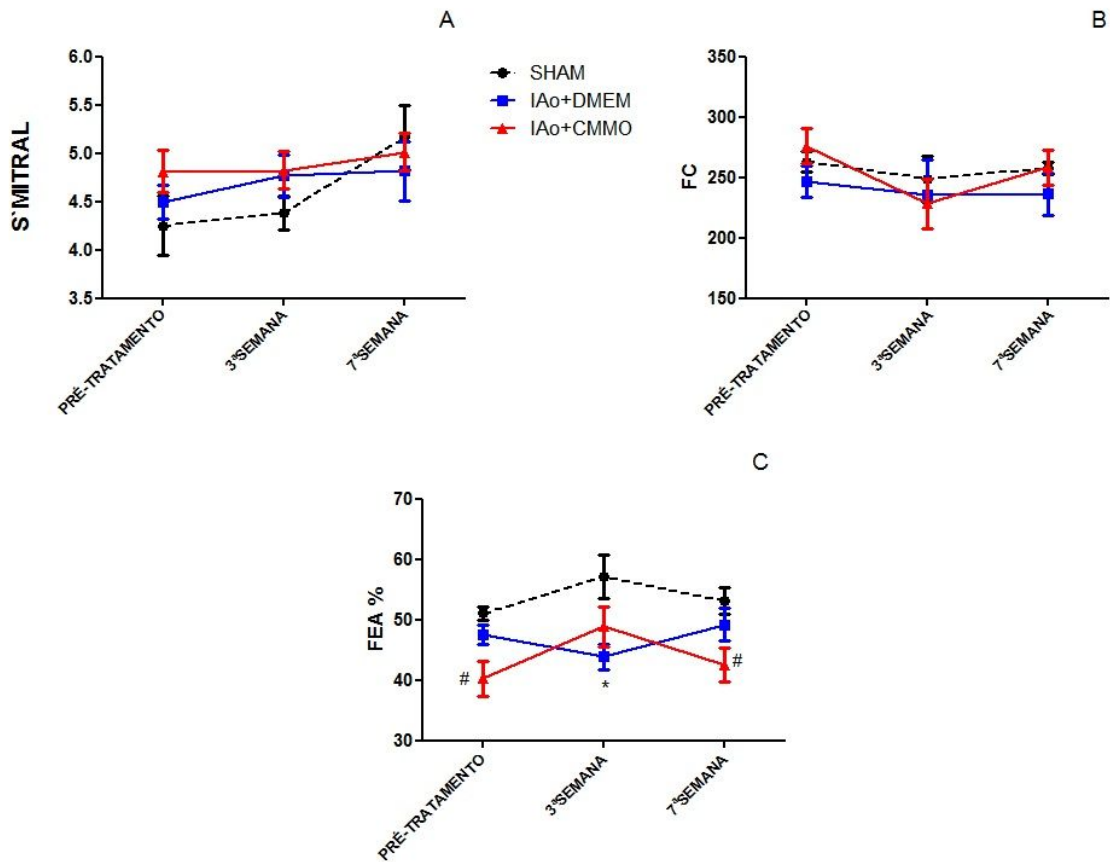


Figura 16– Parâmetros ecocardiográficos indicativos de função sistólica, obtidos no período pré-tratamento e na 3ª e 7ª semana após administração intramiocárdica nos grupos SHAM (n=6), IAo+DMEM (n=6) e IAo+CMMO (n=8). **A:** representa a velocidade de deslocamento do ânulo da valva mitral no momento da sístole ventricular (S'MITRAL, cm/s); **B:** frequência cardíaca (FC, bpm); **C:** Fração de encurtamento de área (FEA, %). *P<0,05 para IAo+DMEM versus SHAM. #P<0,05 para IAo+CMMO versus SHAM. ANOVA TWO WAY seguido de pós-teste de Bonferroni para múltiplas comparações.

4.4.5 Indicativos de função diastólica no período de pós-tratamento

A literatura mostra que em relação à função sistólica, a função diastólica recebe pouca atenção nos seres humanos que sofrem de IAo grave (Tamborini, et. al., 1995; Villari, et. al., 1993; Plante, et. al., 2003). Assim, tem sido sugerido que anormalidades na função diastólica podem influenciar o estado sintomático e o

prognóstico de indivíduos com IAo grave e com outras doenças cardíacas como, por exemplo, infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca congestiva, diabetes e hipertensão (Fagard, et. al., 2001; Zile, et. al., 2000; Plante, et. al., 2003). Em nosso estudo, não observamos diferença nos parâmetros relação E/A, E'MITRAL (cm/s) e relação Emitral/E'mitral indicativos de função diastólica em quaisquer dos tempos analisados independentemente dos tratamentos recebidos, (Figuras 17A, B e C). Diferente do nosso estudo, no trabalho de Plante e colaboradores (Plante, et. al., 2003) estes autores mostraram que alguns animais desenvolveram prejuízos de função diastólica num período de 24 semanas após a indução de IAo. Entretanto, vale ressaltar a diferença entre o estudo de Plante e colaboradores no que se refere à janela temporal para análise da função diastólica. Esses autores mostraram prejuízo de função diastólica em uma fase mais crônica de IAo (24 semanas), enquanto em nosso estudo a avaliação mais tardia aconteceu no tempo de 8 semanas após IAo.

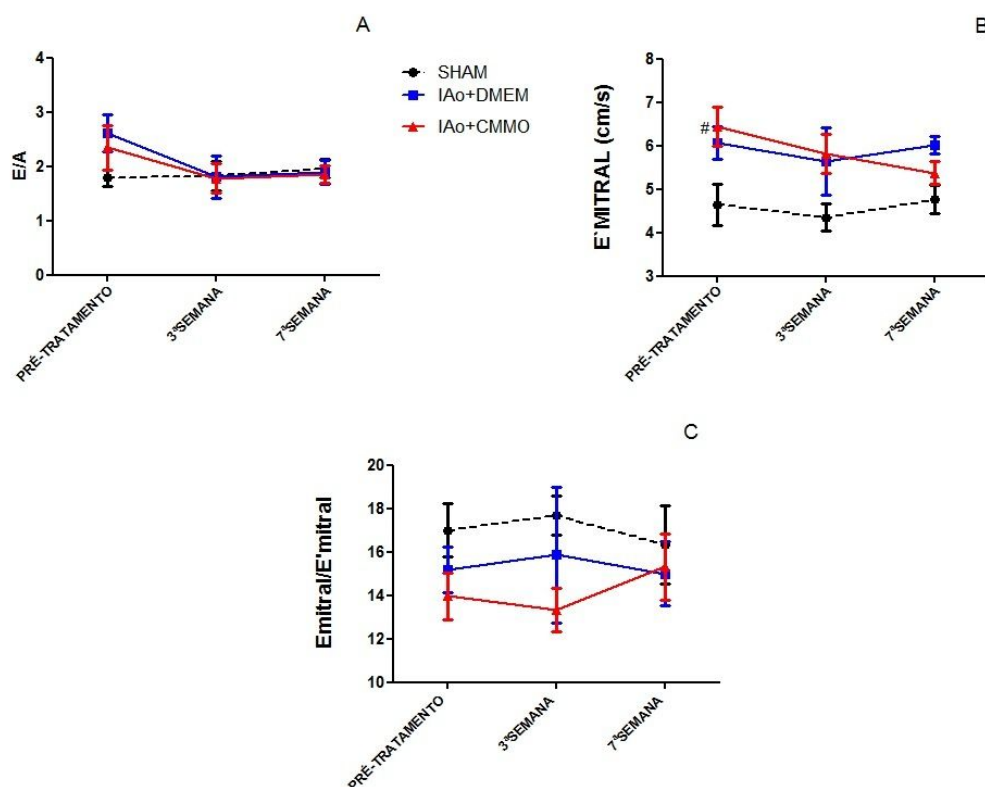


Figura 17– Parâmetros ecocardiográficos indicativos de função sistólica, obtidos no período pré-tratamento e na 3ª e 7ª semana após administração intramiocárdica nos grupos SHAM (n=6),

IAo+DMEM (n=6) e IAo+CMMO (n=8). **A:** Relação onda E e onda A (E/A). **B:** Velocidade de deslocamento tissular do ânulo da mitral no momento do enchimento ventricular passivo (E' MITRAL, cm/s). **C:** Razão entre a velocidade do fluxo passivo do sangue no ventrículo esquerdo com a velocidade de deslocamento tissular do ânulo da mitral no momento do enchimento ventricular passivo (E mitral/E' mitral). ANOVA TWO WAY seguido de pós-teste de Bonferroni para múltiplas comparações.

4.4.6 Pressão arterial e frequência cardíaca

A tabela 3 mostra os valores basais de PA e FC na 7ª semana após administração i.m. nos diferentes grupos experimentais. Foi observada redução da pressão arterial diastólica (PAD) nos animais com IAo. Esta redução é justificada pelo fato da retração aórtica no momento da diástole contar com um menor volume a ser propelido adiante pelo sistema circulatório devido ao volume perdido pelo jato regurgitante. Devido ao fato da terapia celular não interferir com a regeneração valvar, era esperado que a PAD fosse baixa nos animais com IAo, independente da administração i.m. recebida.

Grupos	PAS	PAD	PAM	FC
SHAM	128±4mmHg	84±4mmHg	103±4mmHg	330±14bpm
IAo+DMEM	138±2mmHg	72±2mmHg	101±2mmHg	317±17bpm
IAo+CMMO	139±3mmHg	65±4mmHg ^{##}	99±3mmHg	309±21bpm

Tabela 3 – Dados de pressão arterial e frequência cardíaca obtidos na 7ª semana após administração i.m. nos grupos SHAM (n=6), IAo+DMEM (n=4) e IAo+CMMO (n=6). PAS: pressão arterial sistólica (mmHg), PAD: pressão arterial diastólica (mmHg), PAM: pressão arterial média e FC: frequência cardíaca (bpm). ## p< 0,001 versus SHAM.

4.4.7 Sensibilidade do barorreflexo

O barorreflexo é responsável pelo controle momento a momento da pressão arterial e sua forma de atuação conta com as eferências autonômicas simpática e parassimpática. Sabe-se que a avaliação do barorreflexo representa uma forma de análise indireta da modulação e tônus autonômico (Schrezenmaier et al., 2007). Dentro deste contexto, trabalhos na literatura mostram prejuízo da função barorreceptora em doenças cardiovasculares e insuficiência cardíaca (Eckberge et al., 1971; Cheng et al.,

1991).O desequilíbrio autonômico, em favor do tônus simpático é acompanhado por uma unidade vagal empobrecida, que ocorre em uma fase inicial da IC (Jankowska et al., 2006).

Em nosso estudo, avaliamos a sensibilidade do barorreflexo na 7ª semana após administração i.m (ou seja, 8ª semana após indução de IAo). Para as análises hemodinâmicas na 7ª semana após administração i.m., a variação da Δ PAM (mmHg) foi calculada através da diferença dos valores de PAM no momento de pré-injeção, que corresponde ao período basal, e pós-injeção, depois das administrações i.v das drogas vasoativas nos animais. Para cada dose de NPS, doador de óxido nítrico, foram registradas as respectivas variações de PAM (Δ PAM, mmHg) as quais foram negativas devido à vasodilatação e diminuição da pressão arterial. Para cada dose de FENIL, agonista α -adrenérgico, os valores de Δ PAM (mmHg) foram positivos, por causa da vasoconstrição e aumento da pressão arterial. Os valores médios de Δ PAM (mmHg) para cada dose de NPS e FENIL nos grupos SHAM, IAo+DMEM e IAo+CMMO são mostrados na Tabela 4.

Grupos	NPS			FENIL		
	0,5 μ g/kg	1 μ g/kg	5 μ g/kg	2,5 μ g/kg	5 μ g/kg	10 μ g/kg
SHAM	-30 \pm 5mmHg	-29 \pm 7mmHg	-33 \pm 6mmHg	35 \pm 7mmHg	49 \pm 7mmHg	48 \pm 5mmHg
IAo+DMEM	-19 \pm 2mmHg	-15 \pm 3mmHg	-20 \pm 2mmHg	34 \pm 6mmHg	37 \pm 5mmHg	48 \pm 5mmHg
IAo+CMMO	-25 \pm 7mmHg	-24 \pm 4mmHg	-28 \pm 5mmHg	43 \pm 5mmHg	43 \pm 5mmHg	48 \pm 4mmHg

Tabela 4 – Valores de média \pm epm da Δ PAM em diferentes doses de NPS e FENIL obtidos na 7ª semana após administração intramiocárdica nos grupos SHAM (n=6), IAo+DMEM (n=4) e IAo+CMMO (n=6).

O reflexo barorreceptor foi calculado através das Δ PAM e FC obtida pelas administrações i.v. de NPS (doador de óxido nítrico), nas doses de 0,5, 1 e 5 μ g/kg e

FENIL (agonista adrenérgico α -1), nas doses de 2,5, 5 e 10 μ g/kg, que leva a diminuição da resistência vascular. Isto leva a mudanças na atividade dos barorreceptores arteriais e respostas reflexas que induzem alterações na FC. O índice de sensibilidade do barorreflexo foi estimado pela relação Δ IP/ Δ PAM (ms/mmHg), como foi explicado anteriormente e estimado para cada dose de NPS e FENIL.

Para a dose de NPS 0,5 μ g/kg não observamos diferença significativa na sensibilidade do barorreflexo, no que se refere à resposta de taquicardia reflexa, entre os grupos SHAM (2,04 \pm 0,41 ms/mmHg), IAo+DMEM (1,85 \pm 0,88 ms/mmHg) e IAo+CMMO(2,24 \pm 0,62), (Figura 18A). Similarmente, não observamos diferença na sensibilidade do barorreflexo, (Figuras 18B e 18C), para as demais doses de NPS (NPS 1 μ g/kg, SHAM (2,07 \pm 0,43 ms/mmHg; IAo+DMEM: 1,81 \pm 0,45 ms/mmHg; IAo+CMMO: 2,14 \pm 0,47 ms/mmHg; NPS 5 μ g/kg, SHAM: 1,73 \pm 0,32 ms/mmHg; IAo+DMEM: 1,90 \pm 0,38ms/mmHg; IAo+CMMO: 1,92 \pm 0,37ms/mmHg).

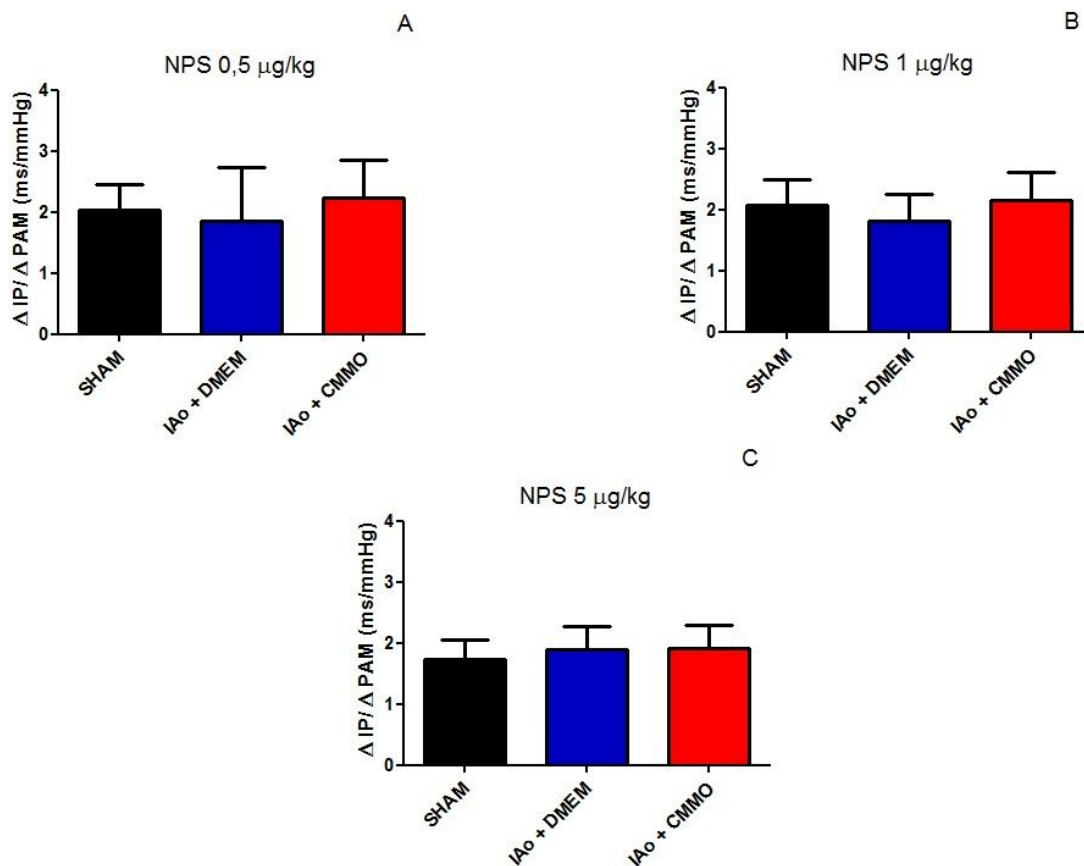


Figura 18 – Valores do índice de barorreflexo (ms/mmHg) obtido pela injeção i.v. das diferentes doses de NPS (A: NPS 0,5 µg/kg; B: NPS 1 µg/kg; C: NPS 1NPS 1 µg/kg) obtido na 7ª semana após administração i.m. nos grupos SHAM (n=6), IAo+DMEM (n=4) e IAo+CMMO (n=6). ANOVA ONE WAY com pós-teste de Bonferroni.

Para a dose de FENIL 2,5 µg/kg também não observamos diferenças significativas entre os grupos SHAM (0,91±0,32 ms/mmHg), IAo+DMEM (1,94±0,37ms/mmHg) e IAo+CMMO (1,80±0,81ms/mmHg), (Figura 19A). O mesmo foi observado para as demais doses de FENIL, (Figuras 19B e 19C), (FENIL 5 µg/kg, SHAM: 2,22±0,62 ms/mmHg; IAo+DMEM: 0,98±0,09ms/mmHg e IAo+CMMO: 2,05±1,92 ms/mmHg; FENIL 10 µg/kg, SHAM: 2,17±0,87 ms/mmHg; IAo+DMEM: 1,33±0,27 ms/mmHg; IAo+CMMO: 3,81±1,37ms/mmHg).

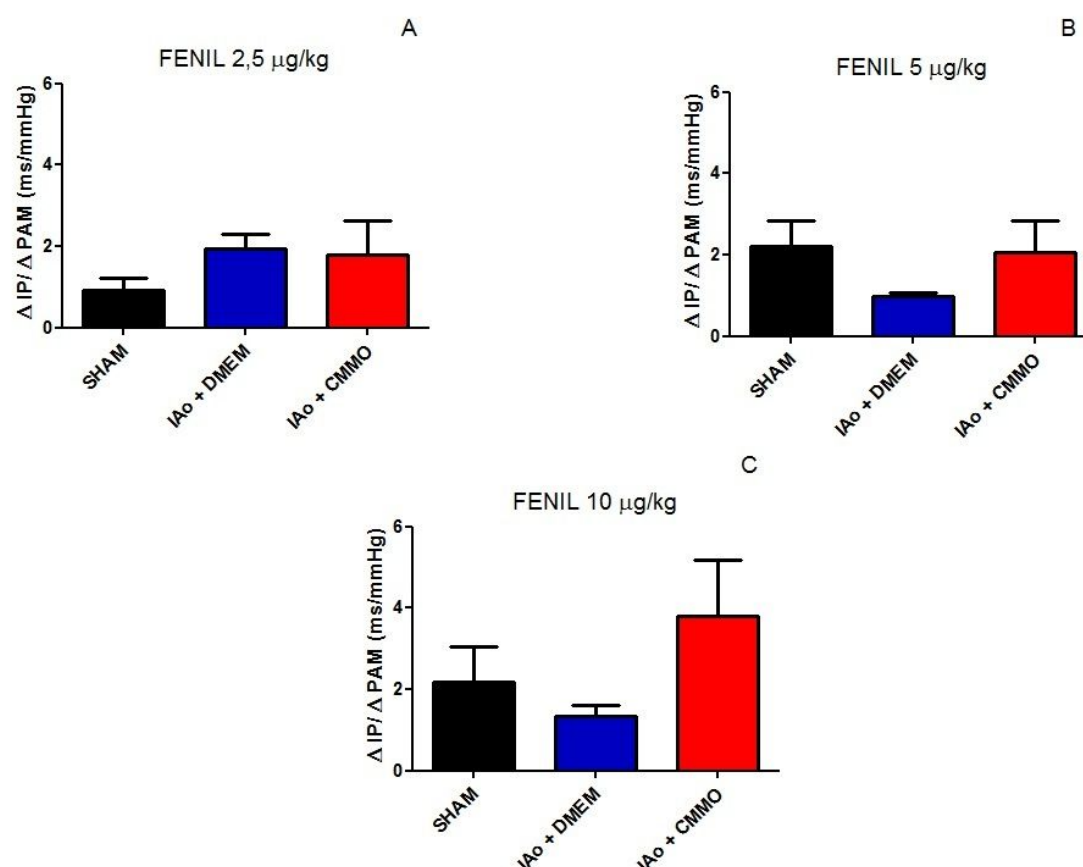


Figura 19 – Valores do índice de barorreflexo (ms/mmHg) obtido pela injeção i.v. das diferentes doses de FENIL (A: FENIL 2,5 µg/kg; B: FENIL 5 µg/kg; C: FENIL 10 µg/kg) obtido na 7ª semana após administração i.m. nos grupos SHAM (n=6), IAo+DMEM (n=4) e IAo+CMMO (n=6). ANOVA ONE WAY com pós-teste de Bonferroni.

Portanto, nosso estudo mostra que a sobrecarga de volume não prejudica as respostas de taquicardia e bradicardia reflexas relacionadas à manifestação simpática e parassimpática, respectivamente. Nossos dados estão de acordo com o estudo de Umemura e colaboradores (1992) que também mostraram ausência de prejuízo da sensibilidade do barorreflexo 2 semanas após indução de IAo (Umemura et. al., 1992). Estes autores ressaltam a grande variabilidade da resposta barorreflexa nos animais com IAo, atribuindo essa variabilidade a diferenças no nível de lesão valvar e hipertrofia compensatória. De fato, em nosso estudo, também observamos grande variabilidade da resposta reflexa da FC frente a alterações de PA. Entretanto, considerando que os dados do ECO mostram nível de lesão valvar e hipertrofia de mesma magnitude nos animais com IAo, independente do tratamento recebido (DMEM ou CMMO), não poderíamos fazer a mesma correlação descrita por Umemura. O fato de não termos observado alteração da função barorreceptora em nosso estudo pode ser atribuído à ausência de insuficiência cardíaca nos animais com IAo. Sendo assim, apesar de termos apresentado a hipótese que a terapia celular pudesse melhorar a função cardíaca refletindo em melhora da resposta barorreceptora, a ausência de insuficiência cardíaca no grupo IAo+DMEM e IAo+CMMO controle nos permite retirar esta hipótese do estudo. Em se tratando de outros modelos de doenças cardíacas, Morais e colaboradores (Morais et. al., 2015) observaram que a administração de MSC em infarto do miocárdio promove melhora da sensibilidade do barorreflexo. Em nosso estudo não observamos influência da terapia com CMMO sobre este parâmetro, mesmo porque nossos animais IAo não apresentaram prejuízo de barorreflexo quando comparados ao SHAM. Talvez, esta ausência de prejuízo na sensibilidade do barorreflexo ajude a explicar porque a IAo cursa com um período longo assintomático em humanos (Maganti et al., 2010). O que está por trás destes mecanismos ainda é motivo de especulação.

4.4.8 Análise da frequência cardíaca intrínseca de marcapasso

A FCI foi avaliada após o duplo bloqueio com metilatropina (3 mg/0,3 mL/kg, antagonista colinérgico), que retira a influência do sistema nervoso autônomo parassimpático, e atenolol (4 mg/0,2 mL/kg, antagonista β -adrenérgico), que retira a influência do sistema nervoso autônomo simpático. Após a injeção dessas drogas a influência autonômica é retirada e a FC depende apenas das propriedades eletrofisiológicas intrínsecas da automaticidade do nódulo sinusal. Desta forma é possível obter os resultados da FCI ou do marcapasso.

Na avaliação da FCIM (Figura 20) não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos experimentais (SHAM: 326 ± 14 bpm, IAo+DMEM: 357 ± 11 bpm e IAo+CMMO: 379 ± 10 bpm). Umemura e colaboradores (1992) descreveram, utilizando preparação isolada de átrio direito, uma redução na frequência espontânea de batimentos atribuindo este resultado a uma infrarregulação de receptores β_1 -adrenérgicos. Se extrapolarmos esses dados de Umemura para a FCI e contrastarmos com nossos achados, podemos afirmar que nosso estudo não corrobora estes resultados, uma vez que não observamos alteração da FCI.

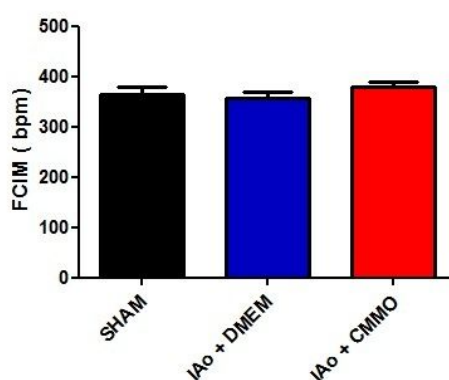


Figura 20 – Valores da FCIM (frequência cardíaca intrínseca média (bpm)), obtido na 7ª semana após administração i.m. nos grupos SHAM (n=6), IAo+DMEM (n=4) e IAo+CMMO (n=6). ANOVA ONE WAY com pós-teste de Bonferroni.

4.4.9 Efeito vagal e simpático

Para a avaliação da participação do componente autonômico sobre a regulação cardíaca o bloqueio vagal e simpático foi realizado com a metilatropina (3 mg/0,3 mL/kg, antagonista colinérgico) e atenolol (4 mg/0,2 mL/kg, antagonista β -adrenérgico). Isto permitiu avaliar o comportamento da frequência cardíaca de interesse para a obtenção dos valores do efeito vagal e simpático, como já foi dito anteriormente.

Os resultados do efeito vagal (figura 21A) nos grupos experimentais não foram significativamente diferentes (SHAM: 113 ± 17 bpm, IAo+DMEM: 108 ± 29 bpm e IAo+CMMO: 160 ± 23 bpm). Semelhantemente, o efeito simpático, também não foi diferente nos grupos estudados (SHAM: -30 ± 11 bpm, IAo+DMEM: -23 ± 8 bpm e IAo+CMMO: -19 ± 15 bpm). Isso mostra que em nossos resultados não verificamos prejuízos no comportamento do efeito vagal e simpático.

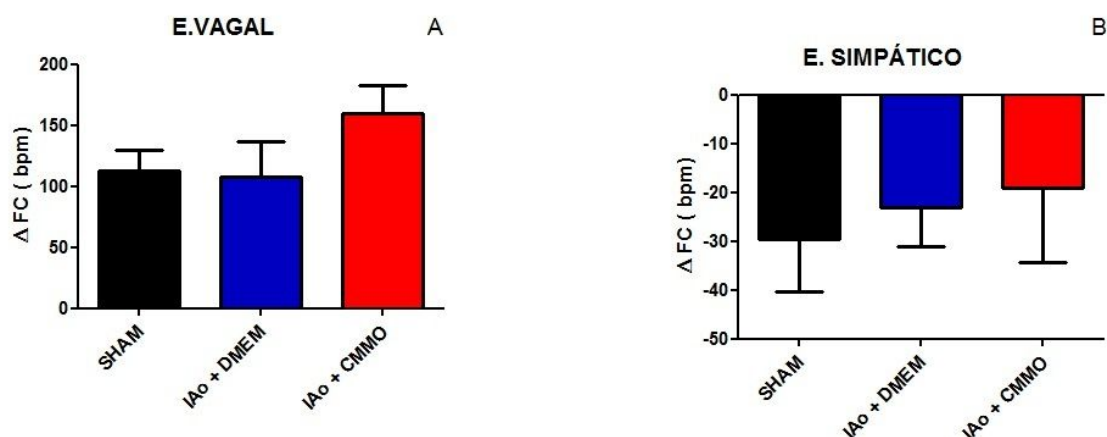


Figura 21 – Valores de avaliação da participação do componente autonômico sobre a regulação cardíaca obtidos na 7ª semana após administração i.m. nos grupos SHAM (n=6), IAo+DMEM (n=4) e IAo+CMMO (n=6). **A:** Efeito Vagal (ΔFC (bpm)). **B:** Efeito Simpático (ΔFC (bpm)). ANOVA ONE WAY com pós-teste de Bonferroni.

4.4.10 Tônus vagal e simpático

Em relação à análise do tônus vagal (Figura 22 A), calculado quando se retira o componente simpático com administração i.v de atenolol (4 mg/0,2 mL/kg), não observamos diferença significativa entre os grupos (SHAM: 77±12 bpm, IAo+DMEM: 80±21 bpm e IAo+CMMO: 89±13 bpm). O tônus simpático (Figura 22 B), calculado quando se retira o componente vagal após a administração i.v de metilatropina (3 mg/0,3 mL/kg), também não foi diferente entre os grupos experimentais (SHAM: 76±13bpm, IAo+DMEM: 66±22 bpm e IAo+CMMO: 85±15 bpm).

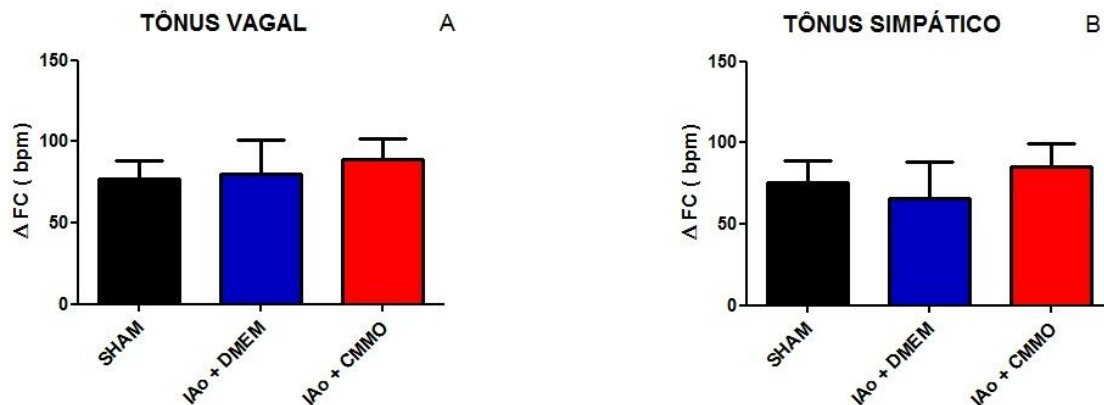


Figura 22 – Avaliação do tônus autonômico sobre a frequência cardíaca obtida na 7ª semana após administração i.m. nos grupos SHAM (n=6), IAo+DMEM (n=4) e IAo+CMMO (n=6).. **A:** Tônus Vagal (ΔFC (bpm)). **B:** Tônus Simpático (ΔFC (bpm)). ANOVA ONE WAY com pós-teste de Bonferroni.

Diferentes estudos mostram um desequilíbrio autonômico, em favor do tônus simpático acompanhado por uma unidade vagal empobrecida, que ocorre em uma fase inicial da IC onde a função ventricular está levemente prejudicada (Grassi et. al., 2001; Grassi et. al., 1995; Jankowska et al., 2006). Todavia, o mecanismo essencial responsável pela hiperatividade simpática na IC permanece desconhecido e pode estar relacionado a diversos sistemas, tais como: atenuação da sensibilidade do barorreflexo; alteração pressórica na artéria e no capilar pulmonar; exacerbação do quimiorreflexo periférico e central; ativação das aferências simpáticas cardíacas que estão relacionadas à sensação

de dor cardíaca durante a isquemia coronariana; ativação dos aferentes renais sensíveis a estímulos mecânicos ou químicos e ativação do sistema renina angiotensina, entre outros (De Angelis et. al., 2004).

Em nosso estudo, apesar do quadro de regurgitação aórtica, os animais não evoluem para o quadro de IC. De fato, não há parâmetros ecocardiográficos que apontem para prejuízo de função sistólica ou diastólica nos animais com IAo. Coerentemente com esta função cardíaca preservada, encontramos a sensibilidade do barorreflexo íntegra e, em adição, comprovamos que não há alteração de tônus autonômico nos animais com IAo quando comparados aos animais normais SHAM. Portanto, a preservação da função cardíaca por si só poderia explicar a integridade da modulação e tônus autonômico em nosso modelo. Em relação à terapia celular, podemos afirmar que a administração de CMMO não modifica o balanço autonômico cardíaco e mostrou ser, pelo menos, uma terapia segura.

4.4.11 Pressão ventricular esquerda

Após as análises ecocardiográficas e de registro de pressão arterial, na 7^a semana foram obtidos os dados de PVE a partir da cateterização do VE. Em relação ao dado de PDFVE (mmHg) (Figura 23 A), houve aumento significativo ($p < 0,01$) deste parâmetro no grupo IAo+DMEM (10 ± 3 mmHg) quando comparado ao grupo SHAM (2 ± 1 mmHg). Devido à ausência da válvula aórtica parte do sangue retorna para dentro do VE, logo após a sístole ventricular. Durante o relaxamento diastólico o VE já está se enchendo de sangue a partir da aorta, mesmo antes da abertura da válvula mitral, aumentando assim o volume ventricular e, conseqüentemente, os valores de PDFVE. A administração de CMMO parece atenuar parcialmente esse aumento de PDFVE uma

vez que os valores observados para este parâmetro (6 ± 2 mmHg) não diferiram dos valores quantificados para o grupo SHAM e IAo+DMEM.

Em relação à contratilidade cardíaca expressa pela $dPdt+$ (mmHg), (Figura 23 B), notamos novamente uma tendência da terapia celular com CMMO (6115 ± 337 mmHg/s) em aumentar este parâmetro em relação aos animais com IAo+DMEM (4900 ± 446 mmHg/s). A detecção de eventual melhora de contratilidade pela cateterização de VE sugere que talvez essa técnica seja mais sensível que a ecocardiografia a qual não mostrou diferença de função sistólica nos diferentes grupos experimentais. Em relação ao relaxamento cardíaco denotado pelos valores de $dPdt-$, não observamos diferença significativa entre os grupos. (Figura 23C).

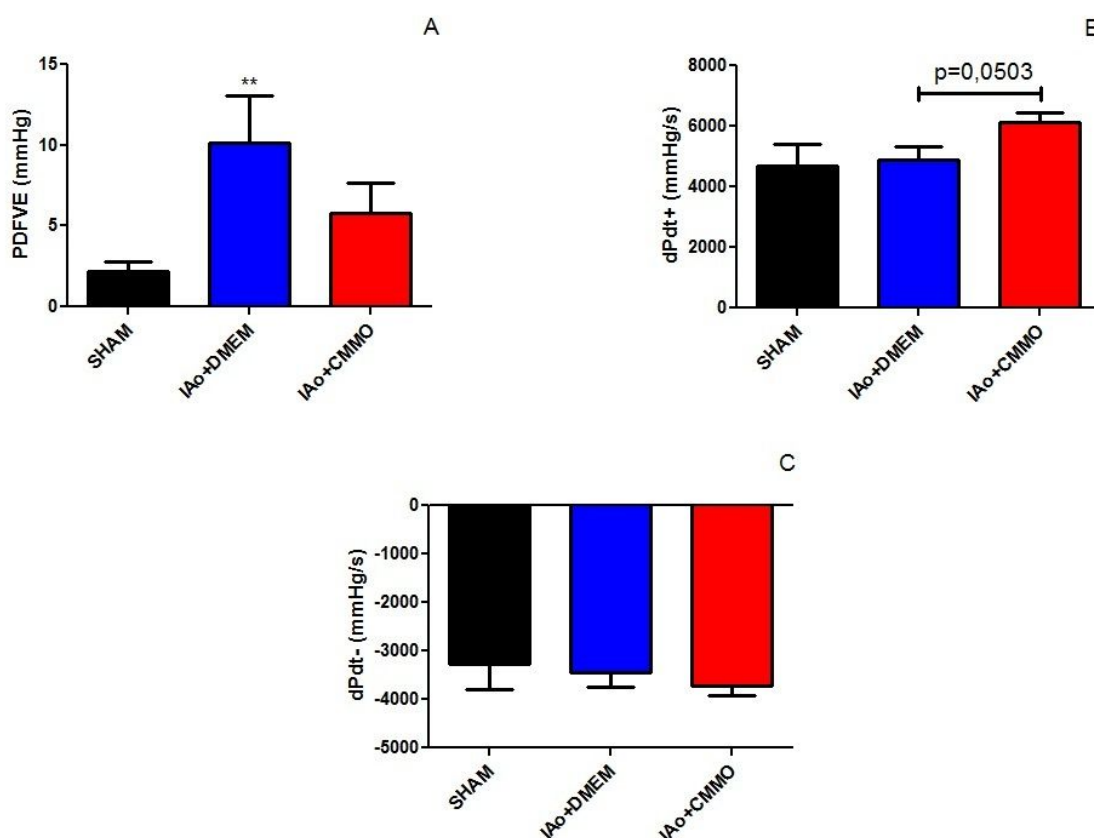


Figura 23 – Valores de PVE obtidos na 7ª semana após as análises hemodinâmicas. Grupos SHAM (n=6), IAo+DMEM (n=6) e IAo+CMMO (n=8). A: Pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE

(mmHg); **B**: Índice de contratilidade cardíaca (dPdt- (mmHg/s)). **C**: Índice de relaxamento cardíaco (dPdt + (mmHg/s)). ANOVA ONE WAY com pós-teste de Bonferroni.

4.5 Investigação tecidual cardíaca da presença de CMMO

A seguir temos as ilustrações das análises de investigação tecidual, após os cortes dos corações feitos em criostato e visualizados em microscópio (Nikon Eclipse 80i) com luz ultravioleta acoplado a sistema de aquisição de imagens (NIS-Elements AR 3.10) no aumento de 100X. Nos grupos SHAM e IAo+DMEM, como já era esperado, não encontramos a presença da células (Figura 24 A e B). Por sua vez no grupo IAo+CMMO presenciamos uma quantidade mediana de células ao final da 7^a semana após administração i.m. de CMMO previamente marcadas com o intercalante nuclear Hoechst 33342(Figura 24C). Em nosso estudo não fizemos uma avaliação temporal para verificar se há uma redução do número de células no tecido com o decorrer do tempo. Entretanto, alguns trabalhos mostram que a marcação de células tronco com intercalantes nucleares pode ser reduzida conforme ocorra replicação destas células no tecido (Zant & Fry, 1983). Portanto, podemos afirmar que após 7 semanas da injeção i.m. foi possível encontrar células no tecido cardíaco, fato que indica a capacidade de sobrevivência dessas células neste tecido e sugere capacidade de atuação sobre o mesmo.

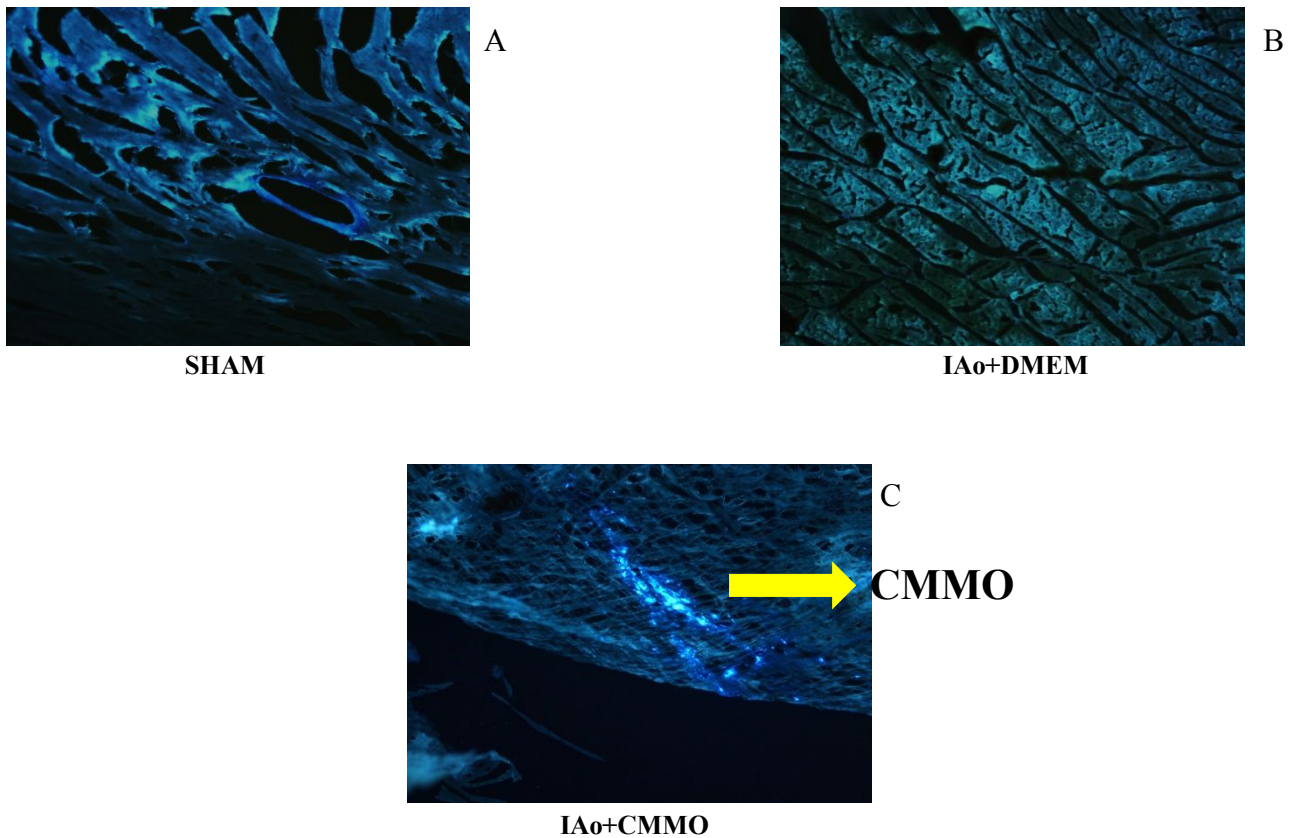


Figura 24 - Cortes Histológicos representando a presença de CMMO ao final de 7 semanas do protocolo experimental (aumento de 100X). A: Grupo SHAM. B: Grupo IAo+DMEM. C: Grupo IAo+CMMO.

4.6 Quantificação de fibrose

A literatura mostra que em doenças com sobrecarga de volume, ocorre modificações da geometria cardíaca, causando um aumento desproporcional da matriz intersticial de colágeno, que promove a disfunção cardíaca (Janicki et. al., 1992; Brilla et. a., 1996; Matsubara et. al., 2006). Porém no nosso modelo de IAo os dados da quantificação de fibrose (Figura 25), expressos em porcentagem (%) não foram diferentes entre os grupos IAo+DMEM ($5,92 \pm 1,36\%$) e SHAM ($2,33 \pm 0,84\%$). No estudo de Matsubara e colaboradores (2006), os animais submetidos à fistula aortocava não mostraram diferenças em relação à fibrose intersticial do miocárdio em relação aos SHAM, após 4 semanas de estudos. O grupo com hipertensão arterial renovascular teve

aumento de fibrose em comparação com o SHAM. O que talvez explique que em modelos de hipertensão renovascular a ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, desempenha um papel essencial na gênese da hipertensão arterial, na hipertrofia, na fibrose intersticial miocárdica e na remodelação vascular. Em relação à administração de CMMO ($4,49 \pm 0,79\%$), não vimos alterações sobre o tecido fibroso. É sabe-se na literatura que as CT, possuem mecanismos de ação antifibróticos (Ohnishi et al., 2007). Porém após as análises de quantificação de fibrose, não houve diferença significativa em relação aos animais tratados com a terapia celular em relação aos animais dos grupos IAo+DMEM e SHAM.

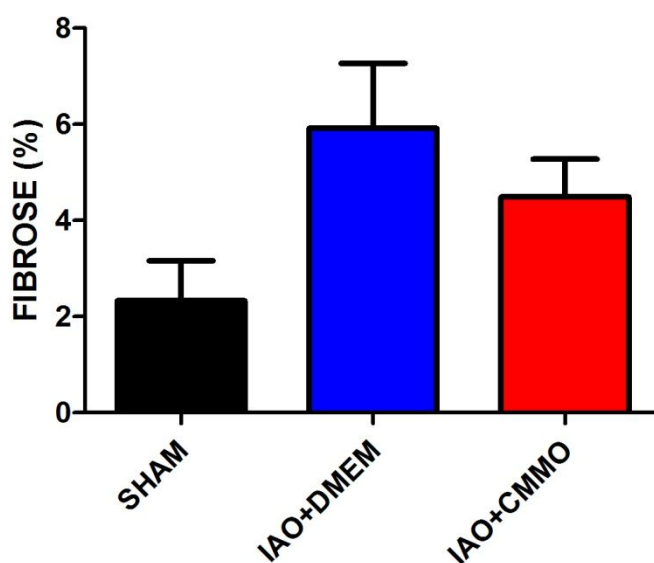
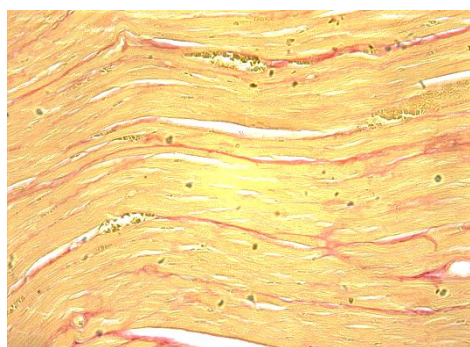


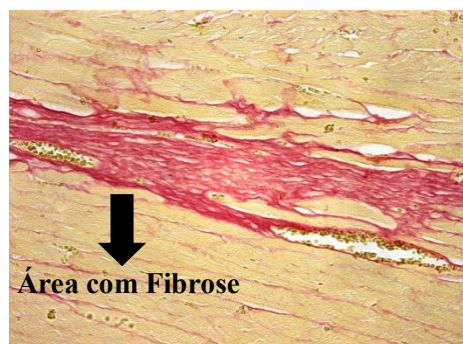
Figura 25 – Quantificação de fibrose (%) obtida na 7ª semana após administração intramiocárdica (8 semanas após IAo) nos grupos SHAM, IAo+DMEM e IAo+CMMO. ANOVA ONE WAY seguida de pós-teste de Bonferroni.

A Figura 26 mostra fotos representativas (Figura 25) de tecido cardíaco cortado em micrótomo e corado com Picro Sirius Red. Foram obtidas imagens do septo e da parede livre do VE, em microscópio em aumento de 400X.



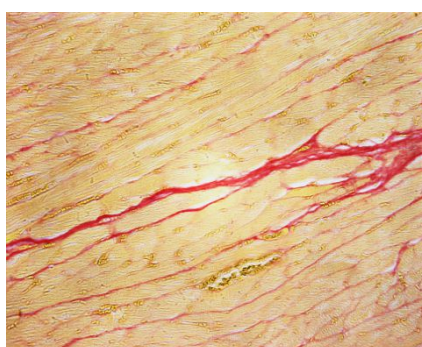
A

IAo+DMEM



B

IAo+DMEM



C

IAo+CMMO

Figura 26 – Imagens representativas dos grupos SHAM, IAo+DMEM e IAo+CMMO obtidas na 7^a semana após administração intramiocárdica (8 semanas após IAo) em microscópio de campo claro invertido após coloração de Picro Sirius Red para marcação em vermelho das fibras de colágeno. Aumento de 400 X.

5. CONCLUSÕES

A análise dos dados de nosso estudo nos permite concluir:

- O modelo de IAo apresenta precocemente dilatação de átrio e ventrículo esquerdos com prejuízo de aproximadamente 15% na função sistólica. O remodelamento cardíaco neste modelo ao longo das 8 semanas de protocolo experimental segue com manutenção do perfil de dilatação de AE e VE, porém com restabelecimento de função sistólica e diastólica, sem prejuízos de sensibilidade do barorreflexo e do tônus autonômico e sem aumento significativo da fibrose intersticial;
- A administração intramiocárdica de CMMO na segunda semana após indução de IAo não é capaz de prevenir, ao final de 7 semanas após o tratamento, o remodelamento cardíaco no que se refere a redução ou prevenção de adicional dilatação ventricular, dilatação atrial e hipertrofia cardíaca;
- A terapia celular não modificou o perfil de sensibilidade do barorreflexo e tônus autonômico e não interferiu no percentual de fibrose tecidual.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABHAYARATNA WP, SEWARD JB, APPLETON CP, DOUGLAS PS, TAJIK AJ, TSANG TSM. Left atrial size. *Journal of the American College of Cardiology*. 47 (12): 2357-63; 2006.
2. ALHUDA LA. Antidepressivo modula o comportamento e a expressão gênica das cadeias de miosina, serca2 e fosfolambam em ratos com insuficiência aórtica?. Botucatu: 2013. 41p.
3. AMADO LC, SALIARIS AP, SCHULERI KH, St. JOHN M, XIE J-S, CATTANEO S, DURAND DJ, FITTON T, KUANG JG, STEWART G, LEHRKE S, BAUMGARTNER WW, MARTIN BJ, HELDMAN AW, HARE JM. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *PNAS* 102, 11474-11479; 2005.
4. ARNOUS S, MOZID A, MARTIN J, MATHUR A. Bone marrow mononuclear cells and acute myocardial infarction. *Stem Cell Research & Therapy*: 1-9, 2012.
5. ARSENAULT M, PLANTE E, DROLET MC, COUET J. Experimental aortic regurgitation in rats under echocardiographic guidance. *J Heart Valve Dis.*, 11(1):128-34, 2002.
6. BONOW RO, CARABELLO BA, CHATTERJEE K, LEON JR ACD, FAXON DP, FREED MD, GAASCH WH, LYTLE BW, NISHIMURA RA, O'GARA PT, O'ROURKE RA, OTTO CM, SHAH PM, SHANEWISSE JS. ACC/AHA 2006 Guidelines for the Management of Patients With Valvular Heart Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 1998 Guidelines for the Management of Patients With Valvular Heart Disease): Developed in Collaboration With the Society of Cardiovascular Anesthesiologists: Endorsed by the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions and the Society of Thoracic Surgeons. *Circulation* 114: e84-e231, 2006.
7. BOOMSMA RA, SWAMINATHAN PD, GEENEN DL. Intravenously injected mesenchymal stem cells home to viable myocardium after coronary occlusion and preserve systolic function without altering infarct size. *Int J Cardiol*. 37, 17-18; 2007.
8. BORER, J.S. et al. Prediction of indications for valve replacement among asymptomatic or minimally symptomatic patients with chronic aortic regurgitation and normal left ventricular performance. *Circ.*, 97: 525-534, 1998.
9. CORONEL R, GROOT JR, VAN LIESHOUT LL. Defining Heart Failure. *Cardiovascular Research* 50: 419-422, 2001.
10. DOBSON, K. R. et al. Centrifugal Isolation of Bone Marrow from Bone: An Improved Method for the Recovery and Quantitation of Bone Marrow Osteoprogenitor Cells from Rat Tibiae and Femuræ. *Calcified Tissue International*, USA, v. 65, n. 5, . 411-413, Nov. 1999.
11. ELLENBOGEN KA, MOHANTY PK, SZENTPETERY S, THAMES, MD. Arterial baroreflex abnormalities in heart failure. Reversal after orthotopic cardiac transplantation. *Circulation*. 1989;79:51-58.
12. ESKESEN K, OLSEN NT, DIMAANO VL, PINHEIRO A, SOGAARD P, FRITZ-HANSEN T, SORENSEN LL, ABRAHAM TP. New approach to intracardiac hemodynamic measurements in small animals: echo-guided percutaneous apical puncture. *J Ultrasound med*. 31(8): 1233-8, 2012.
13. FIDELIS-DE-OLIVEIRA P, WERNECK-DE-CASTRO JPS, PINHO-RIBEIRO V, SHALOM BCM, NASCIMENTO-SILVA JH, COSTA E SOUZA RH, CRUZ IS, RANGEL RR, GOLDENBERG RCS, CAMPOS-DE-CARVALHO AC. Soluble Factors From Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Have Antinecrotic Effect on Cardiomyocytes In Vitro and Improve Cardiac Function in Infarcted Rat Hearts. *Cell Transplantation* 21: 1011-1021, 2012.
14. GNECCHI, M.; HE, H.; LIANG, O.D; MELO, L. G.; MORELLO, F.; MU, H.; NOISEUX, N.; ZHANG, L.; PRATT, R. E.; INGWALL, J. S.; DZAU, V. J. Paracrine Action Accounts for marked Protection of Ischemic Heart by Akt-modified Mesenchymal Stem Cells. *Nature Medicine*, London, v. 4, p. 367-368, 2005.

15. HERZOG EL, CHAI LI, KRAUSE DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 102, 3483-3493; 2003.
16. HUNG S-C, CHEN N-J, HSIEH S-L, LI H, MA, H-L, LO W-H. Isolation and characterization of size-sieved stem cells from human bone marrow. *Stem cells* 20, 249-258; 2002.
17. IRIGOYEN MC, MOREIRA ED, WERNER A, IDA F, PIRES MD, CESTARI IA, KRIEGER EM. Aging and baroreflex control of RSNA and heart rate in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*; 279(5): R1865-71, 2000.
18. JANKOWSKA EA, PONIKOWSKI P, PIEPOLI MF, BANASIAK W, ANKER SD, POOLE-WILSON PA. Autonomic imbalance and immune activation in chronic heart failure Pathophysiological links. *Cardiovascular Research* 70: 434 – 445, 2006.
19. KIM D-H, KIM Y-J, KIM H-K, CHANG S-A, KIM M-S, SOHN D-W, OH B-H, PARK Y-B. Usefulness of Mitral Annulus Velocity for the Early Detection of Left Ventricular Dysfunction in a Rat Model of Diabetic Cardiomyopathy. *Cardiovasc Ultrasound* 2010;18(1):6-11.
20. KLABUNDE, R E. Cardiovascular physiology concepts. Valvular Insufficiency (Regurgitation). Disponível em: <http://www.cvphysiology.com/Heart%20Disease/HD005.htm>. 2011. Acesso em: 29 de jul. 2015.
21. KONINCKX R.; HENSEN, K.; DANIELS, A.; MOREELS, M.; LAMBRICHTS, I.; JONGEN, H.; CLIJSTERS, C.; MEES, U.; STEELS, P.; HENDRIKX, M.; RUMMENS, J.L. Human bone marrow stem cells co-cultured with neonatal rat cardiomyocytes display limited cardiomyogenic plasticity. *Cytotherapy* (2009) Vol. 11, No. 6, 778–792.
22. LEVY D, GARRISON RJ, SAVAGE DD, ET AL. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Fra-mingham Heart Study. *N Engl J Med*, 322:1561–1566, 1990.
23. LIPINSKI JM, GIUSEPPE GL, ZOCCAI B, ABBATE A, KHIANEY R. Impact of intracoronary cell therapy on left ventricular function in the setting of acute myocardial infarction. *J Am College Cardiol* 50:1761-1767, 2007.
24. LORELL BH, CARABELLO BA.. Left Ventricular Hypertrophy: Pathogenesis, Detection, and Prognosis. *Circulation*. 102:470-479, 2000.
25. LUNDE K, SOLHEIM S, AAKHUS S et al. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Eng J Med* 355:1199-1209, 2006.
26. MAGANTI K, RIGOLIN VH, SARANO ME & BONOW RO. Valvular Heart Disease : Diagnosis and Management. *Mayo Clin Proc*. 85: 483–500, 2010.
27. MARTIN-RENDON E, BRUNSKILL SJ, HYDE CJ, STANWORTH SJ, MATHUR A, WATT SM. Autologous bone marrow stem cells to treat acute myocardial infarction: a systematic review. *Eur Heart J* 29:1807-1818, 2008.
28. MATSUBARA LS, NARIKAWA S, FERREIRA ALA, RUPP DE PAIVA SA, ZORNOFF LM, MATSUBARA BB. Remodelação Miocárdica na Sobrecarga Crônica de Pressão ou de Volume no Coração de Ratos. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 86 (2): 126-130, 2006.
29. MIROTSOU M, JAYAWARDENA TM, SCHMECKPEPER J, GNECCHI M, DZAU VJ. Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in the heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 50: 280-289, 2011.
30. MOLINA EJ, PALMA J, GUPTA D, TORRES D, GAUGHAN JP, HOUSER S, MACHA M. Improvement in hemodynamic performance, exercise capacity, inflammatory profile, and left ventricular reverse remodeling after intracoronary delivery of mesenchymal stem cells in an experimental model of pressure overload hypertrophy. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*: 292-299, 2008.
31. MORAIS SDBV, SILVA LEV, LATARO RM, SIMÕES MV, MEIRELLES LS, FAZAN R Jr, SALGADO HC. Mesenchymal Stem Cells Improve Heart Rate Variability and Baroreflex Sensitivity in Rats with Chronic Heart Failure. *Stem Cells and Development*. 00 (00): 2015.
32. OHNISHI AS, SUMIYOSHIB H, KITAMURAC S, NAGAYA N. Mesenchymal stem cells attenuate cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis through paracrine actions. *FEBS Letters* 581: 3961–3966, 2007.

33. ORLIC D, KAJSTURA J, CHIMENTI S, JAKONIUK I, ANDERSON SM, LI B, PICKEL J, MCKAY R, NADAL-GINARD B, BODINE DM, LERI A, ANVERSA P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410, 701-705; 2001.
34. ORTIZ LA, DUTREIL M, FATTMAN C, PANDEY AC, TORRES G, GO K, PHINNEY DG. Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. *PNAS* 104(26): 11002–11007, 2007
35. PERIN EC, DOHMANN HF, BOROJEVIC R, SILVA SA, SOUSA AL, MESQUITA CT, ROSSI MI, CARVALHO AC, DUTRA HS, DOHMANN HJ, SILVA GV, BELEM L, VIVACQUA R, RANGEL FO, ESPORCATE R, GENG YJ, VAUGHN WK, ASSAD JA, MESQUITA ET, WILLERSON JT. Transendocardial autologous bone marrow cell transplantation for severe chronic ischemic heart failure. *Circulation* 107, 2294-2302; 2003.
36. PITTENGER MF, MACKAY AM, BECK SC, JAISWAL RK, DOUGLAS R, MOSCA JD, MOORMAN MA, SIMONETTI DW, CRAIG S, MARSHAK DR. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science* 284, 143-147; 1999.
37. PLANTE E, COUET J, GAUDREAU M, DUMAS MP, DROLET, MC, ARSENAULT M. Left ventricular response to sustained volume overload from chronic aortic valve regurgitation in rats. *Journal of Cardiac Failure*. 9 (2): 128-139, 2003.
38. PLANTE E, GAUDREAU M, LACHANCE D, DROLET MC, ROUSSEL E, GAUTHIER C, LAPOINTE E, ARSENAULT M, COUET J. Angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril prevents volume overload cardiomyopathy in experimental chronic aortic valve regurgitation. *Can J PhysiolPharmacol.*, 82(3):191-9, 2004.
39. PRUNIER F, GAERTNER R, LOUEDEC L, MICHAEL J-B, MERCADIER J-J, ESCOUBET B. Doppler echocardiographic estimation of left ventricular end-diastolic pressure after MI in rats. *CircPhysiol* 283: H346–H352, 2002.
40. PURCELL IF, POOLE-WILSON PA. Heart failure: why and how to define it? *European Journal of Heart Failure* 1: 7-10, 1999.
41. QUEVEDO, H.C.; HATZISTERGOS, K.E.; OSKOUEI, B.N.; FEIGENBAUM, G.S.; RODRIGUEZ, J.E.; VALDES, D.; PATTANY, P.M.; ZAMBRANO, J.P.; HU, Q.; MCNIECE, I.; HELDMAN, A.W.; HARE, J.M. Allogeneic mesenchymal stem cells restore cardiac function in chronic ischemic cardiomyopathy via trilineage differentiating capacity. *PNAS* 106 (33): 14022–14027, 2009.
42. ROSCANI MG, MATSUBARA LS, MATSUBARA BB. Insuficiência Cardíaca com Fração de Ejeção Normal. *Arq Bras Cardiol* 94(5): 694-702, 2010.
43. ROSCANI MG, POLEGATO BF, MINAMOTO SET, LOUSADA APM, MINICUCCI M, AZEVEDO P, MATSUBARA LS, MATSUBARA BB. Left ventricular sphericity index predicts systolic dysfunction in rats with experimental aortic regurgitation. *J Appl Physiol*. 116: 1259-1262, 2014.
44. ROSE, R.A.; JIANG, H.; WANG, X.; HELKE, S.; TSOPORIS, J.N.; GONG, N.; KEATING, S.C.J.; PARKER, T.G.; BACKX, P.H.; KEATING, A. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Express Cardiac-Specific Markers, Retain the Stromal Phenotype, and Do Not Become Functional Cardiomyocytes In Vitro. *Stem Cells* v.26: 2884–2892, 2008.
45. SANH DJ, DEMARIA A, KISSLO J, WEYMAN AE. The Committee on M-mode standardization of the American Society of Echocardiography. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circ*. 58: 1072-83, 1978.
46. SCHREZENMAIER C, SINGER W, SWIFT NM, SLETTEN D, TANABE J, LOW PA. Adrenergic and vagal baroreflexsensitivity in autonomic failure. *Arch Neurol*. 62: 381- 386, 2007.
47. SHAKE JG, GRUBER PJ, BAUMGARTNER WA, SENECHAL G, MEYERS J, REDMOND JM, PITTENGER MF, MARTIN BJ. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional. *Ann Thorac Surg* 73:1919 –26, 2002.

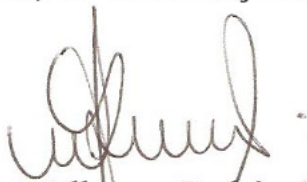
48. STRAUER BE, BREHM M, ZEUS T, KOSTERING M, HERNANDEZ A, SORG RV, KOGLER G, WERNET P. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 106: 1913-1918, 2002.
49. STRAUER BE, YOUSEF M, SCHANNWELL CM. The acute and long-term effects of intracoronary Stem cell Transplantation in 191 patients with chronic heart failure: the STAR-heart study. *European Journal of Heart Failure* 12: 721–729, 2010.
50. TARASOUTCHI, F. et al. Ten-year clinical laboratory follow-up after application of a symptom-based therapeutic strategy to patients with severe chronic aortic regurgitation of predominant rheumatic etiology. *J Am Coll Cardiol.*, 41(8):1316-24, 2003.
51. UMEMURA K, ZIERHUT W, QUAST U, HOF RP. Baroreflex and β -adrenoceptor function are diminished in rat cardiac hypertrophy due to volume overload. *Asic Res Cardiol.* 87: 263-271, 1992.
52. VAN ZANT G, FRYCG. Hoeschst 33342 staining of mouse bone marrow: effects on colony-forming cells. *Cytometry.* 4 (1): 40-6, 1981.
53. WAIRIUKO GM, CRISOSTOMO PR, WANG M, MORRELL ED, MELDRUM KK, LILLEMOE KD, MELDRUM, DR. Stem Cells Improve Right Ventricular Functional Recovery After Acute Pressure Overload and Ischemia Reperfusion Injury. *Journal of Surgical Research* 141: 241–246, 2007.
54. WHO (world health organization, 2011): <http://who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>
55. XU R-X, CHEN X, CHEN J-H, HAN Y, HAN B-M. Mesenchymal stem cells promote cardiomyocyte hypertrophy in vitro through hypoxia-induced paracrine mechanisms. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 36: 176–180, 2009.
56. YE Z, ZHANG BL, ZHAO XX, QIN YW, WU H, CAO J, ZHANG JL, HU JQ, ZHENG X, XU RL. Intracoronary infusion of bone marrow-derived mononuclear cells contributes to longstanding improvements of left ventricular performance and remodelling after acute myocardial infarction: a meta-analysis. *Heart Lung Circ.* 21(11):725-33, 2012.
57. ZORNOFFL L.A.M., PAIVA S.A.R., MINICUCCI M.F., SPADARO J. Infarto do Miocárdio Experimental em Ratos: Análise do Modelo. *Arq. Bras. Cardiol.* 93 (3): 434-440, 2009.

ANEXOS

Certificado

Certificamos que o Protocolo nº **588-CEUA**, sobre “**TERAPIA CELULAR COM CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA PREVINE A DISFUNÇÃO VENTRICULAR ESQUERDA EM MODELO DE SOBRECARGA VOLUMÉTRICA EM RATOS?**”, sob a responsabilidade de **PATRICIA FIDELIS DE OLIVEIRA GREGOLINI**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS** (CEUA), nesta data.

Botucatu, 21 de março de 2014.



Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano
Presidente da CEUA

Protocolo de coloração de Picro Sirius Red para cortes histológico de tecido cardíaco

O protocolo para coloração de Picro Sirius Red segue sistematizado nas etapas descritas abaixo:

- 1) Após os cortes do tecido cardíaco no micrótomo deixar as lâminas em uma estufa na temperatura de 60°C no período de 24 horas;
- 2) Realizar a bateria de Xilol e etanol para reidratação das lâminas seguindo a sequência abaixo e permanecendo 5 minutos em cada solução:
 - 1º) Xilol absoluto I;
 - 2º) Xilol absoluto II;
 - 3º) Xilol absoluto III;
 - 4º) Álcool absoluto /Xilol absoluto nas mesmas proporções;
 - 5º) Álcool absoluto I;
 - 6º) Álcool absoluto II;
 - 7º) Álcool absoluto III;
 - 8º) Álcool 95%;
 - 9º) Álcool 90%;
 - 10º) Álcool 80%;
 - 11º) Álcool 70%;

- 3) Após a bateria de reidratação, colocar os cortes em água (torneira) e deixar por 5 minutos.
- 4) Colocar as lâminas em ácido pícrico e deixar imerso por 30 minutos;
- 5) Na sequência colocar o corante Picro Sirius Red e deixar imerso por 1 minuto; (Obs: não precisa lavar os cortes entre o ácido pícrico e o corante);
- 6) Após coloração, lavar em água de torneira realizando 3 rápidas imersões, sempre tomando cuidado para que os cortes não se soltem da lâminas;
- 7) Depois passar os cortes pela bateria de desidratação para montagem deixando as lâminas por 1 minuto em cada solução:
 - 1º) Álcool 70%;
 - 2º) Álcool 80%;
 - 3º) Álcool 90%;
 - 4º) Álcool absoluto III;
 - 5º) Álcool absoluto II;
 - 6º) Álcool absoluto I;
 - 7º) Álcool absoluto/Xilol absoluto nas mesmas proporções;
 - 8º) Xilol absoluto I;
 - 9º) Xilol absoluto II;
 - 10º) Xilol absoluto III;

- 8) Em seguida realizar a montagem da lâmina utilizando meio de montagem entellan e lamínula;
- 9) Aguardar secar e visualizar em microscópio.