

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

FUNÇÃO CARDÍACA DE CÃES SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE
CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS EM DOIS MODELOS EXPERIMENTAIS
DE CARDIOMIOPATIA

Pós-graduando: Marlos Gonçalves Sousa
Orientador: Prof. Dr. Aparecido Antonio Camacho

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias –
UNESP, Campus de Jaboticabal, como
parte das exigências para obtenção do
título de Doutor em Medicina Veterinária
(área de concentração em Clínica Médica
Veterinária).

Jaboticabal – SP – Brasil
Julho, 2007

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARLOS GONÇALVES SOUSA – filho de José A. de Araújo Sousa e Maria Rosimeire Gonçalves Souto, nascido em 2 de Outubro de 1978 na cidade de Miracema, atual estado do Tocantins. Em Janeiro de 2001, tornou-se Médico Veterinário pela Universidade Federal do Tocantins. Em seguida, participou do programa de residência em Clínica Médica de Pequenos Animais, oferecido pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Jaboticabal, tendo desenvolvido os níveis R₁ e R₂ no período de Fevereiro de 2001 a Janeiro de 2003. Durante este mesmo período, também participou do programa de Fellowship em Cardiologia Veterinária em Cornell University, Estados Unidos. Em Fevereiro de 2003, iniciou o curso de Mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração em Clínica Médica Veterinária, junto à FCAV-UNESP, tendo defendido a dissertação “Ecodopplercardiografia de cães submetidos ao teste de estresse com dobutamina, em diferentes modelos experimentais de cardiomiopatia” em 18 de Março de 2004, 13 meses após o ingresso no curso. No mesmo mês, ingressou no programa de Doutorado em Medicina Veterinária, área de concentração em Clínica Médica Veterinária, da mesma instituição. Desde Maio de 2006 é Professor Assistente da disciplina de Clínica Médica de Pequenos Animais na Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal do Tocantins, campus de Araguaína.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem-estar
Animal da FCAV-UNESP (protocolo 1538-06).

“Faça o que pode, com o que tem, onde estiver”

Roosevelt

A todos que contribuíram para a execução deste trabalho

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida com saúde;

À minha família, especialmente à minha mãe, por todo o amor e suporte;

À minha esposa Roberta pelo amor, paciência e também por toda ajuda durante o experimento;

Ao meu orientador, professor Aparecido Antonio Camacho, pelo convite, orientação e oportunidade de realizar este trabalho. Acima de tudo, agradeço por todos os anos de aprendizado.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias e ao programa de pós-graduação em Medicina Veterinária pela oportunidade;

Aos meus queridos amigos Gláucia, Daniel, João Paulo e Tatiana. Vocês foram fundamentais em todas as etapas deste estudo e agora dividem comigo todos os méritos desta realização! Serei eternamente grato por toda ajuda e, principalmente, pela amizade verdadeira de vocês!

Aos demais integrantes do serviço de cardiologia. Em especial à amiga Alda pela convivência, mesmo que por pouco tempo;

À acadêmica Denise Alves pela inestimável ajuda com os cães com cardiomiopatia induzida pela doxorubicina;

Ao professor César Éspér pela possibilidade de utilizar o Laboratório de Reprodução Animal para realizar a separação das células-tronco;

À funcionária Roberta do Laboratório de Reprodução pela ajuda e cooperação prestadas durante o processo de separação celular;

Ao professor Áureo Evangelista Santana pela disponibilização do Laboratório de Patologia Clínica para avaliação dos animais;

Ao funcionário Eugênio Campos Filhos pelo processamento dos exames de rotina dos cães incluídos no estudo e pelas inúmeras contagens celulares feitas durante o processo de separação celular;

Ao professor Newton Nunes por disponibilizar sua equipe e equipamentos. Aos amigos do Serviço de Anestesiologia Veterinária Celina, Danielli, Patrícia e Roberta

pelo papel fundamental na anestesia dos animais ao longo do processo de colheita da medula óssea e transplante intracoronariano;

Às funcionárias Maria Luísa e Flávia pela disponibilidade em ajudar nos horários complicados de realização dos experimentos;

À professora Rosângela Zacarias Machado, pela realização das imunofluorescências dos cães chagásicos;

Ao professor Radovan Borojevic da Universidade Federal do Rio de Janeiro e ao Dr. Hans Fernando Dohmann do Hospital Pró-cardíaco pela disponibilização de sua equipe de pesquisa para a realização deste estudo pioneiro em animais;

Ao Hospital Pró-cardíaco do Rio de Janeiro, na pessoa do Dr. Hans Fernando Dohmann, pela viabilização do angiógrafo em arco, aparelho este imprescindível para a realização das angiografias e cateterizações coronarianas;

Aos biólogos Isabella Assis e Hélio Menezes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pelo inestimável auxílio no processo de separação celular;

Aos médicos João Alexandre Assad e Fábio Turci do Hospital Pró-cardíaco do Rio de Janeiro, pela ajuda fundamental no procedimento de cateterização coronariana, sem a qual a realização deste estudo não teria sido possível;

A todos os amigos de Jaboticabal. São inúmeros... todos importantíssimos para mim. Não vou citar nomes, pois seria outra tese...

A todos os professores, funcionários, residentes e pós-graduandos que integram a comunidade acadêmica do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel da UNESP-Jaboticabal pela amizade e apoio durante este período;

Ao Cláudio Alves, Lúcia Carareto e suas filhas pela calorosa recepção em Jaboticabal;

Aos professores Áureo Evangelista Santana, José Jurandir Fagliari, Júlio Carlos Canola e Mirela Tinucci Costa pelas valiosas considerações apresentadas durante o Exame Geral de Qualificação;

Aos professores James Newton B. M. de Andrade, José Jurandir Fagliari, Rosângela de Oliveira Alves e Wagner Luís Ferreira pelas criteriosas contribuições apresentadas durante a defesa desta tese;

Àqueles que nos oferecem sua amizade sem nada pedir em troca: os animais. Em especial aos cães que involuntariamente permitiram o desenvolvimento desta pesquisa.

A todos aqueles que colaboraram de alguma forma com a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

| | Página |
|--|--------|
| Lista de Abreviaturas | xi |
| Lista de Tabelas | xiii |
| Lista de Figuras | xv |
| Lista de Apêndices | xix |
| RESUMO | xx |
| ABSTRACT | xxi |
| | |
| <u>Capítulo I</u> – REVISÃO DE LITERATURA | |
| 1. INTRODUÇÃO | 2 |
| 2. CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA | 3 |
| 3. CARDIOMIOPATIA INDUZIDA PELA DOXORRUBICINA | 5 |
| 4. TERAPIA COM CÉLULAS-TRONCO | 8 |
| 5. REFERÊNCIAS | 12 |
| | |
| <u>Capítulo II</u> – FUNÇÃO CARDÍACA DE CÃES COM CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS | |
| 1. INTRODUÇÃO | 21 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS | 23 |
| 2.1. Local de realização da pesquisa | 23 |
| 2.2. Animais | 23 |
| 2.2.1. Indução da cardiomiopatia chaagásica | 24 |
| 2.3. Terapia com células-tronco | 25 |
| 2.3.1. Colheita da medula óssea | 25 |
| 2.3.2. Separação das células-tronco | 26 |
| 2.3.3. Transplante das células-tronco | 28 |
| 2.4. Avaliação dos animais | 30 |
| 2.4.1. Eletrocardiografia | 30 |
| 2.4.2. Pressão arterial | 31 |
| 2.4.3. Ecocardiografia | 31 |
| 2.5. Momentos de avaliação | 33 |
| 2.6. Análise Estatística | 34 |

| | |
|---|----|
| 3. RESULTADOS | 35 |
| 3.1. Preparo das células-tronco | 35 |
| 3.2. Transplante das células-tronco | 35 |
| 3.3. Óbitos | 38 |
| 3.4. Eletrocardiografia | 38 |
| 3.5. Pressão arterial | 38 |
| 3.6. Ecodopplercardiografia | 39 |
| 4. DISCUSSÃO | 53 |
| 5. CONCLUSÕES | 59 |
| 6. REFERÊNCIAS | 60 |
| | |
| <u>Capítulo III</u> – FUNÇÃO CARDÍACA DE CÃES COM CARDIOMIOPATIA INDUZIDA PELA DOXORRUBICINA SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS | |
| 1. INTRODUÇÃO | 68 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS | 70 |
| 2.1. Local de realização da pesquisa | 70 |
| 2.2. Animais | 70 |
| 2.2.1. Indução da cardiomiopatia pela doxorubicina | 71 |
| 2.3. Terapia com células-tronco | 71 |
| 2.3.1. Colheita da medula óssea | 72 |
| 2.3.2. Separação das células-tronco | 72 |
| 2.3.3. Transplante das células-tronco | 74 |
| 2.4. Avaliação dos animais | 77 |
| 2.4.1. Eletrocardiografia | 77 |
| 2.4.2. Pressão arterial | 77 |
| 2.4.3. Ecodopplercardiografia | 78 |
| 2.5. Momentos de avaliação | 80 |
| 2.6. Análise Estatística | 81 |
| 3. RESULTADOS | 83 |
| 3.1. Indução da cardiomiopatia dilatada com doxorubicina | 83 |
| 3.2. Preparo das células-tronco | 83 |
| 3.3. Transplante das células-tronco | 83 |
| 3.4. Óbitos | 83 |

| | |
|-----------------------------|-----|
| 3.5. Eletrocardiografia | 84 |
| 3.6. Pressão arterial | 84 |
| 3.7. Ecodopplercardiografia | 86 |
| 4. DISCUSSÃO | 113 |
| 5. CONCLUSÕES | 121 |
| 6. REFERÊNCIAS | 122 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------|---|
| CAM | Concentração alveolar mínima |
| CMD | Cardiomiopatia dilatada |
| DIVED | Diâmetro interno do ventrículo esquerdo na diástole |
| DIVEs | Diâmetro interno do ventrículo esquerdo na sístole |
| DP | Desvio padrão |
| ECG | Eletrocardiograma |
| EPLVEd | Espessura da parede livre do ventrículo esquerdo na diástole |
| EPLVEs | Espessura da parede livre do ventrículo esquerdo na sístole |
| ESIVd | Espessura do septo interventricular na diástole |
| ESIVs | Espessura do septo interventricular na sístole |
| FC | Frequência cardíaca |
| FCAV | Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias |
| FEC | Fração de encurtamento |
| FEJ | Fração de ejeção |
| HVGLN | Hospital Veterinário Governador Laudo Natel |
| IC | Índice cardíaco |
| IE | Índice de ejeção |
| IEPd | Índice de estresse da parede miocárdica ao final da diástole |
| IEPs | Índice de estresse da parede miocárdica ao final da sístole |
| ITEI | Índice de performance miocárdica de Tei |
| PAD | Pressão arterial diastólica |
| PAM | Pressão arterial média |
| PAS | Pressão arterial sistólica |
| PLVE | Espessamento fracional da parede livre do ventrículo esquerdo |
| Pms | Duração da onda P |
| PmV | Amplitude da onda P |
| PPE | Período de pré-ejeção |
| PRms | Duração do intervalo entre as ondas P e R |
| PVAO | Pico de velocidade do fluxo trans-aórtico |
| PVMA | Pico de velocidade da onda A do fluxo mitral |
| PVME | Pico de velocidade da onda E do fluxo mitral |
| PVPUL | Pico de velocidade do fluxo trans-pulmônico |

| | |
|-------|---|
| PVTA | Pico de velocidade da onda A do fluxo tricúspide |
| PVTE | Pico de velocidade da onda E do fluxo tricúspide |
| QRSms | Duração do complexo QRS |
| QTms | Duração do intervalo QT |
| RmV | Amplitude da onda R |
| SIV | Espessamento fracional do septo interventricular |
| SSPE | Separação septal do ponto E da valva mitral |
| TEVE | Tempo de ejeção ventricular esquerda |
| TRIV | Tempo de relaxamento isovolumétrico |
| UNESP | Universidade Estadual Paulista |
| VMEF | Velocidade média de encurtamento circunferencial das fibras |

LISTA DE TABELAS

| <u>Capítulo II</u> | Página |
|---|--------|
| Tabela 1 – Parâmetros determinados durante o processo de separação das células mononucleares de cães chagásicos crônicos. Unesp, Jaboticabal, SP (2007)..... | 36 |
| Tabela 2 – Alterações eletrocardiográficas e procedimentos realizados durante a cateterização coronariana direita e o transplante das células-tronco autólogas em cães chagásicos crônicos (n=5). Unesp, Jaboticabal, SP (2007)..... | 37 |
| Tabela 3 – Parâmetros eletrocardiográficos (média ± DP) em cães chagásicos crônicos (n=3) submetidos ao transplante intracoronariano de células-tronco hematopoiéticas autólogas. Unesp, Jaboticabal, SP (2007)..... | 40 |
| Tabela 4 – Pressão arterial sistólica, média e diastólica (média ± DP) em cães chagásicos crônicos (n=3) submetidos ao transplante intracoronariano de células-tronco hematopoiéticas autólogas. Unesp, Jaboticabal, SP (2007)..... | 40 |
| Tabela 5 – Parâmetros ecocardiográficos (média ± DP) obtidos pelo modo-M do ventrículo esquerdo em eixo transversal, plano cordal, em cães chagásicos crônicos (n=3) submetidos ao transplante intracoronariano de células-tronco hematopoiéticas autólogas. Unesp, Jaboticabal, SP (2007)..... | 44 |
| Tabela 6 – Parâmetros ecocardiográficos (média ± DP) obtidos pelo Doppler pulsado em cães chagásicos crônicos (n=3) submetidos ao transplante intracoronariano de células-tronco hematopoiéticas autólogas. Unesp, Jaboticabal, SP (2007)..... | 48 |
| <u>Capítulo III</u> | |
| Tabela 7 – Parâmetros avaliados durante o processo de separação das células mononucleares de cães com cardiomiopatia dilatada induzida pela doxorubicina (n=4). Unesp, Jaboticabal, SP (2007)..... | 85 |
| Tabela 8 – Parâmetros eletrocardiográficos (média ± DP) em cães ao longo da indução da cardiomiopatia dilatada pela doxorubicina (G1: n=3; G2: n=3). Unesp, Jaboticabal, SP (2007)..... | 90 |
| Tabela 9 – Parâmetros eletrocardiográficos (média ± DP) em cães com cardiomiopatia induzida pela doxorubicina submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas autólogas (G1; n=3) e cães controle (G2; n=3). Unesp, Jaboticabal, SP (2007)..... | 91 |
| Tabela 10 – Pressão arterial (média ± DP) em cães ao longo da indução da cardiomiopatia dilatada pela doxorubicina (G1: n=3; G2: n=3). Unesp, Jaboticabal, SP (2007)..... | 94 |

| | |
|--|-----|
| Tabela 11 – Pressão arterial (média ± DP) em cães com cardiomiopatia induzida pela doxorubicina submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas autólogas (G1; n=3) e cães controle (G2; n=3). Unesp, Jaboticabal, SP (2007)..... | 94 |
| Tabela 12 – Parâmetros ecocardiográficos (média ± DP) obtidos pelo modo-M do ventrículo esquerdo em eixo transversal, em cães submetidos a doses cumulativas de doxorubicina para indução de cardiomiopatia dilatada (G1: n=3; G2: n=3). Unesp, Jaboticabal, SP (2007)..... | 96 |
| Tabela 13 – Parâmetros ecocardiográficos (média ± DP) obtidos pelo modo-M do ventrículo esquerdo em eixo transversal em cães com cardiomiopatia induzida pela doxorubicina submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas autólogas (G1; n=3) e cães controle (G2; n=3). Unesp, Jaboticabal, SP (2007)..... | 97 |
| Tabela 14 – Índices ecocardiográficos (média ± DP) calculados a partir de parâmetros do modo-M em cães submetidos a doses cumulativas de doxorubicina para indução de cardiomiopatia dilatada (G1: n=3; G2: n=3). Unesp, Jaboticabal, SP (2007)..... | 100 |
| Tabela 15 – Índices ecocardiográficos (média ± DP) calculados a partir de parâmetros do modo-M em cães com cardiomiopatia induzida pela doxorubicina submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas autólogas (G1; n=3) e cães controle (G2; n=3). Unesp, Jaboticabal, SP (2007)..... | 101 |
| Tabela 16 – Parâmetros ecocardiográficos (média ± DP) obtidos pelo Doppler pulsado, em cães submetidos a doses cumulativas de doxorubicina para indução de cardiomiopatia dilatada (G1: n=3; G2: n=3). Unesp, Jaboticabal, SP (2007)..... | 104 |
| Tabela 17 – Parâmetros ecocardiográficos (média ± DP) obtidos pelo Doppler pulsado em cães com cardiomiopatia induzida pela doxorubicina submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas autólogas (G1; n=3) e cães controle (G2; n=3). Unesp, Jaboticabal, SP (2007)..... | 105 |
| Tabela 18 – Índices ecocardiográficos (média ± DP) calculados a partir de parâmetros Doppler em cães submetidos a doses cumulativas de doxorubicina para indução de cardiomiopatia dilatada (G1: n=3; G2: n=3). Unesp, Jaboticabal, SP (2007)..... | 109 |
| Tabela 19 – Índices ecocardiográficos (média ± DP) calculados a partir de parâmetros Doppler em cães com cardiomiopatia induzida pela doxorubicina submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas autólogas (G1; n=3) e cães controle (G2; n=3). Unesp, Jaboticabal, SP (2007)..... | 110 |

LISTA DE FIGURAS

| <u>Capítulo II</u> | Página |
|---|--------|
| Figura 1 – Representação gráfica das médias \pm DP dos parâmetros eletrocardiográficos Pms, PmV, PRms e QRSms de cães chagásicos crônicos antes (M0) e após (M1 a M6) transplante de células-tronco hematopoiéticas autólogas. Unesp, Jaboticabal, SP (2007)..... | 41 |
| Figura 2 – Representação gráfica das médias \pm DP dos parâmetros eletrocardiográficos RmV, QTms e FC de cães chagásicos crônicos antes (M0) e após (M1 a M6) transplante de células-tronco hematopoiéticas autólogas. Unesp, Jaboticabal, SP (2007)..... | 42 |
| Figura 3 – Representação gráfica das médias \pm DP das pressões arteriais de cães chagásicos crônicos antes (M0) e após (M1 a M6) transplante de células-tronco hematopoiéticas autólogas. Unesp, Jaboticabal, SP (2007)..... | 43 |
| Figura 4 – Representação gráfica das médias \pm DP dos parâmetros ecocardiográficos DIVEs, DIVEd, ESIVs e ESIVd de cães chagásicos crônicos antes (M0) e após (M1 a M6) transplante de células-tronco hematopoiéticas autólogas. Unesp, Jaboticabal, SP (2007)..... | 45 |
| Figura 5 – Representação gráfica das médias \pm DP dos parâmetros ecocardiográficos EPLVEs, EPLVEd, SIV e PLVE de cães chagásicos crônicos antes (M0) e após (M1 a M6) transplante de células-tronco hematopoiéticas autólogas. Unesp, Jaboticabal, SP (2007)..... | 46 |
| Figura 6 – Representação gráfica das médias \pm DP dos parâmetros ecocardiográficos FEJ, FEC, IEPs e IEPd de cães chagásicos crônicos antes (M0) e após (M1 a M6) transplante de células-tronco hematopoiéticas autólogas. Unesp, Jaboticabal, SP (2007)..... | 47 |
| Figura 7 – Representação gráfica das médias \pm DP dos parâmetros ecocardiográficos PVPUL, PVAO, PVME e PVMA de cães chagásicos crônicos antes (M0) e após (M1 a M6) transplante de células-tronco hematopoiéticas autólogas. Unesp, Jaboticabal, SP (2007)..... | 49 |
| Figura 8 – Representação gráfica das médias \pm DP dos parâmetros ecocardiográficos PVTE, PVTA, PVME/PVMA e PVTE/PVTA de cães chagásicos crônicos antes (M0) e após (M1 a M6) transplante de células-tronco hematopoiéticas autólogas. Unesp, Jaboticabal, SP (2007)..... | 50 |

| | |
|---|----|
| Figura 9 – Representação gráfica das médias \pm DP dos parâmetros ecocardiográficos PPE, TEVE, PPE/TEVE e TRIV de cães chagásicos crônicos antes (M0) e após (M1 a M6) transplante de células-tronco hematopoiéticas autólogas. Unesp, Jaboticabal, SP (2007)..... | 51 |
| Figura 10 – Representação gráfica das médias \pm DP dos parâmetros ecocardiográficos VMEF, IE, IC e ITEI de cães chagásicos crônicos antes (M0) e após (M1 a M6) transplante de células-tronco hematopoiéticas autólogas. Unesp, Jaboticabal, SP (2007)..... | 52 |
| <u>Capítulo III</u> | |
| Figura 11 – Imagem ecocardiográfica ilustrativa da relação E:A mitral nos cães submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas autólogas (G1). (A) avaliação realizada imediatamente antes do transplante das células-tronco. Pode-se notar inversão da relação entre as ondas E e A do fluxo mitral; (B) observa-se a correção da relação E:A anteriormente invertida, em avaliação ecocardiográfica realizada no mesmo animal seis meses após o transplante autólogo..... | 89 |
| Figura 12 – Representação gráfica das médias \pm DP dos parâmetros eletrocardiográficos Pms, PmV, PRms, QRSms de cães ao longo da exposição a doses cumulativas de doxorrubicina (Dox0 a Dox210) e na evolução pós-transplante (M0 a M6) de células-tronco hematopoiéticas autólogas (G1) ou não (G2). Unesp, Jaboticabal, SP (2007)..... | 92 |
| Figura 13 – Representação gráfica das médias \pm DP dos parâmetros eletrocardiográficos RmV, QTms e FC de cães ao longo da exposição a doses cumulativas de doxorrubicina (Dox0 a Dox210) e na evolução pós-transplante (M0 a M6) de células-tronco hematopoiéticas autólogas (G1) ou não (G2). Unesp, Jaboticabal, SP (2007)..... | 93 |
| Figura 14 – Representação gráfica das médias \pm DP das pressões arteriais de cães ao longo da exposição a doses cumulativas de doxorrubicina (Dox0 a Dox210) e na evolução pós-transplante (M0 a M6) de células-tronco hematopoiéticas autólogas (G1) ou não (G2). Unesp, Jaboticabal, SP (2007)..... | 95 |
| Figura 15 – Representação gráfica das médias \pm DP dos parâmetros ecocardiográficos DIVEs, DIVEd, ESIVs e ESIVd de cães ao longo da exposição a doses cumulativas de doxorrubicina (Dox0 a Dox210) e na evolução pós-transplante (M0 a M6) de células-tronco hematopoiéticas autólogas (G1) ou não (G2). Unesp, Jaboticabal, SP (2007)..... | 98 |

| | |
|---|-----|
| Figura 16 – Representação gráfica das médias \pm DP dos parâmetros ecocardiográficos EPLVEs, EPLVEd e SSPE de cães ao longo da exposição a doses cumulativas de doxorubicina (Dox0 a Dox210) e na evolução pós-transplante (M0 a M6) de células-tronco hematopoiéticas autólogas (G1) ou não (G2). Unesp, Jaboticabal, SP (2007)..... | 99 |
| Figura 17 – Representação gráfica das médias \pm DP dos parâmetros ecocardiográficos SIV, PLVE e FEJ de cães ao longo da exposição a doses cumulativas de doxorubicina (Dox0 a Dox210) e na evolução pós-transplante (M0 a M6) de células-tronco hematopoiéticas autólogas (G1) ou não (G2). Unesp, Jaboticabal, SP (2007)..... | 102 |
| Figura 18 – Representação gráfica das médias \pm DP dos parâmetros ecocardiográficos FEC, IEPs e IEPd de cães ao longo da exposição a doses cumulativas de doxorubicina (Dox0 a Dox210) e na evolução pós-transplante (M0 a M6) de células-tronco hematopoiéticas autólogas (G1) ou não (G2). Unesp, Jaboticabal, SP (2007)..... | 103 |
| Figura 19 – Representação gráfica das médias \pm DP dos parâmetros ecocardiográficos PVPUL, PVAO e PVME de cães ao longo da exposição a doses cumulativas de doxorubicina (Dox0 a Dox210) e na evolução pós-transplante (M0 a M6) de células-tronco hematopoiéticas autólogas (G1) ou não (G2). Unesp, Jaboticabal, SP (2007)..... | 106 |
| Figura 20 – Representação gráfica das médias \pm DP dos parâmetros ecocardiográficos PVMA, PVTE e PVTA de cães ao longo da exposição a doses cumulativas de doxorubicina (Dox0 a Dox210) e na evolução pós-transplante (M0 a M6) de células-tronco hematopoiéticas autólogas (G1) ou não (G2). Unesp, Jaboticabal, SP (2007)..... | 107 |
| Figura 21 – Representação gráfica das médias \pm DP dos parâmetros ecocardiográficos PPE, TEVE e TRIV de cães ao longo da exposição a doses cumulativas de doxorubicina (Dox0 a Dox210) e na evolução pós-transplante (M0 a M6) de células-tronco hematopoiéticas autólogas (G1) ou não (G2). Unesp, Jaboticabal, SP (2007)..... | 108 |
| Figura 22 – Representação gráfica das médias \pm DP dos parâmetros ecocardiográficos PVME/PVMA, PVTE/PVTA, PPE/TEVE e VMEF de cães ao longo da exposição a doses cumulativas de doxorubicina (Dox0 a Dox210) e na evolução pós-transplante (M0 a M6) de células-tronco hematopoiéticas autólogas (G1) ou não (G2). Unesp, Jaboticabal, SP (2007)..... | 111 |

Figura 23 – Representação gráfica das médias \pm DP dos parâmetros ecocardiográficos IE, IC e ITEI de cães ao longo da exposição a doses cumulativas de doxorubicina (Dox0 a Dox210) e na evolução pós-transplante (M0 a M6) de células-tronco hematopoiéticas autólogas (G1) ou não (G2). Unesp, Jaboticabal, SP (2007).....

LISTA DE APÊNDICES

- Apêndice 1 – Resultado da reação de imunofluorescência indireta para os cães chagásicos crônicos. Diluições reagentes acima de 1:40 são consideradas positivas. Unesp – Jaboticabal, 2007.
- Apêndice 2 – Seqüência de procedimentos realizados para colheita da medula óssea dos cães. Com preparo cirúrgico da área, a agulha Rosenthal é introduzida paralelamente à crista ilíaca (A). Ao cessar a resistência da cortical óssea, o mandril é retirado (B) e inicia-se a aspiração da medula (C). Ao se concluir a colheita de quantidade satisfatória de medula, o mandril é recolocado na agulha (D) que, por sua vez, é imediatamente removida. Unesp – Jaboticabal, 2007.
- Apêndice 3 – Seqüência da separação das células-tronco: (A) NaCl 0,9% adicionado à medula óssea; (B) sobrenadante removido após centrifugação; (C) medula adicionada ao ficol; (D) camada de células mononucleares aspirado (seta); (E) filtragem do material resuspendido; (F) solução final. Unesp – Jaboticabal, 2007.
- Apêndice 4 – Seqüência de cateterização pela técnica de Seldinger: (A) incisão sobre a face interna do membro pélvico, expondo a artéria femoral; (B) pequena incisão longitudinal sobre a artéria femoral após colocação de fios de reparo; (C) posicionamento do dilatador/introdutor na artéria femoral; (D) introdução do cateter Judkins através do introdutor. Unesp – Jaboticabal, 2007.
- Apêndice 5 – Cateterização da artéria coronária esquerda: (A) cateter Judkins posicionado no seio coronariano (seta); (B) introdução da guia de arame no ramo interventricular paraconal da artéria coronária esquerda (seta); (C) introdução da guia de arame no ramo circunflexo da artéria coronária esquerda (seta); (D) posicionamento do cateter balão no ramo circunflexo da coronária esquerda (seta). Unesp – Jaboticabal, 2007.
- Apêndice 6 – Cateterização da artéria coronária direita: (A) cateter Judkins posicionado no óstio coronariano direito (seta); (B) seio coronariano e coronária direita contrastados (seta). Unesp – Jaboticabal, 2007.
- Apêndice 7 – Imagem ecocardiográfica utilizada para cálculo do índice de performance miocárdica de Tei. O intervalo A representa o tempo desde o término do enchimento ventricular esquerdo lento (onda A) até o início do enchimento ventricular esquerdo rápido (onda E) do ciclo cardíaco subsequente. Assim, engloba o TEVE e os tempos de contração e relaxamento isovolumétricos. Unesp – Jaboticabal, 2007.
- Apêndice 8 – Fórmulas matemáticas empregadas para determinação de algumas variáveis utilizadas no estudo.

FUNÇÃO CARDÍACA DE CÃES SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS EM DOIS MODELOS EXPERIMENTAIS DE CARDIOMIOPATIA

RESUMO – No trabalho em tela, avaliou-se o potencial terapêutico do transplante de células-tronco autólogas em dois modelos experimentais de cardiomiopatia. Na primeira parte, avaliou-se a função cardíaca de cães chagásicos crônicos submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas autólogas. Na segunda etapa, a terapia celular foi realizada em cães com cardiomiopatia dilatada induzida pela doxorubicina. Nas duas situações, as células-tronco foram obtidas da medula óssea, que foi coletada e, subseqüentemente, fracionada em gradiente de ficol. A seguir, as células mononucleares foram recuperadas, lavadas e diluídas para transplantação intracoronariana. A cateterização das coronárias foi realizada pela técnica de Seldinger e foram infundidas cerca de 60 milhões de células em cada animal. Ao longo de seis meses os cães foram avaliados mensalmente quanto aos parâmetros eletrocardiográficos, ecocardiográficos e de pressão arterial. Nos cães chagásicos poucos parâmetros se modificaram ao longo do período de avaliação, embora tenham sido observadas variações nos parâmetros ecocardiográficos PVAO, PPE, TRIV e ITEI. Com relação aos cães com cardiomiopatia induzida pela doxorubicina, o período pós-transplante foi caracterizado por variação importante nos parâmetros ecocardiográficos DIVEs, SSPE, IEPs, PPE, TRIV, ITEI, SIV, PLVE, FEJ, FEC, VMEF e IE, embora não tenham ocorrido alterações nas variáveis eletrocardiográficas e de pressão arterial. Os resultados mostraram evolução favorável da função sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo em ambos os modelos utilizados.

Palavras chave: angiogênese, lesão miocárdica, medicina regenerativa, angiografia, terapia celular.

CARDIAC FUNCTION OF DOGS SUBMITTED TO AUTOLOGOUS HEMATOPOIETIC
STEM CELL TRANSPLANTATION IN TWO EXPERIMENTAL MODELS OF
CARDIOMYOPATHY

ABSTRACT – This study was conceived to evaluate the therapeutic potential of autologous stem cells transplantation in two experimental models of cardiomyopathy. In the first part of the study, the cardiac function of dogs with chronic Chagas disease submitted to hematopoietic stem cell therapy was assessed. In the second part, cell therapy was carried out in dogs with doxorubicin-induced cardiomyopathy. In either situation, the animals included in the study underwent autologous bone marrow-derived stem cell transplantation into the coronary arteries. Bone marrow was aspirated and centrifuged in ficoll gradient. Mononuclear cells were collected, washed and diluted to permit intracoronary delivery. Coronary catheterization was accomplished with the Seldinger's technique, and approximately 60 million cells were transfused in each animal. Dogs were assessed for electrocardiographic, echocardiographic and blood pressure parameters for six months at monthly intervals. Dogs with Chagas disease showed improvement in only a few parameters during the period of study, although a significant variation was seen in the echo parameters PVAO, PPE, TRIV and ITEI. Regarding the dogs with doxorubicin-induced cardiomyopathy, the post-transplantation period was characterized by an important change in the echocardiographic parameters DIVEs, SSPE, IEPs, PPE, TRIV, ITEI, SIV, PLVE, FEJ, FEC, VMEF and IE, although no change was documented in the electrocardiographic and blood pressure measurements. Results showed enhancement of left ventricular systolic and diastolic functions in both experimental models.

Key words: angiogenesis, myocardial damage, regenerative medicine, angiography, cell therapy.

Capítulo I



REVISÃO DE LITERATURA

1. INTRODUÇÃO

O termo cardiomiopatia refere-se à disfunção primária ou secundária do miocárdio, na ausência de doença valvar primária ou doença cardíaca congênita. Trata-se de uma desordem que afeta tanto cães como gatos, resultando numa séria disfunção sistólica e/ou diastólica e insuficiência cardíaca congestiva. Dentre as cardiomiopatias, as de maior importância clínica em animais são a cardiomiopatia dilatada, a cardiomiopatia hipertrófica e a cardiomiopatia restritiva (ATKINS & SNYDER, 1991; CAMACHO, 2001).

A cardiomiopatia dilatada (CMD) ocorre em uma grande variedade de mamíferos e espécies aviárias, tendo sido reportado o primeiro caso em cães em 1970 (ETTINGER et al., 1970). Existe demonstração de deficiência de concentração de carnitina miocárdica em alguns cães que sofrem da doença, assim como outros podem desenvolver CMD como seqüela da miocardite causada por agentes infecciosos, como o Parvovirus, o *Trypanosoma cruzi* (Doença de Chagas), além de outros agentes, como a *Borrelia burgdorferi*, Morbillivirus (vírus da Cinomose) e *Toxoplasma gondii*. Outras causas podem incluir isquemia do miocárdio, infarto aterosclerótico das coronárias, toxinas (gossipol, por exemplo), doenças imunomediadas e administração de fármacos, como a doxorubicina. Além dessas, algumas endocrinopatias, como o hipotireoidismo e o diabetes mellitus, também tem sido associadas à disfunção miocárdica em cães, bem como desordens infiltrativas, como neoplasias, doenças de estoque do glicogênio e amiloidose. Quando sua etiologia não pode ser determinada, a enfermidade é dita idiopática e seu prognóstico é mais desfavorável (ALLWORTH et al., 1995; CAMACHO, 2001; SILVA, 2001).

A CMD é caracterizada por insuficiência miocárdica sistólica e subsequente dilatação biventricular progressiva. Embora o dano miocárdico primário seja refletido como perda da capacidade contrátil, isto é, insuficiência sistólica, sabe-se

que a disfunção diastólica coexiste e pode, até mesmo, preceder a referida disfunção sistólica (KEENE, 1989; SISSON et al, 2000).

2. CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA

Um tipo característico de cardiomiopatia é aquela causada pela tripanosomíase sul-americana, popularmente denominada doença de Chagas. Esta enfermidade é uma zoonose causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, hemoflagelado transmitido pelo repasto sanguíneo realizado pelos vetores (barbeiros) pertencentes à ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae (CHAGAS, 1909abc; WHO, 1974).

Apenas na América Latina, cerca de 17 milhões de pessoas e equivalente número de animais domésticos e silvestres estão infectados pelo *Trypanosoma cruzi*, resultando em desordens cardíacas, musculares e neurológicas progressivas em aproximadamente um terço da população humana infectada (BASOMBRIIO et al., 1993). Em estudo de Dias (1987) estimou-se que aproximadamente cinco milhões pudessem estar contaminadas no Brasil. Desse total, acreditava-se que pelo menos 20% apresentariam a cardiopatia crônica e por volta de 10% manifestariam complicações digestivas. Embora importantes medidas de controle da enfermidade venham sendo realizadas desde então, acredita-se que três milhões de pessoas sejam, atualmente, portadoras da doença de Chagas no país (FIOCRUZ, 2006).

A infecção dos indivíduos freqüentemente ocorre na primeira década de vida. Entretanto, as síndromes de envolvimento visceral orgânico comumente manifestam-se decorridos vários anos, sendo relacionadas à cardiomegalia, insuficiência cardíaca, alterações na condução elétrica e na fase de repolarização. Como resultado, ocorre acentuada redução da duração média de vida, além do risco constante de morte súbita em qualquer estágio da doença (WHO, 1974; AMORIM et al., 1982; ROSSI, 1994).

Clinicamente, a doença de Chagas é subdividida em fases aguda, crônica assintomática e crônica cardíaca e/ou digestiva. Na fase aguda em seres humanos, o grau de envolvimento do miocárdio varia desde formas leves, assintomáticas ou com

poucas manifestações clínicas, até formas graves, eventualmente fatais, que constituem cerca de 3-5% dos casos. As lesões são disseminadas e podem atingir vários órgãos ou sistemas, apesar das conseqüências fisiopatológicas mais importantes estarem relacionadas ao coração e ao sistema nervoso central. A duração da fase crônica assintomática é longa, variando de cinco a 30 anos em seres humanos, após a qual o paciente pode desenvolver a fase crônica cardíaca e/ou digestiva, que pode ser assintomática ou caracterizada por distúrbios do ritmo cardíaco. Nos estágios intermediários, as manifestações clínicas se intensificam, podendo ser detectado aumento do coração de grau leve a moderado; nos estágios finais, pode haver um acentuado aumento do coração com insuficiência cardíaca congestiva, fenômenos tromboembólicos e arritmias graves (RAMOS, 1987; ROSSI, 1994).

O diagnóstico da doença pode ser realizado empregando-se testes sorológicos, tais como a reação de imunofluorescência indireta, a qual detecta a presença de anticorpos IgG anti-T.cruzi, utilizando formas epimastigotas de T. cruzi, cepa Y, obtidas a partir de cultura em meio líquido-LIT (FERREIRA & ÁVILA, 1994).

Desde a sua descoberta por Carlos Chagas em 1909, a realização de estudos em animais artificial ou naturalmente infectados permitiram a obtenção de maiores conhecimentos sobre o T. cruzi e suas manifestações clínicas. Como modelo experimental da doença da Chagas, animais reproduzem a forma aguda da infecção seguida por intervalos mais ou menos longos da forma crônica assintomática e, posteriormente, ocorre manifestação das formas crônicas cardíaca e/ou digestiva, sendo possível acompanhar o desenvolvimento da cardiopatia chagásica desde a fase aguda até a fase crônica final, enquanto no ser humano, na maioria dos casos, só é possível o conhecimento dos estágios terminais (LARANJA & ANDRADE, 1980; WHO, 1984).

Apesar da cardiopatia chagásica ser amplamente estudada em sua forma crônica em seres humanos, sua patogênese ainda permanece incerta, não existindo consenso quanto aos mecanismos fisiopatológicos exatos que levam à sua expressão clínica (ROSSI, 1994; SCALABRINI et al., 1996).

No modelo experimental em cães é possível observar o desenvolvimento espontâneo da insuficiência cardíaca congestiva, arritmias e miocardite difusa, após um período prolongado da infecção crônica assintomática. Contudo, exceto pelo estudo de PASCON (2007) que avaliou cães chagásicos ao longo de oito anos, ainda existe pouca informação acerca da fase crônica da doença nesta espécie (LARANJA & ANDRADE, 1980; OLIVEIRA-ALVES, 2003).

Com o intuito de determinar o grau de comprometimento miocárdico, acompanhar sua evolução, estabelecer o prognóstico dos pacientes, inclusive identificando aqueles predispostos à morte súbita pela ocorrência de distúrbios do ritmo cardíaco, bem como orientar o tratamento, tem sido indicada a realização de exames complementares na cardiopatia chagásica, tais como eletrocardiograma, radiografia de tórax, além do ecocardiograma, o qual constitui método de grande utilidade para o diagnóstico e controle da evolução da doença, devido à sua expressiva sensibilidade, rapidez de execução e caráter não invasivo, podendo, inclusive, revelar alterações funcionais do miocárdio mesmo em pacientes chagásicos sem alterações radiográficas e eletrocardiográficas (ACQUATELLA et al., 1980; OLIVEIRA, et al., 1983).

3. CARDIOMIOPATIA INDUZIDA PELA DOXORRUBICINA

A doxorubicina é um antibiótico isolado a partir do fungo *Streptomyces peucetis* var. *caesius*, identificado em 1969 e que desde então, é amplamente utilizado tanto na oncologia médica quanto veterinária. Seu mecanismo de ação baseia-se na intercalação com o DNA, ligação a cátions divalentes e desencadeamento de reações de oxidorredução. É provável que a propriedade citotóxica mais importante seja a capacidade de se intercalarem entre os pares de nucleotídeos da dupla-hélice do DNA, modificando a estrutura do cromossomo e causando bloqueio da síntese de DNA, RNA e proteínas e, conseqüentemente, impedindo a replicação celular. Apesar de atuar durante todo o ciclo celular, a doxorubicina apresenta o maior efeito citotóxico durante a fase S (fase de síntese do DNA). Devido suas propriedades citotóxicas e ao desenvolvimento de cardiomiopatia iatrogênica relacionada à dose total utilizada, é

utilizado de modo limitado (SUSANECK, 1983; DAL FARRA et al., 1995; GANZ et al., 1996; HERSHKO et al., 1996; JACOBS, 1996; DEFRANCESCO & HAUCK, 2000; SILVA & CAMACHO, 2005; SOUZA & CAMACHO, 2006).

A metabolização da doxorubicina ocorre primariamente no fígado através da aldocetorreductase e glicosidases microsossomais. Seu principal metabólico é o doxorubicinol, que também apresenta algum efeito tumoricida, embora existam outros metabólitos de menor importância. Em relação à sua excreção, uma pequena quantidade da doxorubicina é eliminada de forma inalterada pela urina, porém a maior parte é excretada como metabólitos na bile e fezes (GANZ et al., 1996; TOYODA et al., 1998; TJEERDSMA et al., 1999; DIAS et al., 2003).

Por não ser absorvida pelo trato gastrointestinal, a doxorubicina é administrada exclusivamente por via intravenosa, sendo então amplamente distribuída por todos os tecidos, com exceção do sistema nervoso central. Trata-se de uma substância com amplo espectro de ação contra carcinomas e sarcomas, especialmente linfomas e osteossarcomas em medicina veterinária, mas em seres humanos vem sendo utilizada na terapia do câncer de mama, de pulmão, leucemias, linfomas e sarcomas. Com o desenvolvimento da oncologia veterinária, o uso da doxorubicina tornou-se cada vez mais comum, dados os bons resultados no tratamento de diversas neoplasias (SUSANECK, 1983; GANZ et al., 1996; TOYODA et al., 1998; TJEERDSMA et al., 1999; DIAS et al., 2003).

Embora possa ser eficaz no tratamento de diversas neoplasias, o uso da doxorubicina é relativamente limitado pelo desenvolvimento da cardiomiopatia degenerativa dose-dependente. Em seres humanos, o risco de ocorrência de cardiomiopatia grave aumenta se a dose cumulativa máxima de 550 mg/m^2 for excedida. Diversos estudos conduzidos em animais de companhia têm demonstrado que a dose cumulativa tóxica é bem inferior àquela conhecida em humanos. Para fins terapêuticos em cães, a doxorubicina é utilizada na dose de 30 mg/m^2 , aplicado lentamente por via intravenosa, a cada três ou nove semanas, sendo recomendado não exceder a dose de 240 mg/m^2 . Em gatos, é utilizada na dose de 20 a 25 mg/m^2 a cada três semanas, recomendando-se não ultrapassar a dose cumulativa de 90 mg/m^2 .

(SUSANECK, 1983; PASTORINO et al., 1989; PRICE et al., 1991; BERG et al., 1995; DIAS et al., 2003; SOUZA, 2004; SILVA & CAMACHO, 2005; SOUZA & CAMACHO, 2006).

A cardiomiopatia induzida pela doxorrubicina decorre da formação de radicais livres, que levam a reações de peroxidação. Assim, a liberação de superóxidos propicia a conversão dos ácidos graxos insaturados da membrana celular miocárdica em peróxidos lipídicos. Estes, por sua vez, inibem a biossíntese da coenzima Q₁₀ e da enzima sódio-potássio-adenosinatrifosfatase, resultando em alterações estruturais no miócito, incluindo a formação de vacúolos, degeneração das mitocôndrias, perda dos miofilamentos e atrofia progressiva das miofibrilas. Adicionalmente, sabe-se que a doxorrubicina desencadeia a liberação de outros mediadores inflamatórios, tais como a histamina, metabólitos do ácido araquidônico e o fator de ativação plaquetário, os quais podem favorecer a progressão das lesões nos miócitos. Tais alterações miocárdicas são consideradas cumulativas e não-reversíveis, resultando em dilatação cardíaca, perda da capacidade contrátil e remodelamento do músculo cardíaco (SUSANECK, 1983; TOMLINSON et al., 1985; GANZ et al., 1996; TOYODA et al., 1998; TJEERDSMA et al., 1999).

A síndrome decorrente da cardiotoxicidade da doxorrubicina caracteriza-se por insuficiência cardíaca congestiva, hipotensão, anormalidades eletrocardiográficas, arritmias e, até mesmo, morte súbita. Dessa forma, logo após a administração do fármaco pode ocorrer toxicidade aguda, a qual é caracterizada por arritmias, sendo a taquicardia sinusal mais freqüentemente observada. Com doses cumulativas superiores a 240 mg/m², são observados sinais semelhantes àqueles verificados na CMD (TOMLINSON et al. 1985; DAL FARRA et al., 1995; SILVA, 2001; SOUZA, 2004; SILVA & CAMACHO, 2005).

Os efeitos tóxicos da doxorrubicina não se limitam às alterações cardíacas. De fato, as reações idiossincrásicas desencadeadas pelo uso desse agente antineoplásico podem ser agudas, de curta duração ou crônicas. Os efeitos tóxicos agudos ocorrem logo após a aplicação do fármaco, são transitórios e geralmente não estão relacionados à dose cumulativa do quimioterápico. Em geral, tais reações

idiossincrásicas incluem tremores, eritema cutâneo, hipotensão, vômito, anafilaxia e arritmias cardíacas. Os efeitos adversos de curta duração costumam se manifestar entre uma a duas semanas após a aplicação da doxorubicina e, em geral, estão relacionados à dose utilizada (ou à dose cumulativa). Podem incluir perda de peso, diarreia, vômito, anorexia, hipoplasia de medula óssea, atrofia linfóide e alopecia. As alterações hematológicas podem incluir anemia discreta, leucopenia e trombocitopenia, as quais se resolvem em até três semanas após a aplicação. Já os efeitos tóxicos crônicos da doxorubicina incluem alopecia, atrofia testicular e, principalmente, a toxicidade cardíaca (SUSANECK, 1983; GANZ et al., 1996; TOYODA et al., 1998; TJEERDSMA et al., 1999; DIAS et al., 2003; SOUZA, 2004; SILVA & CAMACHO, 2005).

4. TERAPIA COM CÉLULAS-TRONCO

O conceito de medicina regenerativa vem despertando grande interesse científico nos últimos tempos. A utilização de células-tronco autólogas tem ganhado importância e vem tornando-se realidade após experiências clínicas iniciais bem sucedidas no tratamento de doenças cardíacas.

Dados do Ministério da Saúde do Brasil apontam que os gastos do Sistema Único de Saúde com procedimentos cardiológicos de média e alta complexidade no ano de 2003 foram superiores a 774 milhões de reais. O mesmo ministério considera que uma vez estudada e implementada, a terapia celular poderá reduzir significativamente os gastos com tais procedimentos na prática médica (STRAUER & KORNOWSKI, 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

Células-tronco são células progenitoras de tecidos, ainda imaturas e que podem se diferenciar, substituindo células de inúmeros tecidos.

Do ponto de vista evolutivo, as células-tronco podem ser embrionárias ou adultas. As células-tronco embrionárias são oriundas da massa celular interna do blastocisto embrional, mas, por questões éticas, o potencial terapêutico destas células ainda não foi bem determinado. Dentre suas vantagens destaca-se o fato de serem

pluripotentes, o que permite que tais células se transformem virtualmente em todos os tipos celulares do organismo. Em seres humanos, por exemplo, já se demonstrou que células-tronco embrionárias podem se diferenciar em miócitos cardíacos (TOMITA et al., 1999; KEHAT et al., 2001; ORLIC et al., 2001; PITTENGER & MARSHAK, 2001; STRAUER & KORNOWSKI, 2003).

Por outro lado, as células-tronco adultas, também chamadas células-tronco somáticas mais recentemente, podem ser encontradas em tecidos como a medula óssea, sendo subdivididas em hematopoiéticas e mesenquimais. Na medula óssea humana, por exemplo, seu percentual é de aproximadamente 1 a 2% para as células-tronco hematopoiéticas e inferior a 0,05% para as mesenquimais. Apesar de serem encontradas em tecidos já formados, sua plasticidade provavelmente lhes permite dar origem a células diferentes do órgão original. Dessa forma, seria possível sua aplicação na repopulação de estruturas lesadas. Um ponto importante acerca da terapia com células-tronco adultas é a relativa inexistência de implicações éticas (MORRISON et al., 1997; TOMITA et al., 1999; KEHAT et al., 2001; ORLIC et al., 2001; PITTENGER & MARSHAK, 2001; PERIN et al., 2003; STRAUER & KORNOWSKI, 2003; DEL CARLO, 2005).

Especificamente com relação ao músculo cardíaco, as células-tronco, uma vez mobilizadas por citocinas e fatores estimuladores de colônia de granulócitos, tornam-se capazes de se implantar em áreas de infarto, sofrer replicação e diferenciação, podendo atuar como precursores do tecido muscular cardíaco, promovendo o reparo miocárdico. Em seres humanos, tanto células hematopoiéticas quanto mesenquimais podem atuar como precursoras do tecido muscular cardíaco e não simplesmente como precursores estromais. Entretanto, para que ocorra a diferenciação é necessário que as células-tronco se instalem no local apropriado. O mecanismo exato pelo qual o meio influencia nessa diferenciação celular ainda permanece incerto, mas acredita-se que o aumento da atividade funcional do órgão, associado aos mediadores farmacológicos e citocinas, possam promover e intensificar esse processo de diferenciação de células oriundas da medula óssea em miócitos cardíacos, passando a expressar proteínas contráteis específicas do músculo cardíaco

estriado (ORLIC et al., 2001; PITTENGER & MARSHAK, 2001; LAFLAMME et al., 2002; TOMA et al., 2002; STRAUER & KORNOWSKI, 2003).

Uma vez que as células-tronco podem virtualmente se diferenciar em inúmeros tipos celulares, a administração destas células em uma via apropriada ao órgão-alvo é extremamente desejável. Desta forma, pode-se obter altas concentrações de células-tronco na área de interesse. Para o coração especificamente, as células podem ser seletivamente administradas por via intracoronariana valendo-se de técnicas de cateterização. Este método pode ser utilizado em doenças cardíacas musculares, como no infarto agudo do miocárdio. A via intravenosa tem menor aplicabilidade, uma vez que esta técnica requer inúmeras passagens circulatórias até que uma mínima quantidade de células-tronco seja implantada no músculo cardíaco. Além disso, seus efeitos são limitados devido à atenuação decorrente da primeira passagem transpulmonar. As células também podem ser administradas pela via trans-endocárdica por meio de um cateter apropriado, permitindo melhor determinação anatômica da distribuição e dos sítios de aplicação. Esta técnica de aplicação de células-tronco utilizando-se de cateteres já se mostrou segura em seres humanos, necessitando apenas de anestesia local para permitir a passagem. Também apresenta como vantagens o curto tempo necessário para o desenvolvimento do procedimento, a possibilidade de aplicação de grande quantidade de células, possibilitando um maior aporte de células-tronco para o músculo cardíaco (KORNOWSKI et al., 2000; FUCHS et al., 2001; FUCHS et al., 2002; STRAUER et al., 2002; PERIN et al., 2003; STRAUER & KORNOWSKI, 2003).

Acredita-se que a diferenciação das células-tronco em um tipo específico de tecido não seja um evento pré-programado intrinsecamente. Na verdade, é bem possível que o processo de diferenciação celular seja desencadeado de acordo com o sítio e o ambiente local de alojamento de tais células após o procedimento de transplantação. Enfocando especificamente o sistema cardiovascular, é sabido que as células-tronco podem originar precursores de tecido muscular cardíaco, bem como células dos vasos coronarianos. No transplante de células-tronco adultas oriundas da medula óssea, é provável que tanto as células hematopoiéticas quanto as

mesenquimais participem no processo de reparação tecidual do miocárdio. As células-tronco hematopoiéticas podem dar origem às células endoteliais que, por sua vez, podem se diferenciar em células musculares cardíacas. Já as células-tronco mesenquimais podem originar miócitos cardíacos (MORRISON et al., 1997; PERIN et al., 2003; STRAUER & KORNOWSKI, 2003; DEL CARLO, 2005).

Vários mediadores químicos presentes em miocárdios lesados, incluindo citocinas, fator de células-tronco e fatores de crescimento, parecem contribuir com o processo de diferenciação das células-tronco derivadas da medula óssea em miócitos cardíacos. Conforme progride a diferenciação celular, as novas células passam a expressar as diversas proteínas contráteis do músculo cardíaco, tais como actina, miosina, desmina, fosfolambanos, de forma semelhante às células originais do miocárdio. É possível, ainda, que acentuadas atividades cronotrópica e inotrópica possam favorecer um ambiente adequado ao processo de diferenciação (MORRISON et al., 1997; PERIN et al., 2003; STRAUER & KORNOWSKI, 2003).

É interessante notar que o uso de uma fração de células mononucleares em detrimento do uso exclusivo das células-tronco pode favorecer a reparação tecidual. Desse modo, hemangioblastos podem participar na neovascularização, células mesodérmicas progenitoras podem se diferenciar em células endoteliais, e células endoteliais progenitoras podem se transdiferenciar em cardiomiócitos. Adicionalmente, células primitivas da medula óssea podem ser mobilizadas por citocinas e fatores celulares até regiões lesadas, onde poderão se replicar, diferenciar e promover reparo tecidual (MORRISON et al., 1997; PERIN et al., 2003; STRAUER & KORNOWSKI, 2003; DEL CARLO, 2005).

5. REFERÊNCIAS¹

ACQUATELLA, R. et al. Value of M-mode and two-dimensional echocardiography in chronic Chagas heart disease: a clinical and pathologic study. *Circulation*, Baltimore, v.62, p.787-799, 1980.

ALLWORTH, M.S. et al. Effect of enalapril in dogs with pacing-induced heart failure. *Am. J. Vet. Res.*, Schaumburg, v. 56, n. 1, p. 85-94, 1995.

AMORIM, D.S. et al. Chagas' heart disease as an experimental model for studies of cardiac autonomic function in man. *Mayo Clinic Proc.*, Rochester, v. 57, n. 1, p.48-51, 1982.

ATKINS, C.E.; SNYDER, P.S. Cardiomyopathy, In: ALLEN, D.G. et al. *Small animal medicine*. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1991. p. 269-297.

BASOMBRIO, M.A. et al. Field trial of vaccination against american trypanosomiasis (Chagas' disease) in dogs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Baltimore, v.49, n. 1, p. 143-151, 1993.

BERG, J. et al. Results of surgery and doxorubicin chemotherapy in dogs with osteosarcoma. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 206, n.10, p.1555-1560, 1995.

CAMACHO, A.A. Miocardiopatia chagásica en caninos. In.: BELENERIAN, G.C.; MUCHA, C.J.; CAMACHO, A.A. *Afecciones cardiovasculares en pequeños animales*, Buenos Aires: Inter-Médica, 2001. p. 179-183.

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.
NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. List of journals indexed in Index Medicus. Washington, 1997. 240p.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 1, n. 2, p. 159-218, 1909a.

CHAGAS, C. Uma nova tripanosomíase humana. Brasil Médico, Rio de Janeiro, v. 23, p. 175-176, 1909b.

CHAGAS, C. Nova espécie mórbida do homem produzida por um trypanosoma (*Trypanosoma cruzi*). Brasil Médico, Rio de Janeiro, v. 23, n. 16, p. 161-165, 1909c.

DAL FARRA.; M.C.T.; CAMACHO, A.A.; SANTANA, A.E. Study of cardiac toxicity in dogs treated with doxorubicin. *Ars Veterinaria*, v.11, n.1, p.6-16, 1995.

DEFRANCESCO, T.C.; HAUCK, M.L. What's new in doxorubicin-induced cardiotoxicity. In.: AMERICAN COLLEGE OF VETERINARY INTERNAL MEDICINE FORUM, 18., 2000, Seattle, Washington. Proceedings... p.121-122.

DEL CARLO, R.J. Células-tronco: células da esperança. *Revista CFMV*, v.11, n.35, p.60-68, 2005.

DIAS, J.C.P. Epidemiologia e controle da doença de Chagas no Brasil: panorama atual. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Rio de Janeiro, v. 20, n. 2, p. 155, 1987.

DIAS, M.A.; SANTANA, A.E.; SOBREIRA, M.R.F. et al. Study of an animal model of blood hypoplasia induced by the antineoplastic agent doxorubicin (*Adriablastina*). *Ars Veterinaria*, Jaboticabal, v.19, n.3, p.246-253, 2003.

ETTINGER, S.J.; BOLTON, G.R.; LORD, P.F. Idiopathic cardiomyopathy in the dog. *J.Am.Vet.Med.Assoc.*, Schaumburg, v. 156, p. 1225, 1970.

FERREIRA, A.W.; ÁVILA, S.L.M. Diagnóstico de laboratório da doença de Chagas. *Rev. Soc. Cardiol. Estado São Paulo*, São Paulo, v. 4, n. 2, p. 101-105, 1994.

FIOCRUZ, Simpósio internacional debate a descoberta de medicamentos para doenças negligenciadas. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2006. Disponível em <http://www.ioc.fiocruz.br/pages/informerede/corpo/noticia/2006/outubro/04_10_06_01.htm>. Acesso em: 05/nov/2006.

FUCHS, S. et al. Transendocardial delivery of autologous bone marrow enhances collateral perfusion and regional fuction in pigs with chronic experimental myocardial ischemia. *J. Am. Coll. Cardiol.*, v.37, p.1726-1732, 2001.

FUCHS, S. et al. Catheter-based autologous bone marrow myocardial injection in no-option patients with advanced coronary artery disease: a feasibility and safety study. *Circulation*, v.106 (suplemento 2), p.655-656, 2002.

GANZ, W.I.; SRIDHAR, K.S.; GANZ, S.S. et al. Review of tests for monitoring doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Oncology*, v.53, p.461-470, 1996.

HERSHKO, C.; PINSON, A.; LINK, G. Prevention of anthracycline cardiotoxicity by iron chelation. *Acta Haematologica*, v.95, p.87-92, 1996.

JACOBS, G.J. Secondary canine cardiomyopathies: their causes and characteristics. *Vet. Medicine*, v. 91, n.6, p.534-542, 1996.

KEENE, B.W. Canine Cardiomyopathy. In: KIRK, R.W.; BONAGURA, J.D. *Current veterinary therapy*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1989. p.240-251.

KEHAT, I. et al. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J. Clin. Invest.*, v.108, p407-414, 2001.

KORNOWSKI, R. et al. Delivery strategies to achieve therapeutic myocardial angiogenesis. *Circulation*, v.101, p.454-458, 2000.

LAFLAMME, M.A. et al. Evidence for cardiomyocyte repopulation by extracardiac progenitors in transplanted human hearts. *Circulation Res.*, v.90, p.634-640, 2002.

LARANJA, F.S.; ANDRADE, Z.A. Forma crônica cardíaca da doença de Chagas no cão. *Arq. Bras. Cardiol.*, São Paulo, v. 35, p. 377-380, 1980.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Considerações extraídas da reunião sobre pesquisas clínicas para terapia celular em cardiologia. Rio de Janeiro-RJ, Março, 2004.

MORRISON, S.J.; SHAH, N.M.; ANDERSON, D.J. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell*, v.88, p.287-298, 1997.

OLIVEIRA, J.S.M. et al. Cardiac thrombosis and thromboembolism in chronic chagas heart disease. *Am. J. Cardiol.*, v. 52, p. 147-151, 1983.

OLIVEIRA-ALVES, R. Avaliações ecodopplercardiográfica, eletrocardiográfica computadorizada e dinâmica (sistema Holter) e clínico-patológica em cães com cardiomiopatia chagásica experimental. 2003, 90f. Tese (Doutorado em Clínica Médica Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, Jaboticabal, São Paulo, 2003.

ORLIC, D. et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*, v.410, p.701-705, 2001.

PASCON, J.P.E. Avaliação clínica da cardiomiopatia chagásica crônica em cães. 2007, 84f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, Jaboticabal, São Paulo, 2007.

PASTORINO, N.C. et al. Single agent therapy with adriamycin for canine lymphosarcoma. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, v. 25, p.221-225, 1989.

PERIN, E.; GENG, Y.J.; WILLERSON, J. Adult stem cell therapy in perspective. *Circulation*, v.107, n.7, p.935-938, 2003.

PITTINGER, M.F.; MARSHAK, D.R. Mesenchymal stem cells of human adult bone marrow. In: MARSHAK, R. et al. *Stem cell biology*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. p.949-973.

PRICE, G.S. et al. Efficacy and toxicity of doxorubicin/cyclophosphamide maintenance therapy in dogs with multicentric lymphosarcoma. *J. Vet. Intern. Med.*, v.5, n.5, p.259-262, 1991.

RAMOS, C. P. Caracterização eletrocardiográfica e anátomo-patológica de cinco tipos de cardiopatias crônicas em ratos. 1987. 161f. Tese (Doutorado em Medicina) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1987.

ROSSI, M.A. Patogênese da miocardite chagásica crônica. *Rev. Soc. Cardiol. Estado São Paulo*, São Paulo, v. 4, n. 2, p. 85-91, 1994.

SCALABRINI, A. et al. Correlação clínico patológica na forma indeterminada da doença de chagas experimental do cão. *Arq. Bras. Cardiol.*, São Paulo, v. 67, n.6, p. 385-388, 1996.

SILVA, C.E.V. Estudo clínico da cardiotoxicidade induzida pelo tratamento crônico com doxorubicina (Adriblastina[®]) em cães. 2001, 111f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, Jaboticabal, São Paulo, 2001.

SILVA, C.E.V.; CAMACHO, A.A. Alterações ecocardiográficas em cães sob tratamento prolongado com doxorubicina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, n.3, p.300-306, 2005.

SISSON, D.D. et al. Primary myocardial disease in the dog. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. *Textbook of veterinary internal medicine*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2000. p. 874-895.

SOUZA, R.C.A. Avaliação neurohumoral e hemodinâmica de cães clinicamente normais submetidos ao tratamento com doxorubicina. 2004, 73f. Tese (Doutorado em Clínica Médica Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, Jaboticabal, São Paulo, 2004.

SOUZA, R.C.A.; CAMACHO, A.A. Neurohormonal, hemodynamic, and electrocardiographic evaluations of healthy dogs receiving long-term administration of doxorubicin. *Am. J. Vet. Res.*, v. 67, n. 8, p.1319-1325, 2006.

SUSANECK, S.J. Doxorubicin therapy in the dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.182, n.1, p.70-72, 1983.

STRAUER, B.E. et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation*, v.106, p.1913-1918, 2002.

STRAUER, B.; KORNOWSKI, R. Stem cell therapy in perspective. *Circulation*, v.107, n.7, p.929-934, 2003.

TJEERDSMA, G.; MEINARDI, M.T.; VAN DER GRAAF, W.T.A. et al. Early detection of anthracycline induced cardiotoxicity in asymptomatic patients with normal left ventricular systolic function: autonomic versus echocardiographic variables. *Heart*, v.81, n.4, p.419-423, 1999.

TOMA, C. et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*, v.105, p.93-98, 2002.

TOMITA, S. et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation*, v.100 (suplemento 2), p.247-256, 1999.

TOMLINSON, C.W. et al. Adriamycin cardiomyopathy: implication of cellular changes in a canine model with mild impairment of left ventricular function. *Biochemical Investigation*, v.34, n.22, p.4033-4041, 1985.

TOYODA, Y.; OKADA, M.; KASHEM, M.A. A canine model of dilated cardiomyopathy induced by repetitive intracoronary doxorubicin administration. *J. Thoracic Cardiovasc. Surg.*, v.115, n.6, p.1367-1373, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Immunology of Chagas' disease, v.50, n.5, p.479-481, 1974.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report of the Scientific Working group on the Development and Evaluation of Animals Models' disease. Geneva, 1984.

Capítulo II



FUNÇÃO CARDÍACA DE CÃES COM CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS

1. INTRODUÇÃO

Há algum tempo vem se discutindo acerca do potencial terapêutico das células-tronco na reparação do miocárdio lesado. Diversos estudos têm sugerido resultados benéficos sobre a função miocárdica e a perfusão coronariana (STRAUER et al., 2002). Entretanto, ainda não está claro se os efeitos obtidos decorrem do incremento da circulação colateral, de um efeito direto sobre a preservação miocárdica ou da diferenciação das células-tronco em miócitos funcionais (FUCHS et al., 2006).

O uso de células-tronco hematopoiéticas em experimentos de neovascularização tem sido reportado na literatura internacional já há algum tempo (ASAHARA et al., 2000; CARMELIET & LUTTUN, 2001; FUCHS et al., 2001). Especificamente em pacientes com comprometimento da função cardíaca, a implantação de tais células no miocárdio tem demonstrado melhora da contratilidade e da perfusão miocárdica (KAMIHATA et al., 2001; SHAKE et al., 2002; TOMITA et al., 2002).

Em seres humanos portadores de doença de Chagas, os dados mostram que o transplante de células-tronco hematopoiéticas autólogas por via intracoronariana se traduz em resultados benéficos na melhora da capacidade de exercitação do paciente, na qualidade de vida e, inclusive, nos parâmetros de avaliação da função cardíaca (VILAS-BOAS et al., 2004; VILAS-BOAS et al., 2006).

Considerando-se os resultados promissores da terapia celular sobre a função cardíaca de seres humanos, objetivou-se, com este estudo, determinar os efeitos do transplante de células-tronco hematopoiéticas autólogas em cães com cardiomiopatia chagásica crônica experimental, avaliando-se as alterações

desencadeadas sobre os parâmetros eletrocardiográficos, ecodopplercardiográficos e de pressão arterial, bem como as eventuais complicações existentes ao longo do procedimento.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local da realização da pesquisa

O experimento foi conduzido nos Laboratórios de Cardiologia, Patologia Clínica e Reprodução Animal do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” (HVGLN) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista – Unesp – campus de Jaboticabal – SP.

2.2. Animais

Foram utilizados cinco cães adultos, sem raça definida, fêmeas, com peso médio de 11,6 Kg, portadores de Doença de Chagas em sua fase crônica assintomática, provenientes do Laboratório de Cardiologia do HVGLN da FCAV – Unesp, os quais foram previamente inoculados com *Trypanosoma cruzi*, cepa Colombiana.

Os cães receberam imunoprofilaxia¹ contra parvovirose, coronavirose, hepatite, leptospirose, parainfluenza, cinomose e raiva, além de vermifugação² antes do início do protocolo experimental. No mesmo período, também foram condicionados ao ambiente experimental, por meio de visitas à sala de ecocardiografia.

Além disso, todos os animais receberam, diariamente, ração comercial³ para cães e água à vontade, assim como foram avaliados a fim de se verificar ingestão alimentar e hídrica. Periodicamente realizaram-se exames físicos e laboratoriais nos animais incluídos no estudo.

¹ Vanguard® HTLP 5/CV L e Defensor® – Pfizer – Guarulhos – SP.

² Panacur Plus® – Intervet – São Paulo – SP.

³ Friskies Alpo® – Nestlé Purina – São Paulo – SP.

2.2.1. Indução da cardiomiopatia chagásica

A amostra do *Trypanosoma cruzi* utilizada (cepa Colombiana) foi mantida em camundongos albinos do Departamento de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e, através de punção intracardíaca, o sangue do camundongo foi colhido com auxílio de seringa e agulha descartáveis contendo citrato de sódio, sendo, então, mantido em frasco adequado e transportado em caixa de isopor contendo gelo (KLEIN, 1995; CAMACHO et al., 2000; OLIVEIRA-ALVES, 2003).

Os cães foram inoculados por via intraperitoneal com 1.000 tripomastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi* por quilograma de peso vivo, dose esta ideal para produzir a fase crônica indeterminada ou assintomática (CAMACHO et al., 1994). A contagem do número de tripomastigotas foi realizada em cinco microlitros de sangue entre lâmina e lamínula, em microscópio óptico, com objetiva de 40 e ocular de 10 (400x), em 100 campos. Diante desse número, foram realizadas diluições com solução fisiológica a 0,95%, seguidas de recontagens, até a determinação da dose por quilograma de peso vivo (KLEIN, 1995; OLIVEIRA-ALVES, 2003).

Após inoculação, os animais foram avaliados física e eletrocardiograficamente durante toda a fase aguda da enfermidade, que durou até a 5ª semana pós-inoculação (KLEIN, 1995). Subseqüentemente, os animais foram mantidos nos canis do Laboratório de Cardiologia Veterinária da FCAV-UNESP, campus de Jaboticabal, tendo participado de diversas pesquisas conduzidas no laboratório. Nesse período, os animais continuaram sendo avaliados mensalmente por, aproximadamente, dez anos e meio, período este correspondente à fase crônica indeterminada. Sendo assim, tais animais foram submetidos a este experimento aproximadamente 127 meses após a inoculação, estando todos na fase crônica indeterminada da enfermidade.

Previamente ao início do protocolo experimental, os soros dos animais na fase crônica indeterminada foram submetidos à reação de imunofluorescência indireta, na diluição de 1:20 até 1:640 (Apêndice 1). O substrato antigênico, preparado com formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, cepa Y, obtidas de cultura, foram

fornecidas pelo Departamento de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, campus de Ribeirão Preto.

2.3. Terapia com células-tronco

2.3.1. Colheita da medula óssea

Para colheita da medula óssea, os animais foram submetidos à anestesia geral. Desse modo, cada animal recebeu propofol¹ (8 mg/kg IV), sendo intubado com sonda de Magill de diâmetro compatível com o porte do animal. Ato contínuo, a sonda foi conectada a um circuito anestésico do tipo semi-fechado², por onde o cão recebeu sevoflurano³ diluído em oxigênio puro (30 mL/kg/minuto) em concentração que aproximava-se de 1,0 CAM (2,36%), mensurada em analisador de gases digital⁴.

Estando o animal anestesiado, procedeu-se o preparo cirúrgico da região ilíaca direita, com tricotomia e anti-sepsia apropriadas. Utilizou-se uma agulha para punção de medula óssea⁵, que foi introduzida cuidadosamente de modo paralelo ao eixo principal da crista ilíaca direita. Ao cessar a resistência à introdução da agulha, o mandril foi removido e iniciou-se o procedimento de aspiração da medula óssea (Apêndice 2). Para tanto, foram utilizadas seringas de 20 mL previamente heparinizadas (20 U/mL). Desse modo, coletou-se aproximadamente 40 mL de medula óssea em cada um dos animais incluídos no estudo.

Uma vez terminada a colheita, encerrou-se a oferta do anestésico, sendo o circuito saturado com oxigênio. A sonda de Magill foi removida e aguardou-se a recuperação do animal.

¹ Profolen, Blausilgel[®], Cotia – SP

² Aparelho de anestesia inalatória KT-10, série Nissei, Takaoka[®], São Paulo – SP

³ Sevocris, Cristália[®], Itapira – SP

⁴ DX 2010, Dixtal[®], Manaus – AM

⁵ Agulha Rosenthal 18G, Beckton-Dicknson[®], Curitiba – PR

2.3.2. Separação das células-tronco

Imediatamente após colheita de tecido hematopoiético central, uma pequena amostra do material foi utilizada para confeccionar um esfregaço que, uma vez corado, foi avaliado para se confirmar o conteúdo medular. O material foi submetido à contagem global de células¹, a ser empregada posteriormente para quantificação da amostra e cálculo da recuperação celular. Em seguida, procedeu-se a separação da fração de células mononucleares, na qual encontram-se as células-tronco hematopoiéticas e mesenquimais, valendo-se da técnica descrita por BOYUN (1968). Todo o procedimento foi realizado em fluxo laminar vertical do Laboratório de Reprodução Animal da FCAV-UNESP-Jaboticabal para evitar contaminação do material.

A separação foi realizada em gradiente de densidade com ficol ($d=1,077$ g/mL). Para tanto, o volume inicial de 40 mL de medula óssea foi dividido em duas alíquotas de 20 mL colocadas em tubos estéreis de 50 mL. Em cada tubo foram acrescentados 20 mL de solução fisiológica², perfazendo um volume de 40 mL, o qual foi cuidadosamente homogeneizado com auxílio de um pipetador automático³. Ambos os tubos foram centrifugados⁴ a 400G por 10 minutos à temperatura de 20°C. Ao término desse período, procedeu-se a retirada de todo sobrenadante, principalmente a porção gordurosa da medula óssea. Os tubos foram, então, completados com solução fisiológica até o volume de 40 mL, sendo homogeneizados com o pipetador automático. Outros dois tubos plásticos estéreis de 50 mL foram preparados, sendo transferidos 10 mL de ficol⁵ para cada um deles com uma pipeta graduada estéril. A medula óssea homogeneizada em solução fisiológica foi transferida para os tubos contendo ficol, de modo que cada tubo continha 40 mL de medula óssea + NaCl 0,9% e 10 mL de ficol, num sistema bifásico. Desse modo, foram constituídos dois tubos com tal composição.

¹ Contador automático de células ACT-8, Coulter, Estados Unidos

² Solução fisiológica NaCl 0,9%, JP Indústria Farmacêutica, Ribeirão Preto – SP

³ Stripettor, Corning®, São Paulo – SP

⁴ Centrífuga Universal 32R, Hettich Zentrifugen®, Tuttlingen, Alemanha

⁵ Ficoll-Paque Plus, Amersham Biosciences®, Uppsala, Suécia

Em seguida, realizou-se nova centrifugação a 400G por 15 minutos à temperatura de 20°C. Parte do sobrenadante foi então removida com auxílio do pipetador automático. Ato contínuo, a camada de células mononucleares localizados entre as fases de ficol e plasma foi aspirada e transferido para um novo tubo estéril de 50 mL. Esse procedimento foi realizado em ambos os tubos e o material restante (ficol + células vermelhas) foi descartado. Subseqüentemente, a fração mononuclear recém transferida para os novos tubos foi acrescida de meio de cultura celular¹ até o volume de 40 mL em cada tubo, os quais foram novamente centrifugados a 400G por 7 minutos à temperatura de 20°C. O sobrenadante foi removido utilizando-se do pipetador automático e o botão celular localizado no fundo dos tubos ressuspendido em 15 mL de solução de plasma canino a 5%, previamente preparada com material oriundo do próprio animal. Uma vez homogeneizado na solução de plasma, a suspensão celular foi filtrada em membrana de 150 µm. O filtrado foi novamente centrifugado a 400G por 10 minutos à temperatura de 4°C, o sobrenadante desprezado e as células resuspendidas em 15 mL de solução de plasma canino a 5%. Uma alíquota foi removida para quantificação celular em contador automático.

Baseado nessa quantificação determinou-se o volume a ser aspirado, de modo que aproximadamente 100 milhões de células mononucleares fossem transferidas para novo tubo. Uma vez transferido volume correspondente, acrescentou-se solução de plasma canino a 5%, resultando numa solução celular, cuja concentração final foi de 10 milhões de células mononucleares por mililitro. Na seqüência, duas seringas estéreis de três mililitros foram utilizadas para aspirar seis mL da solução celular final. Esse material foi mantido sob refrigeração até o momento da aplicação intracoronariana. Parte do material filtrado foi utilizado para determinação da viabilidade celular em câmara de Neubauer pela técnica dye exclusion, baseada no líquido de turk, que lisa as hemáceas e cora o núcleo dos granulócitos, e no azul de tripan, que cora apenas as células mortas.

No Apêndice 3 podem ser visibilizadas imagens do processo de separação celular descrito anteriormente.

¹ RPMI 1640, Sigma[®], Saint Louis, Estados Unidos

2.3.3. Transplante das células-tronco

Para proceder a cateterização coronariana os animais foram submetidos à anestesia geral inalatória. Como medicação pré-anestésica os cães receberam levomepromazina¹ (1 mg/kg IV). Decorridos 15 minutos, procedeu-se a indução anestésica com propofol² (8 mg/kg IV), sendo os animais subsequentemente intubados com sonda orotraqueal de Maggil de diâmetro compatível com o porte do paciente. Uma vez posicionada, o cuff foi inflado e a sonda foi imediatamente conectada a um circuito anestésico semi-fechado, através do qual vaporizou-se sevoflurano³ em concentração que se aproximava de 1,0 CAM (2,36%), diluído em oxigênio 100% (30 mL/kg/hora).

Estando o animal em plano anestésico adequado, procedeu-se a tricotomia e anti-sepsia da face interna do membro pélvico direito. O animal foi então posicionado sobre uma mesa hemodinâmica móvel⁴, acoplada ao angiógrafo em arco⁵. Subsequentemente, procedeu-se a cateterização pela técnica de Seldinger. Assim, a artéria femoral direita foi localizada e exposta por dissecação simples da pele, tecido subcutâneo e musculatura com auxílio de lâmina de bisturi, tesoura romba-romba e pinça anatômica. Concluído o procedimento, dois fios de reparo foram passados em volta do vaso para facilitar sua exposição. Assim, procedeu-se uma punção-incisão na face exposta da artéria utilizando-se de uma lâmina de bisturi. Subseqüentemente, a artéria foi cateterizada com o cateter introdutor/dilatador⁶ com guia de diâmetro 8F (Apêndice 4). Para evitar o deslocamento indevido do cateter, o introdutor foi imediatamente fixado à pele adjacente à área dissecada com fio mononylon 3-0. Pelo introdutor/dilatador foi então inserido o cateter guia Judkins direito⁷ de diâmetro 6F.

¹ Neozine, Aventis®, São Paulo – SP

² Profolen, Blausilgel®, Cotia – SP

³ Sevocris, Cristália®, Itapira – SP

⁴ Angio Cardio CGT, J. Procópio Equipamentos Hospitalares, Itapecerica da Serra – SP

⁵ OEC 9800 Plus, GE® Medical Systems S.A., Buc Cedex, França

⁶ Cateter introdutor/dilatador com guia, Bioxxi®, Rio de Janeiro – RJ

⁷ Cateter guia Wiseguide Judkins Right, Boston Scientific Scimed®, Maple Grove, Estados Unidos

Uma válvula hemostática com duas vias¹ (válvula em Y) foi imediatamente acoplada ao cateter Judkins para impedir o extravasamento de sangue e, simultaneamente, permitir a introdução subsequente do cateter. Procedeu-se, então, a introdução do cateter balão para angioplastia² (9 x 3,5), em cujo lúmen foi previamente introduzido o guia para cateter de angioplastia³ (0,14 x 19 cm). Com auxílio de imagens fluoroscópicas⁴ em tempo real, o cateter Judkins foi introduzido na artéria femoral e guiado pela aorta, sendo posicionado no seio coronariano, imediatamente superior aos folhetos da válvula aórtica. Ato contínuo, procedeu-se a angiografia coronariana (Apêndices 5 e 6) por meio da aplicação de ioxitalamato de meglumina e de sódio⁵ (cinco mililitros em injeção rápida). Observando-se as coronárias contrastadas, o cateter Judkins direito foi posicionado frente ao óstio coronariano direito e, imediatamente, o guia para cateter de angioplastia introduzido na coronária direita com auxílio de um torquer⁶ acoplado para facilitar a movimentação do guia do cateter. Valendo-se de infusões intermitentes de ioxitalamato de meglumina e de sódio, o guia foi ajustado adequadamente na coronária direita e permitiu o correto posicionamento do cateter balão.

Sob visualização fluoroscópica, o cateter balão foi distendido com solução fisiológica. Tal procedimento foi realizado imediatamente antes da aplicação da solução de células-tronco mantidas sob refrigeração e por tempo inferior a 10 segundos. Assim, aplicou-se três mililitros da solução previamente preparada, contendo cerca de 30 milhões de células. Tendo finalizado o transplante das células-tronco na coronária direita, todo o sistema foi removido, exceto o introdutor/dilatador. Iniciou-se a cateterização da artéria coronária esquerda, utilizando-se um cateter Judkins esquerdo⁷ de diâmetro 6F, o qual foi introduzido pelo mesmo introdutor/dilatador previamente posicionado. Em seguida, os mesmos procedimentos descritos para a cateterização da artéria coronária direita foram realizados até que fosse permitido o transplante da

¹ Válvula hemostática com duas vias, Bioxx[®], Rio de Janeiro – RJ

² Cateter balão Over-The-Wire Raptor, Bioxxi[®], Rio de Janeiro – RJ

³ Guia para cateter de angioplastia, Bioxxi[®], Rio de Janeiro – RJ

⁴ OEC 9800 Plus, GE[®] Medical Systems S.A., Buc Cedex, França

⁵ Telebrix Coronar, Guerbet[®], Rio de Janeiro – RJ

⁶ Torquer para cateter guia, Bioxxi[®], Rio de Janeiro – RJ

⁷ Cateter guia Wiseguide Judkins Left, Boston Scientific Scimed[®], Maple Grove – Estados Unidos

solução de células-tronco na coronária. Inicialmente cateterizou-se o ramo interventricular paraconal, onde foi injetado um mililitro e meio da solução preparada, contendo cerca de 15 milhões de células. Subseqüentemente, cateterizou-se o ramo circunflexo, no qual foi aplicado um mililitro e meio da solução preparada, contendo adicionais 15 milhões de células.

Tendo finalizado o procedimento, todos os cateteres foram removidos, exceto o introdutor/dilatador. Previamente à sua remoção, procedeu-se a ligadura parcial da artéria femoral, de modo a evitar hemorragias. O cateter introdutor/dilatador foi retirado e a artéria femoral completamente ligada com fio mononylon 3-0 em dois locais distintos, sendo um anterior e outro posterior ao sítio de incisão por onde foi introduzido o cateter dilatador. Ato contínuo, procedeu-se a aproximação do subcutâneo com fio categute cromado 3-0 e a síntese da pele com fio mononylon 3-0. Procedeu-se a limpeza da ferida cirúrgica e um curativo com anti-séptico foi feito no local. Após o procedimento, a oferta do anestésico foi suspensa, mantendo-se apenas o fornecimento de oxigênio até a remoção da sonda orotraqueal. Os animais receberam como fármacos antibiótico e anti-inflamatório benzilpenicilina benzatina¹ (25.000 UI/kg IM) e meloxicam² (0,2 mg/kg SC), respectivamente.

2.4. Avaliação dos animais

2.4.1. Eletrocardiografia

Para a realização do ECG, foi empregado aparelho computadorizado³, que permitiu a obtenção simultânea de seis derivações (DI, DII, DIII, aVR, aVL e aVF), na velocidade de 50 mm/segundo. Para tanto, utilizou-se a calibração de um milivolt igual a um centímetro, sendo o exame realizado de acordo com técnica descrita por TILLEY (1992).

¹ Benzatron, Ariston®, São Paulo – SP

² Movatec, Boehringer Ingelheim®, Itapeccerica da Serra – SP

³ Módulo de aquisição de eletrocardiograma para computador modelo ECG-PC, Teb® – São Paulo – SP

Uma vez o cão estando em decúbito lateral direito, foram acoplados quatro eletrodos, sendo um em cada membro locomotor, permitindo a obtenção do traçado eletrocardiográfico que foi gravado em arquivo eletrônico para posterior interpretação. Foram mensurados a duração e amplitude da onda P (Pms e PmV, respectivamente), a duração do intervalo PR (PRms), a duração do complexo QRS (QRSms), a amplitude da onda R (RmV) e a duração do intervalo QT (QTms). Para cada uma das variáveis, foram consideradas as médias de três medidas consecutivas. Adicionalmente, mensurou-se a frequência cardíaca (FC) e registraram-se as alterações no ritmo cardíaco e no segmento ST (WOLF et al., 2000).

2.4.2. Pressão arterial

A pressão arterial foi obtida por meio de aparelho de pressão não-invasiva do tipo oscilométrico¹.

Para a determinação da pressão, os cães foram inicialmente colocados em decúbito lateral direito e, em seguida, posicionado um manguito de monitoração de pressão ao redor da base da cauda do animal. Foram aferidas as pressões arteriais sistólica (PAS), média (PAM) e diastólica (PAD), sendo considerado como valor final a média de três medidas consecutivas (MUCHA & CAMACHO, 2001).

2.4.3. Ecodopplercardiografia

Para realização da ecocardiografia, foi empregado ecodopplercardiógrafo², com transdutor bifrequencial de 5,0 – 7,5 MHz, sendo os dados armazenados na memória do aparelho para realização das medidas e cálculos posteriormente. Simultaneamente ao exame ecocardiográfico, também foi realizado ECG bipolar monocanal, para permitir a mensuração de algumas variáveis dependentes do traçado eletrocardiográfico, além de facilitar a observação imediata de eventuais arritmias.

¹ DX 2710 – Dixtal[®] – Manaus – AM.

² 300S Pandion Vet – Pie Medical[®] Equipment – Maastricht – Holanda.

Com o animal posicionado em decúbito lateral direito, localizou-se a janela paraesternal direita entre o quarto e quinto espaços intercostais. A partir da visualização bidimensional do ventrículo esquerdo em eixo transversal, obteve-se imagem em modo-M, com o cursor posicionado equidistante dos músculos papilares em plano cordal. Assim, foram mensurados o diâmetro interno do ventrículo esquerdo na sístole (DIVEs) e diástole (DIVEd), espessura do septo interventricular na sístole (ESIVs) e diástole (ESIVd), além da espessura da parede livre do ventrículo esquerdo também na sístole (EPLVEs) e diástole (EPLVEd). Em seqüência à imagem anterior, inclinou-se o transdutor dorsalmente até que fosse visibilizada a artéria pulmonar. Utilizando-se dessa imagem, o cursor Doppler foi posicionado distalmente às válvulas pulmonares, sendo, então, mensurado o pico de velocidade do fluxo transpulmônico (PVPUL) utilizando-se do Doppler pulsado.

Subseqüentemente, o animal foi posicionado em decúbito lateral esquerdo, sendo obtida imagem apical quatro câmaras pela janela paraesternal esquerda. A partir dessa imagem bidimensional, mensurou-se o pico de velocidade do enchimento ventricular esquerdo rápido – onda E (PVME) e lento – onda A (PVMA), posicionando-se o cursor do Doppler pulsado na extremidade dos folhetos da valva mitral durante sua abertura. A partir da imagem apical cinco câmaras obtida pela mesma janela, mensurou-se o pico de velocidade do fluxo transaórtico (PVAO). Para mensuração do período de pré-ejeção (PPE), determinou-se o tempo desde a onda Q observada no traçado eletrocardiográfico simultâneo até o início do fluxo aórtico. O tempo de ejeção ventricular esquerda (TEVE) foi mensurado do início ao final do fluxo transaórtico. Para mensuração do tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV), o cursor do Doppler pulsado foi posicionado equidistante entre a via de saída do ventrículo esquerdo e o fluxo transmitral, sendo determinado o tempo desde o término do fluxo transaórtico até o início do enchimento ventricular rápido (onda E). Em seguida, obteve-se a imagem paraesternal cranial do átrio direito e aurícula, com visualização da valva tricúspide. A partir dessa imagem bidimensional, o cursor do Doppler pulsado foi posicionado na extremidade dos folhetos valvares durante sua abertura para mensuração do pico de

velocidade do enchimento ventricular direito rápido – onda E (PVTE) e lento – onda A (PVTA).

Diversos índices ecodopplercardiográficos foram calculados, a saber: espessamento fracional do septo interventricular (SIV), espessamento fracional da parede livre do ventrículo esquerdo (PLVE), fração de ejeção (FEJ), fração de encurtamento (FEC), índice de estresse da parede ao final da sístole (IEPs), índice de estresse da parede ao final da diástole (IEPd), índice de ejeção (IE), índice cardíaco (IC), encurtamento circunferencial das fibras miocárdicas (VMEF), além das relações entre PPE e TEVE (PPE/TEVE), PVME e PVMA (PVME/PVMA), e PVTE e PVTA (PVTE/PVTA).

O índice de desempenho miocárdico de Tei (ITEI) também foi calculado. Para tanto, mensurou-se o intervalo entre o término do espectro da onda A mitral e o início da onda E mitral subsequente. Desse valor subtraiu-se TEVE, sendo o resultado dividido pelo próprio TEVE (Apêndice 7).

O resultado das mensurações ecocardiográficas foi considerado como a média de três ciclos cardíacos consecutivos. Especificamente para os parâmetros Doppler, foram considerados três ciclos cardíacos com picos máximos de velocidade e o direcionamento do cursor foi otimizado por meio do sinal de áudio, visando maximizar o espectro do pico de velocidade do fluxo sanguíneo e obter o tom mais puro (BOON, 1998; SOUSA, 2004).

As fórmulas matemáticas utilizadas para cálculo destas variáveis podem ser observadas no Apêndice 8 (TEI et al., 1995; BOON, 1998; SOUSA, 2004).

2.5. Momentos de avaliação

Os animais foram avaliados antes (M0) e após a realização do transplante autólogo de células-tronco. Desse modo, o protocolo experimental contabilizou sete avaliações seriadas:

- M0: avaliação basal, realizada antes do transplante de células-tronco;

- M1: um mês após o transplante de células-tronco hematopoiéticas;
- M2: dois meses após o transplante de células-tronco hematopoiéticas;
- M3: três meses após o transplante de células-tronco hematopoiéticas;
- M4: quatro meses após o transplante de células-tronco hematopoiéticas;
- M5: cinco meses após o transplante de células-tronco hematopoiéticas;
- M6: seis meses após o transplante de células-tronco hematopoiéticas.

Em todos os momentos de avaliação os animais foram submetidos aos exames eletrocardiográfico, ecodopplercardiográfico e determinação da pressão arterial. Adicionalmente, os cães eram observados todos os dias e avaliados clinicamente em intervalos semanais.

2.6. Análise estatística

Os parâmetros eletrocardiográficos, ecodopplercardiográficos e da pressão arterial foram analisados por meio de análise de variância, que determinou a existência ou não de diferenças ao longo dos momentos de avaliação. Ao se constatar variação significativa, empregou-se o teste de Dunnett para comparar individualmente cada momento com o valor pré-transplante (M0). Desse modo, foi possível determinar a partir de que momento ocorreram alterações significativas nos parâmetros avaliados. Em todas as análises, considerou-se $P < 0,05$ como significativo (GRAPHPAD, 1998).

A análise estatística foi realizada com o programa Graphpad InStat[®] versão 3.05 para Windows 95/NT, desenvolvido pela Graphpad Software[®], San Diego, Califórnia (2000).

3. RESULTADOS

3.1. Preparo das células-tronco

Os procedimentos realizados durante a colheita e separação das células-tronco transcorreram sem quaisquer complicações ou dificuldades.

Os dados referentes ao processo de separação celular encontram-se registrados na Tabela 1.

3.2. Transplante das células-tronco

A cateterização coronariana para realização do transplante das células-tronco foi realizada com moderado grau de dificuldade devido ao diâmetro do óstio coronariano nos cães incluídos no estudo. Obtivemos especial dificuldade no procedimento de cateterização da coronária direita, cujo ato foi sempre acompanhado do desenvolvimento de alterações no ritmo cardíaco e presença de arritmias malignas paroxísticas. Na cateterização da coronária esquerda não ocorreu qualquer alteração no ritmo ou na morfologia das ondas eletrocardiográficas. É interessante notar que no início dos procedimentos, isto é, imediatamente antes da cateterização coronariana, todos os animais apresentavam ritmo sinusal ou taquicardia sinusal.

As alterações eletrocardiográficas observadas durante o procedimento de transplante intracoronariano de células mononucleares autólogas, bem como os procedimentos realizados na tentativa de revertê-las, encontram-se descritos na Tabela 2.

Tabela 1 – Parâmetros avaliados durante o processo de separação das células mononucleares de cães de Unesp, Jaboticabal, SP (2007).

| Animal | Medula coletada | Concentração do aspirado | Células totais no início do processamento | Concentração do filtrado lavado | Células totais no final do processamento | Recuperação |
|--------|-----------------|------------------------------|---|---------------------------------|--|-------------|
| 1 | 40 mL | $2,15 \times 10^7/\text{mL}$ | $0,86 \times 10^9$ | $0,55 \times 10^9/\text{mL}$ | $0,22 \times 10^9$ | 25,58% |
| 2 | 40 mL | $2,90 \times 10^7/\text{mL}$ | $1,16 \times 10^9$ | $0,95 \times 10^9/\text{mL}$ | $0,33 \times 10^9$ | 28,62% |
| 3 | 40 mL | $3,25 \times 10^7/\text{mL}$ | $1,30 \times 10^9$ | $1,09 \times 10^9/\text{mL}$ | $0,32 \times 10^9$ | 25,15% |
| 4 | 40 mL | $1,95 \times 10^7/\text{mL}$ | $0,78 \times 10^9$ | $0,61 \times 10^9/\text{mL}$ | $0,15 \times 10^9$ | 19,48% |
| 5 | 40 mL | $2,55 \times 10^7/\text{mL}$ | $1,02 \times 10^9$ | $0,88 \times 10^9/\text{mL}$ | $0,22 \times 10^9$ | 21,56% |

Tabela 2 – Alterações eletrocardiográficas, procedimentos realizados e evolução das alterações durante a cateterização e o transplante das células-tronco hematopoiéticas autólogas em cães chagásicos crônicos (n=5) (2007).

| Animal | Alterações ocorridas durante a cateterização da coronária direita | | |
|--------|---|---|--------------------------------------|
| | Alterações no ritmo | Alterações nas ondas ECG | Procedimento realizado |
| 1 | - | Supressão de milivoltagem, Inversão da onda T | Remoção do cateter |
| 2 | Taquicardia ventricular, Fibrilação ventricular | Ausência de ondas P, complexos QRS largos e bizarros | Remoção do cateter, Desfibrilação |
| 3 | Bradicardia sinusal | Supressão de milivoltagem | Remoção do cateter |
| 4 | - | - | - |
| 5 | Bradicardia sinusal, Fibrilação ventricular | Aumento da amplitude da onda T, Inversão da onda T, ausência de ondas P, complexos QRS largos e bizarros | Remoção do cateter, Desfibrilação |

3.3. Óbitos

Ocorreram dois óbitos dentre os cinco animais incluídos inicialmente no estudo. O primeiro deles ocorreu durante o procedimento de cateterização coronariana para transplante das células mononucleares. Embora tenham sido feitas cinco tentativas de desfibrilação com carga crescente, o animal evoluiu desfavoravelmente para parada cardiopulmonar. Seguiram-se, então, as manobras padrão para ressuscitação cardiopulmonar, as quais foram ineficazes. O segundo animal apresentou morte súbita 13 dias após o procedimento. Tal animal apresentava-se clinicamente estável, sem indícios de distúrbios do ritmo à auscultação e de arritmias malignas nos dois exames eletrocardiográficos realizados desde o transplante das células mononucleares. Desse modo, os resultados das avaliações referentes aos parâmetros cardiovasculares foram considerados como a média dos três animais sobreviventes.

3.4. Eletrocardiografia

Os parâmetros eletrocardiográficos avaliados antes do transplante das células-tronco autólogas e nos seis meses subseqüentes não evidenciaram alterações. Embora tenha sido observada variação significativa no parâmetro Pms em M2, tal variação não foi evidenciada nos momentos seguintes.

A evolução dos parâmetros eletrocardiográficos, assim como os valores de P referente à análise de variância, encontram-se representados na Tabela 3. A representação gráfica das médias e desvios-padrão dos parâmetros eletrocardiográficos pode ser observada na Figura 1 e 2.

3.5. Pressão arterial

A avaliação da pressão arterial obtida por oscilometria evidenciou médias estáveis ao longo dos seis meses pós-transplante. Desse modo, não existiu qualquer

variação significativa em relação aos valores basais (pré-transplante) das pressões arteriais sistólica, média e diastólica. A evolução de tais parâmetros, bem como os valores de P referente à análise de variância, encontram-se descritos na Tabela 4. A representação gráfica das médias e desvios-padrão das pressões arteriais pode ser observada na Figura 3.

3.6. Ecodopplercardiografia

A avaliação ecodopplercardiográfica evidenciou variação significativa dos parâmetros PVAO, PPE, TRIV e ITEI após o transplante intracoronariano de células-tronco autólogas. A partir de M3, observou-se aumento de PVAO ($P > 0,05$) e redução de PPE ($P < 0,05$), bem como de TRIV e ITEI a partir de M4 ($P < 0,05$). As demais variáveis ecocardiográficas não variaram durante a avaliação.

A evolução dos parâmetros ecocardiográficos, assim como os valores de P referente à análise de variância, encontram-se detalhados nas Tabelas 5 e 6. A representação gráfica das médias e desvios-padrão dos parâmetros ecocardiográficos pode ser observada na Figura 4 a Figura 10.

Tabela 3 – Parâmetros eletrocardiográficos (média ± DP) em cães chagásicos crônicos (n=3) submetidos ao tratamento com células-tronco hematopoiéticas autólogas. Unesp, Jaboticabal, SP (2007).

| Parâmetro | M0 | M1 | M2 | M3 | M4 | M5 |
|-----------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Pms | 53,3 ± 3,5 | 47,7 ± 4,0 | 45,7 ± 2,3* | 48,0 ± 1,7 | 46,7 ± 3,5 | 51,0 ± 1,7 |
| PmV | 0,24 ± 0,09 | 0,32 ± 0,03 | 0,29 ± 0,08 | 0,20 ± 0,05 | 0,27 ± 0,03 | 0,27 ± 0,04 |
| PRms | 105,3 ± 4,0 | 92,3 ± 8,1 | 94,7 ± 6,8 | 86,7 ± 20,3 | 95,3 ± 19,7 | 97,0 ± 10,0 |
| QRSms | 64,3 ± 16,9 | 69,0 ± 13,1 | 60,0 ± 10,0 | 74,3 ± 9,8 | 56,7 ± 3,5 | 52,3 ± 4,0 |
| RmV | 1,19 ± 0,88 | 1,63 ± 0,51 | 1,47 ± 0,23 | 1,24 ± 0,37 | 1,65 ± 0,23 | 1,24 ± 0,86 |
| QTms | 204,7 ± 4,0 | 229,0 ± 10,6 | 213,3 ± 3,5 | 210,0 ± 13,0 | 205,7 ± 15,0 | 202,0 ± 8,5 |
| FC | 120,3 ± 30,2 | 129,0 ± 23,5 | 127,0 ± 19,3 | 125,0 ± 29,3 | 131,3 ± 47,6 | 129,0 ± 36,3 |

Pms: duração da onda P (mseg); PmV: amplitude da onda P (mV); PRms: duração do intervalo PR (mseg); QRSms: duração do complexo QRS (mseg); RmV: amplitude da onda R (mV); QTms: duração do intervalo QT (mseg); FC: frequência cardíaca (bpm).

* Diferença significativa (P<0,05) em relação a M0 (pré-transplante)

Tabela 4 – Pressão arterial sistólica, média e diastólica (média ± DP) em cães chagásicos crônicos (n=3) submetidos ao tratamento com células-tronco hematopoiéticas autólogas. Unesp, Jaboticabal, SP (2007).

| Parâmetro | M0 | M1 | M2 | M3 | M4 | M5 |
|-----------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|
| PAS | 132,0 ± 12,4 | 128,0 ± 13,0 | 129,0 ± 14,0 | 124,7 ± 11,4 | 121,7 ± 16,8 | 127,3 ± 7,6 |
| PAM | 97,0 ± 3,4 | 99,0 ± 2,6 | 101,0 ± 4,0 | 101,7 ± 2,1 | 96,7 ± 6,0 | 98,7 ± 7,5 |
| PAD | 73,3 ± 6,8 | 79,0 ± 6,0 | 82,3 ± 6,1 | 83,0 ± 3,6 | 79,0 ± 5,0 | 78,0 ± 9,5 |

PAS: pressão arterial sistólica (mmHg); PAM: pressão arterial média (mmHg); PAD: pressão arterial diastólica (mmHg).

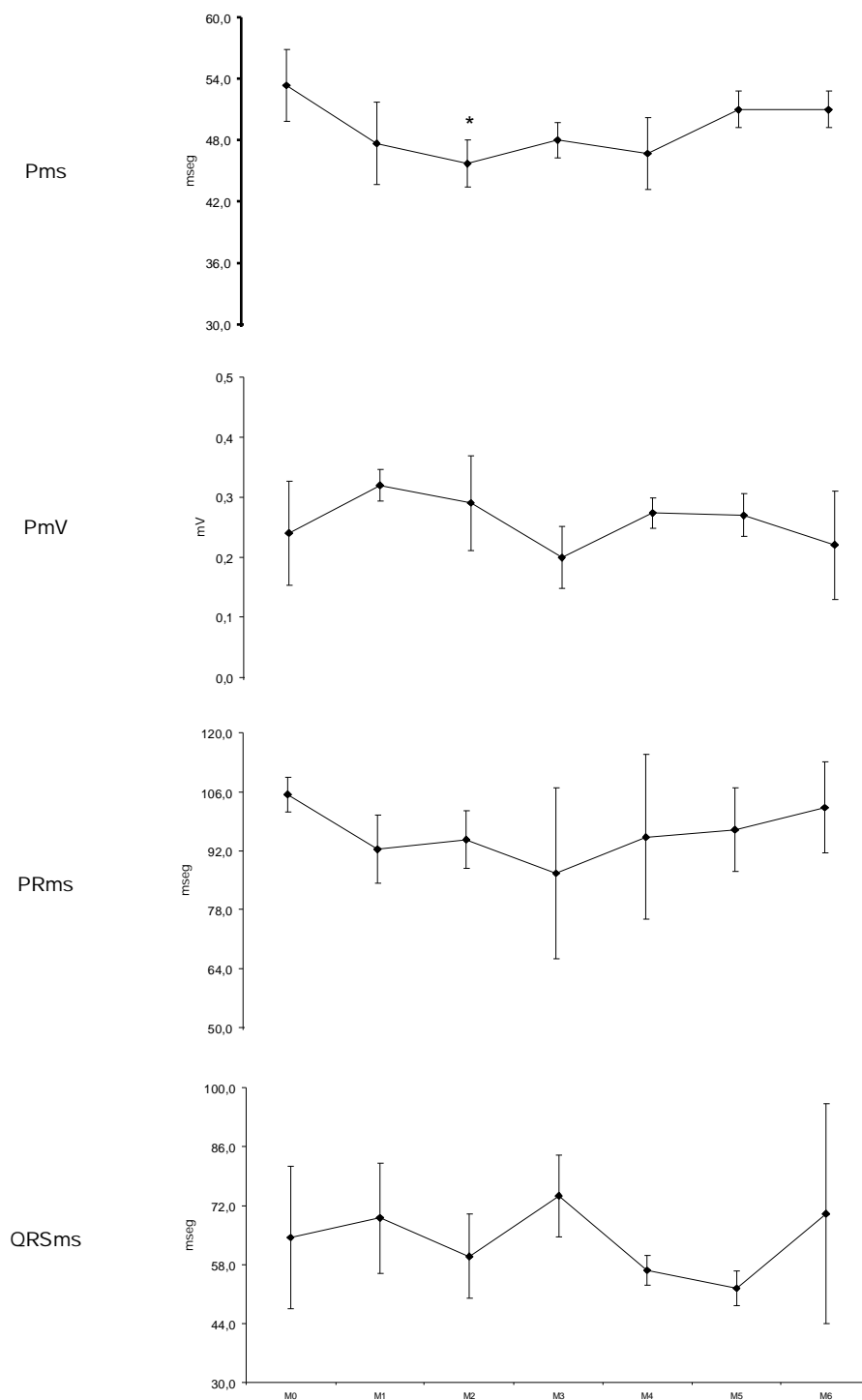


Figura 1 – Representação gráfica das médias \pm DP dos parâmetros eletrocardiográficos Pms, PmV, PRms e QRSms de cães chagásicos crônicos antes (M0) e após (M1 a M6) transplante de células-tronco hematopoiéticas autólogas. Unesp, Jaboticabal, SP (2007)

* Diferença significativa em relação a M0 ($P < 0,05$).

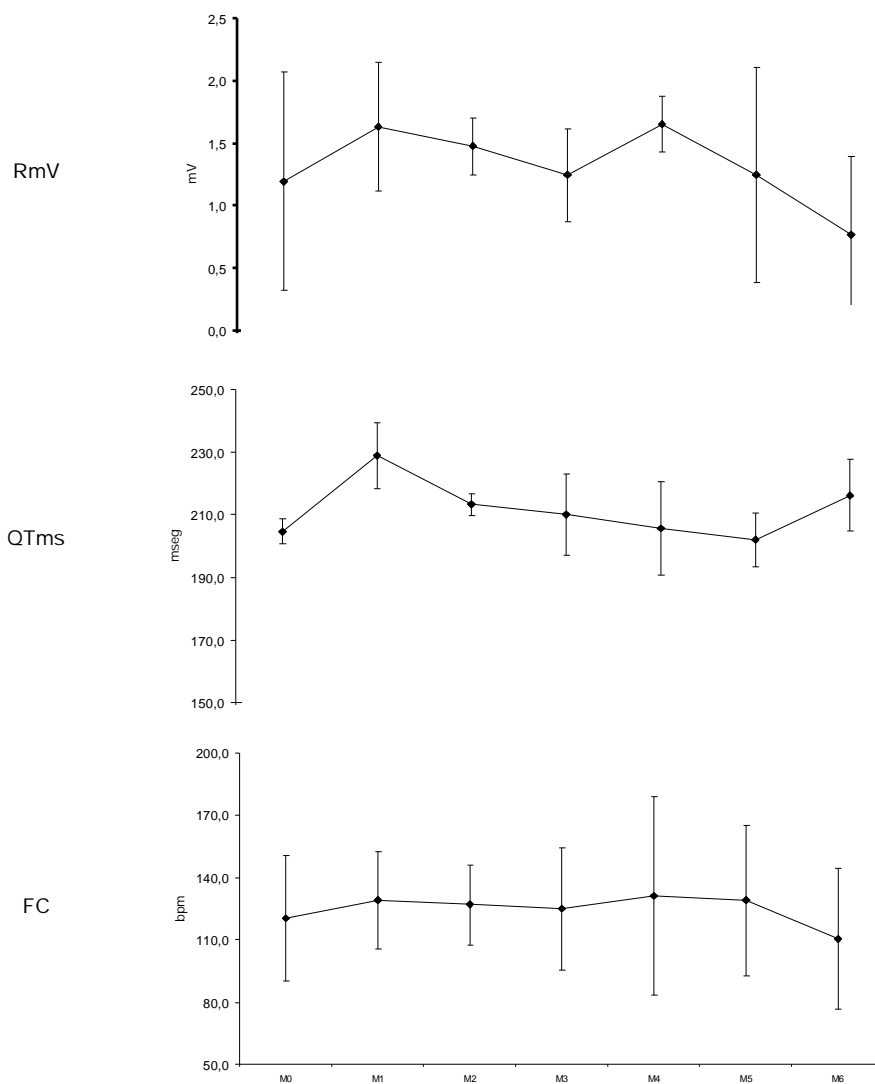


Figura 2 – Representação gráfica das médias \pm DP dos parâmetros eletrocardiográficos RmV, QTms e FC de cães chagásicos crônicos antes (M0) e após (M1 a M6) transplante de células-tronco hematopoiéticas autólogas. Unesp, Jaboticabal, SP (2007).

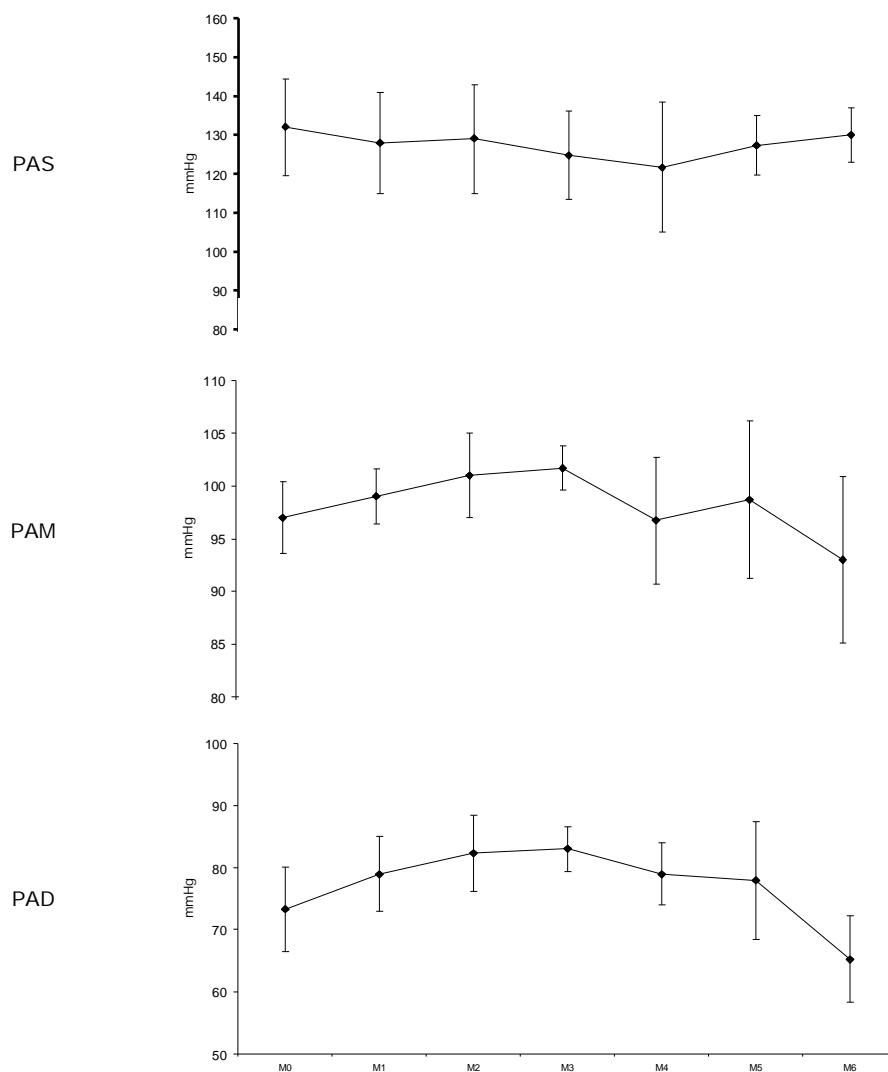


Figura 3 – Representação gráfica das médias \pm DP das pressões arteriais de cães chagásicos crônicos antes (M0) e após (M1 a M6) transplante de células-tronco hematopoiéticas autólogas. Unesp, Jaboticabal, SP (2007).

Tabela 5 – Parâmetros ecocardiográficos (média \pm DP) obtidos pelo modo-M do ventrículo esquerdo em eixo tra-
cões chagásicos crônicos (n=3) submetidos ao transplante intracoronariano de células-tronco h
Unesp, Jaboticabal, SP (2007).

| Parâmetro | M0 | M1 | M2 | M3 | M4 | M5 |
|-----------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| DIVes | 2,03 \pm 0,38 | 1,80 \pm 0,34 | 1,80 \pm 0,15 | 1,88 \pm 0,25 | 1,88 \pm 0,28 | 1,76 \pm 0,25 |
| DIVEd | 2,99 \pm 0,15 | 2,67 \pm 0,24 | 2,99 \pm 0,12 | 3,02 \pm 0,22 | 2,68 \pm 0,25 | 3,02 \pm 0,18 |
| ESIVs | 1,01 \pm 0,10 | 1,04 \pm 0,15 | 1,05 \pm 0,08 | 1,04 \pm 0,05 | 0,93 \pm 0,09 | 0,95 \pm 0,06 |
| ESIVd | 0,69 \pm 0,07 | 0,83 \pm 0,05 | 0,75 \pm 0,08 | 0,79 \pm 0,14 | 0,83 \pm 0,17 | 0,66 \pm 0,04 |
| EPLVEs | 1,07 \pm 0,12 | 1,29 \pm 0,32 | 1,16 \pm 0,30 | 1,03 \pm 0,10 | 1,15 \pm 0,16 | 1,07 \pm 0,26 |
| EPLVEd | 0,85 \pm 0,15 | 0,88 \pm 0,19 | 0,73 \pm 0,10 | 0,69 \pm 0,13 | 0,69 \pm 0,18 | 0,64 \pm 0,15 |
| SIV | 49,67 \pm 5,45 | 25,33 \pm 4,35 | 40,00 \pm 6,56 | 45,67 \pm 3,13 | 35,00 \pm 13,23 | 44,00 \pm 8,44 |
| PLVE | 27,33 \pm 9,87 | 46,67 \pm 16,04 | 56,33 \pm 21,50 | 52,00 \pm 17,35 | 46,33 \pm 18,56 | 52,67 \pm 17,21 |
| FEJ | 61,00 \pm 3,08 | 64,00 \pm 5,72 | 65,33 \pm 5,03 | 69,33 \pm 6,03 | 69,33 \pm 8,39 | 70,67 \pm 2,08 |
| FEC | 32,33 \pm 9,29 | 34,33 \pm 2,74 | 35,33 \pm 4,04 | 38,00 \pm 4,58 | 39,00 \pm 2,77 | 39,00 \pm 1,00 |
| IEPs | 2,10 \pm 0,70 | 1,70 \pm 0,30 | 1,90 \pm 0,20 | 1,80 \pm 0,10 | 1,70 \pm 0,10 | 1,60 \pm 0,30 |
| IEPd | 4,40 \pm 0,20 | 3,90 \pm 0,90 | 3,90 \pm 1,50 | 2,70 \pm 0,40 | 2,70 \pm 0,70 | 2,90 \pm 0,90 |

DIVes: diâmetro interno do ventrículo esquerdo em sístole (cm); DIVEd: diâmetro interno do ventrículo esquerdo em diástole (cm); ESIVs: e
em sístole (cm); ESIVd: espessura do septo interventricular em diástole (cm); EPLVEs: espessura da parede livre do ventrículo esquerdo em
da parede livre do ventrículo esquerdo em diástole (cm); SIV: espessamento fracional do septo interventricular (%); PLVE: espessame
ventrículo esquerdo (%); FEJ: fração de ejeção (%); FEC: fração de encurtamento (%); IEPs: índice de estresse da parede em sístole; IEPd:
diástole.

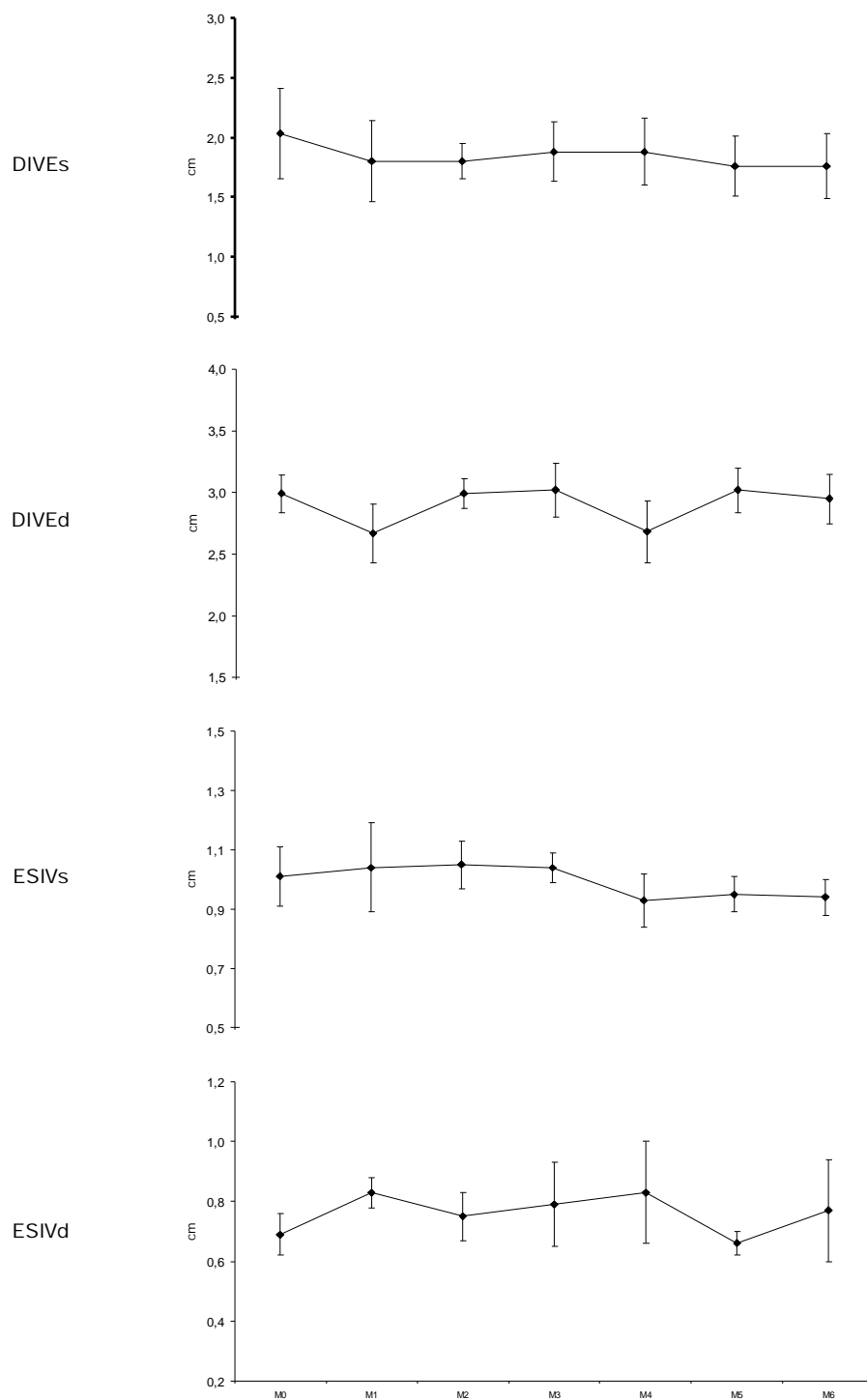


Figura 4 – Representação gráfica das médias \pm DP dos parâmetros ecocardiográficos DIVEs, DIVEd, ESIVs e ESIVd de cães chagásicos crônicos antes (M0) e após (M1 a M6) transplante de células-tronco hematopoiéticas autólogas. Unesp, Jaboticabal, SP (2007).

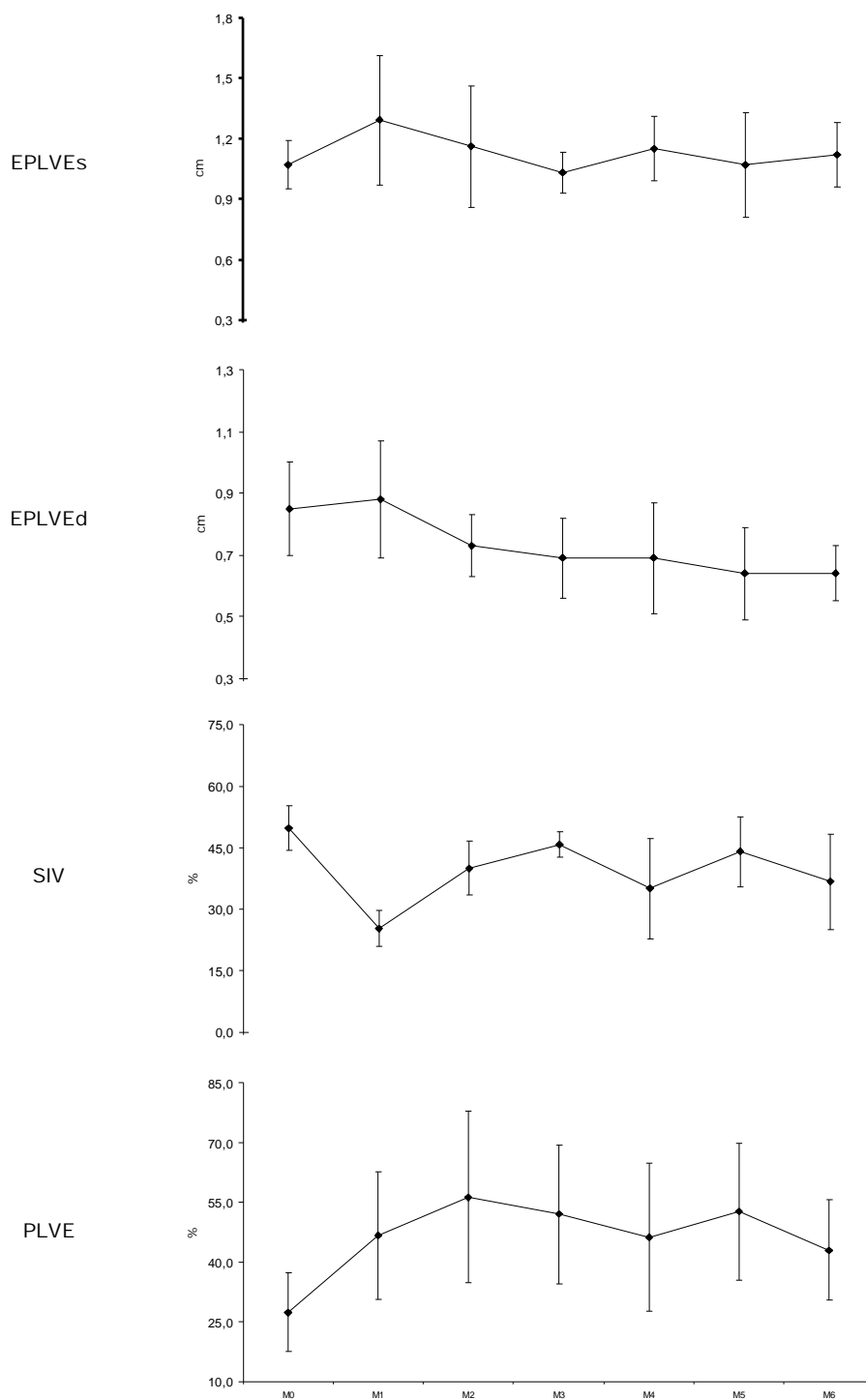


Figura 5 – Representação gráfica das médias \pm DP dos parâmetros ecocardiográficos EPLVEs, EPLVEd, SIV e PLVE de cães chagásicos crônicos antes (M0) e após (M1 a M6) transplante de células-tronco hematopoiéticas autólogas. Unesp, Jaboticabal, SP (2007).

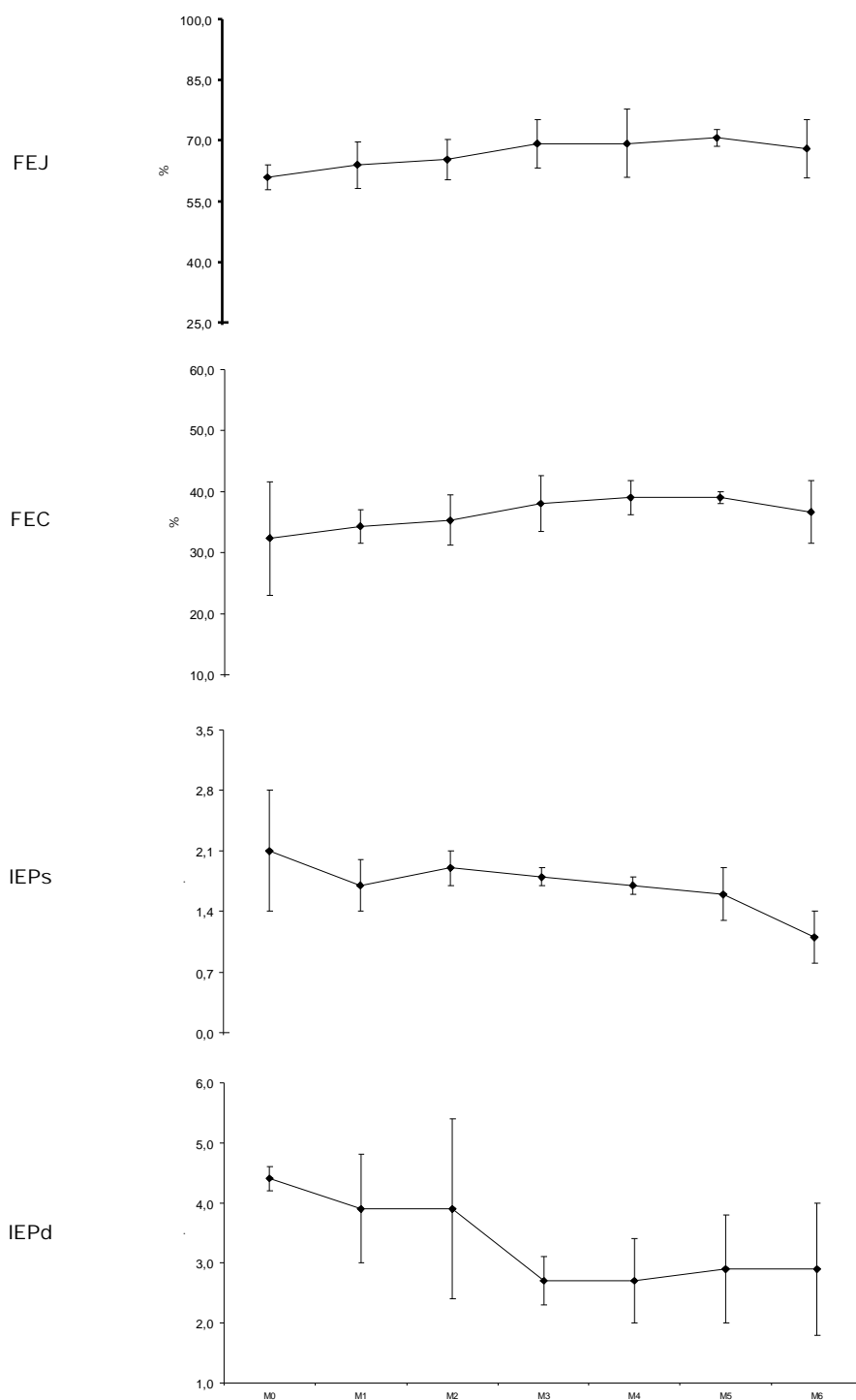


Figura 6 – Representação gráfica das médias \pm DP dos parâmetros ecocardiográficos FEJ, FEC, IEPs e IEPd de cães chagásicos crônicos antes (M0) e após (M1 a M6) transplante de células-tronco hematopoiéticas autólogas. Unesp, Jaboticabal, SP (2007).

Tabela 6 – Parâmetros ecocardiográficos (média ± DP) obtidos pelo Doppler pulsado em cães chagásicos crônicos submetidos a transplante intracoronariano de células-tronco hematopoéticas autólogas. Unesp, Jaboticabal, SP (2010)

| Parâmetro | M0 | M1 | M2 | M3 | M4 | M5 |
|-----------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| PVPUL | 0,73 ± 0,15 | 0,77 ± 0,23 | 0,72 ± 0,15 | 0,77 ± 0,20 | 0,72 ± 0,07 | 0,76 ± 0,11 |
| PVAO | 0,80 ± 0,21 | 1,11 ± 0,02 | 1,11 ± 0,03 | 1,24 ± 0,18* | 1,15 ± 0,05* | 1,14 ± 0,08* |
| PVME | 0,52 ± 0,08 | 0,49 ± 0,10 | 0,45 ± 0,04 | 0,58 ± 0,17 | 0,54 ± 0,06 | 0,60 ± 0,12 |
| PVMA | 0,65 ± 0,18 | 0,72 ± 0,10 | 0,66 ± 0,07 | 0,72 ± 0,15 | 0,74 ± 0,15 | 0,78 ± 0,11 |
| PVTE | 0,34 ± 0,15 | 0,41 ± 0,09 | 0,42 ± 0,11 | 0,54 ± 0,20 | 0,65 ± 0,19 | 0,48 ± 0,05 |
| PVTA | 0,56 ± 0,16 | 0,70 ± 0,12 | 0,59 ± 0,13 | 0,59 ± 0,15 | 0,68 ± 0,23 | 0,74 ± 0,15 |
| PVME/PVMA | 0,82 ± 0,10 | 0,68 ± 0,06 | 0,67 ± 0,05 | 0,80 ± 0,07 | 0,75 ± 0,11 | 0,79 ± 0,24 |
| PVTE/PVTA | 0,60 ± 0,14 | 0,59 ± 0,02 | 0,72 ± 0,11 | 0,74 ± 0,07 | 0,79 ± 0,15 | 0,67 ± 0,14 |
| PPE | 69,67 ± 7,02 | 64,33 ± 7,51 | 63,33 ± 5,51 | 52,00 ± 6,73* | 50,67 ± 6,11* | 49,00 ± 5,57* |
| TEVE | 217,7 ± 12,3 | 199,0 ± 35,8 | 219,0 ± 17,1 | 202,3 ± 15,8 | 217,7 ± 14,6 | 212,3 ± 15,7 |
| PPE/TEVE | 0,32 ± 0,04 | 0,37 ± 0,12 | 0,34 ± 0,14 | 0,26 ± 0,05 | 0,21 ± 0,03 | 0,21 ± 0,04 |
| TRIV | 77,00 ± 13,00 | 63,00 ± 8,89 | 53,00 ± 12,07 | 58,33 ± 9,71 | 48,00 ± 6,56* | 48,33 ± 9,29* |
| VMEF | 1,59 ± 0,83 | 1,94 ± 0,61 | 2,03 ± 0,79 | 1,95 ± 0,59 | 1,40 ± 0,28 | 1,84 ± 0,13 |
| IE | 49,04 ± 8,07 | 68,64 ± 10,80 | 77,65 ± 10,03 | 74,26 ± 19,81 | 73,38 ± 11,95 | 76,98 ± 8,22 |
| IC | 5,52 ± 0,66 | 7,66 ± 2,69 | 8,68 ± 2,83 | 8,05 ± 0,23 | 9,10 ± 2,00 | 8,00 ± 1,38 |
| ITEI | 0,68 ± 0,02 | 0,64 ± 0,04 | 0,64 ± 0,05 | 0,51 ± 0,09 | 0,47 ± 0,03* | 0,46 ± 0,06* |

PVPUL: pico de velocidade do fluxo trans-pulmônico (m/s); PVAO: pico de velocidade do fluxo trans-aórtico (m/s); PVME: pico de velocidade da onda M do fluxo mitral (m/s); PVMA: pico de velocidade da onda A do fluxo mitral (m/s); PVTE: pico de velocidade da onda E do fluxo tricúspide (m/s); PVTA: pico de velocidade da onda A do fluxo tricúspide (m/s); PVME/PVMA: relação entre PVME e PVMA; PVTE/PVTA: relação entre PVTE e PVTA; PPE: período de pré-ejeção ventricular esquerda (mseg); PPE/TEVE: relação entre PPE e TEVE; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico (mseg); VMEF: velocidade de deformação das fibras miocárdicas (circunferências/s); IE: índice de ejeção (mL/batimento x m²); IC: índice cardíaco (L/min x m²); ITEI: índice de tempo de ejeção (mseg).

* Diferença significativa (P<0,05) em relação a M0 (pré-transplante)

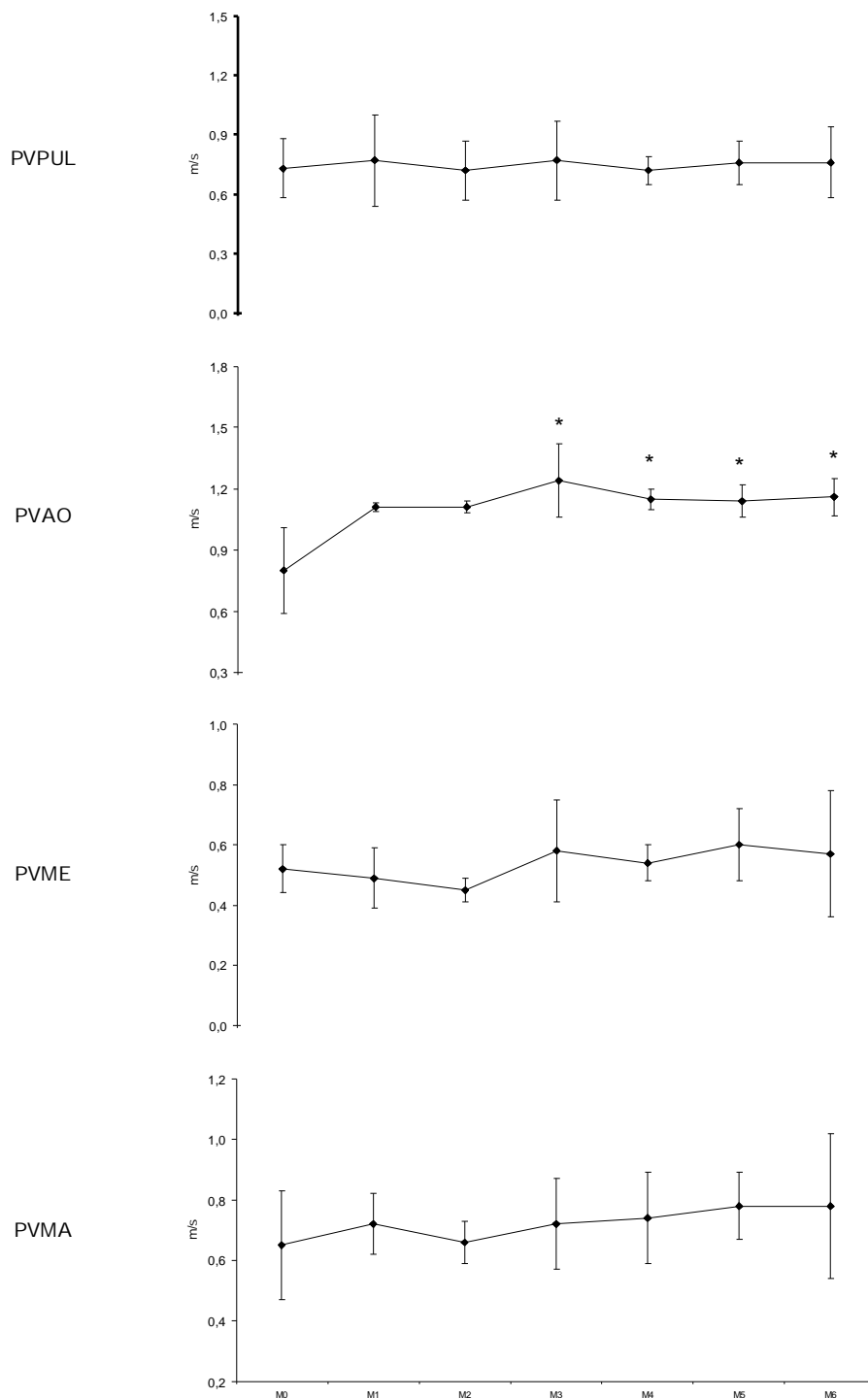


Figura 7 – Representação gráfica das médias \pm DP dos parâmetros ecocardiográficos PVPUL, PVAO, PVME e PVMA de cães chagásicos crônicos antes (M0) e após (M1 a M6) transplante de células-tronco hematopoiéticas autólogas. Unesp, Jaboticabal, SP (2007).

* Diferença significativa em relação a M0 (P<0,05).

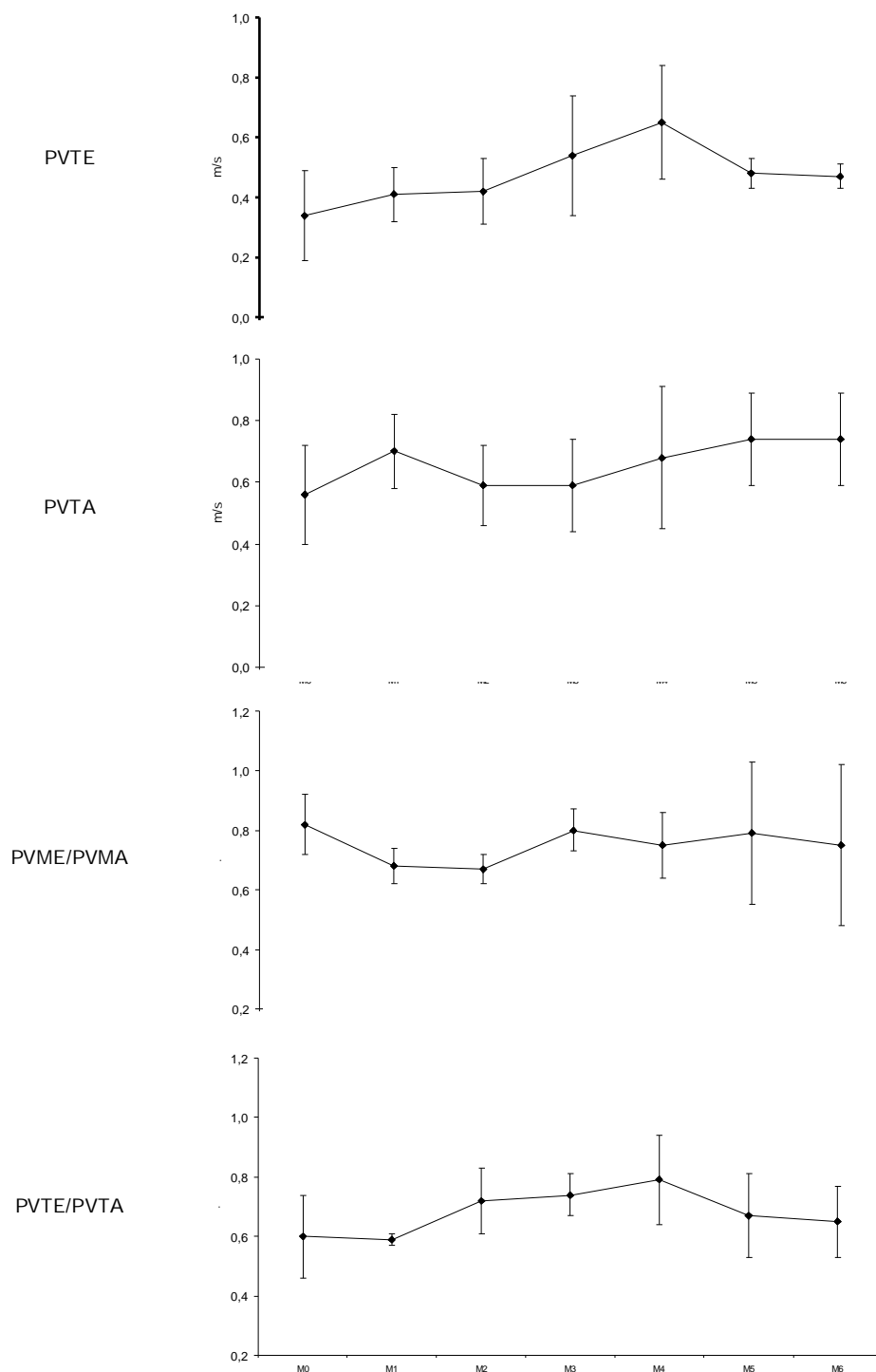


Figura 8 – Representação gráfica das médias \pm DP dos parâmetros ecocardiográficos PVTE, PVTA, PVME/PVMA e PVTE/PVTA de cães chagásicos crônicos antes (M0) e após (M1 a M6) transplante de células-tronco hematopoiéticas autólogas. Unesp, Jaboticabal, SP (2007).

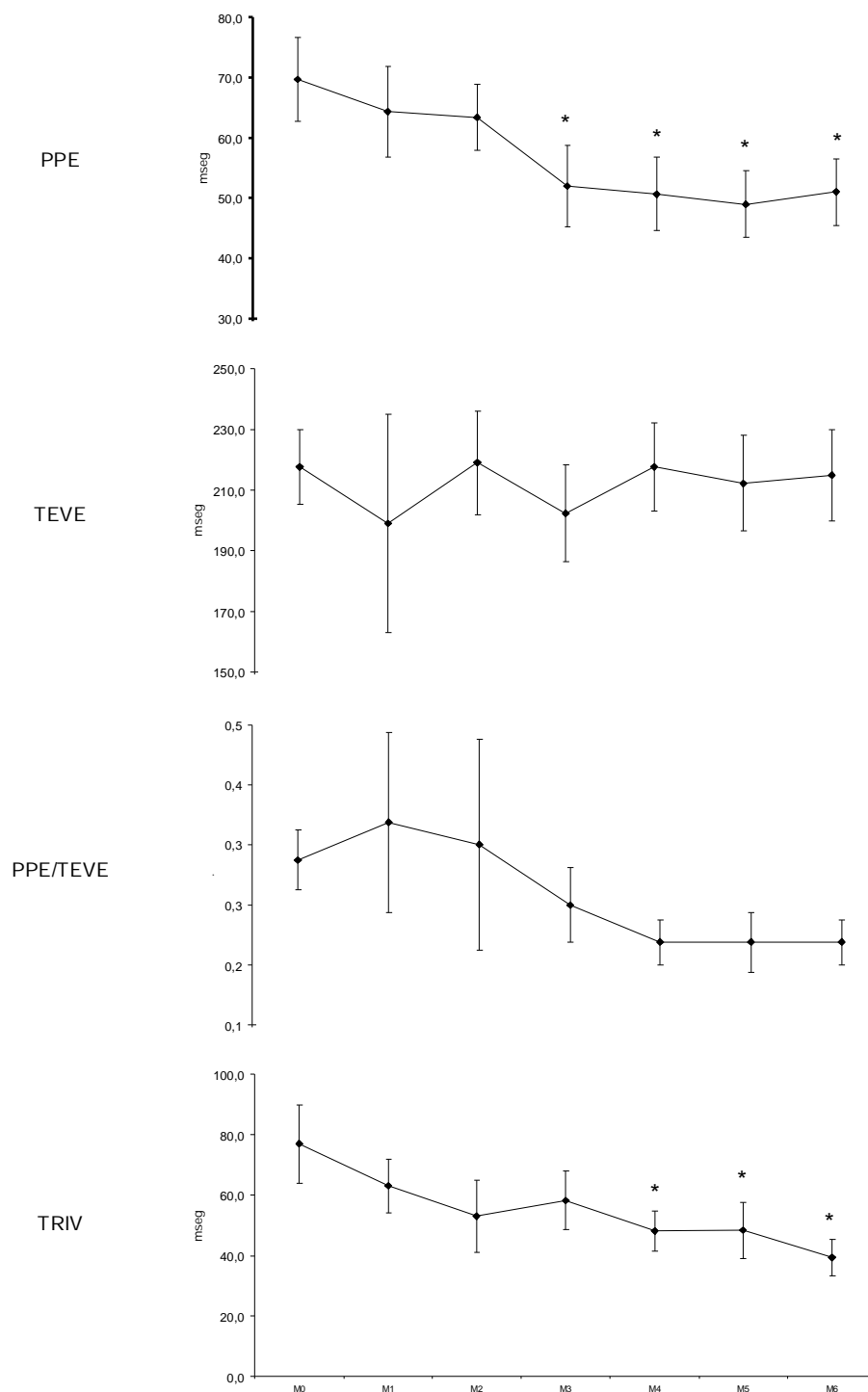


Figura 9 – Representação gráfica das médias \pm DP dos parâmetros ecocardiográficos PPE, TEVE, PPE/TEVE e TRIV de cães chagásicos crônicos antes (M0) e após (M1 a M6) transplante de células-tronco hematopoiéticas autólogas. Unesp, Jaboticabal, SP (2007).

* Diferença significativa em relação a M0 ($P < 0,05$).

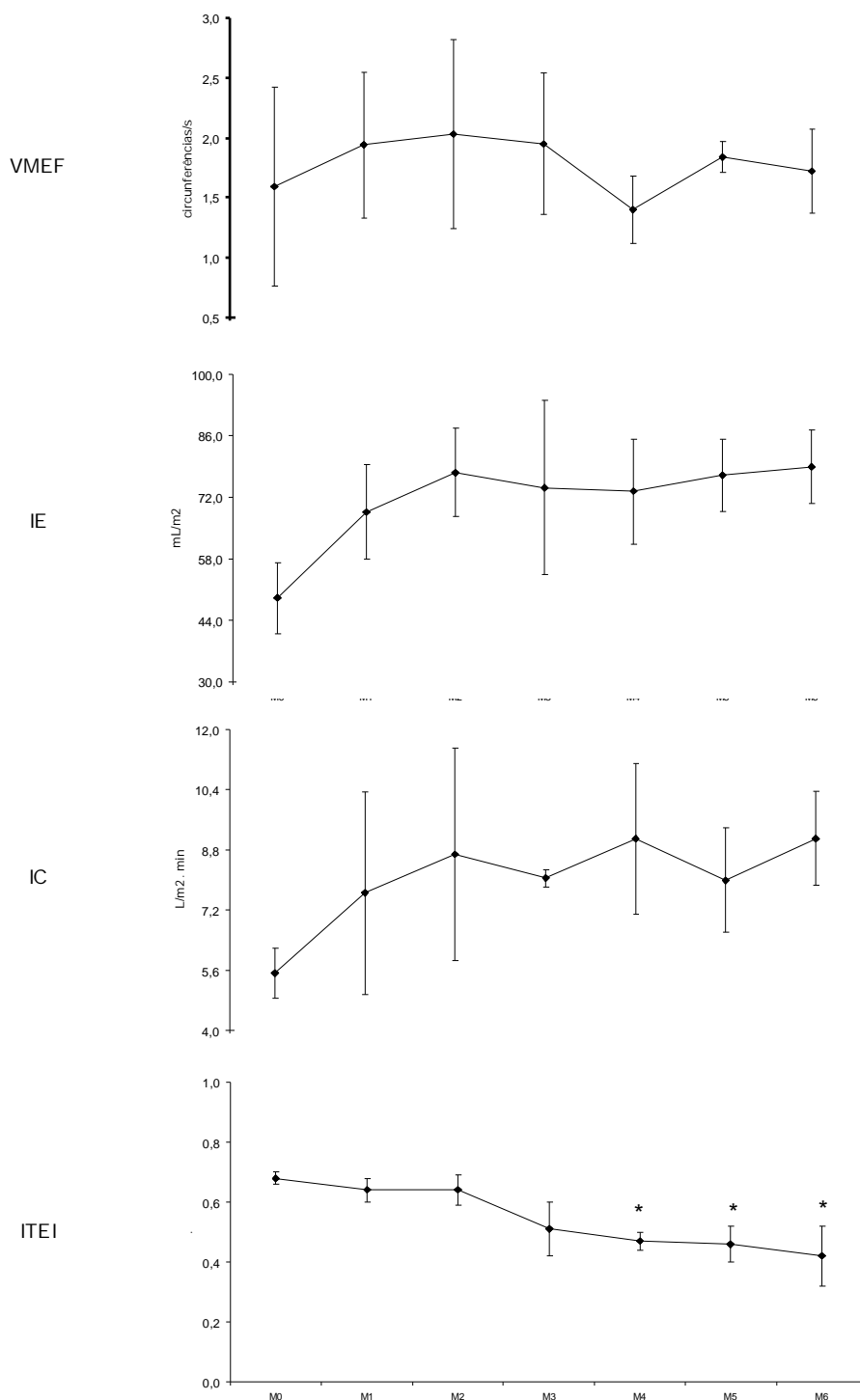


Figura 10 – Representação gráfica das médias \pm DP dos parâmetros ecocardiográficos VMEF, IE, IC e ITEI de cães chagásicos crônicos antes (M0) e após (M1 a M6) transplante de células-tronco hematopoiéticas autólogas. Unesp, Jaboticabal, SP (2007).

* Diferença significativa em relação a M0 ($P < 0,05$).

4. DISCUSSÃO

O estudo em tela evidenciou melhora de alguns parâmetros utilizados na avaliação da função cardíaca. O processo de colheita da medula óssea e separação da fração mononuclear, na qual encontram-se as células-tronco, transcorreu sem complicações, corroborando VILAS-BOAS et al (2006) que realizaram procedimento similar em pacientes com doença de Chagas e não encontraram dificuldade na colheita e no processo de fracionamento celular. O protocolo de separação utilizado neste estudo é condizente com aquele citado por VILAS-BOAS et al. (2004) e VILAS-BOAS et al. (2006), que também obtiveram taxa satisfatória de recuperação celular.

O transplante intracoronariano da solução de células-tronco foi marcado pelo desenvolvimento de distúrbios no ritmo cardíaco ao se cateterizar a artéria coronária direita. Tal fato não foi documentado por VILAS-BOAS et al. (2006) ao desenvolver a mesma técnica em 28 pacientes humanos chagásicos. Em seres humanos com angina refratária, VICARIO et al. (2005) também não documentou arritmias ou quaisquer dificuldades durante o procedimento de transplante da solução de células-tronco, embora nesse caso, tenha realizado o transplante diretamente no seio coronariano, diferindo de nosso estudo, cujo lúmen coronariano foi o sítio de liberação da solução preparada. É provável que o grau de isquemia desenvolvido pelos cães durante a cateterização coronária direita seja superior àquele apresentado pelos seres humanos incluídos nos estudos citados anteriormente, uma vez que também não encontramos dificuldades ou alterações eletrocardiográficas ao efetuarmos o mesmo procedimento na artéria coronária esquerda. Ressalta-se que as ramificações colaterais da artéria coronária direita são menos abundantes que aquelas apresentadas pela coronária esquerda, de modo que a hipoperfusão e hipóxia do miocárdio direito desenvolvida ao longo da cateterização dessa artéria tenham sido superiores àquelas verificadas durante sua realização na coronária esquerda, contribuindo com o surgimento das anormalidades eletrocardiográficas.

A oclusão temporária da artéria coronária esquerda foi bem tolerada nos animais. Embora as células transplantadas não tenham sido marcadas, é provável que

um percentual razoável tenha se implantado no tecido miocárdico. VICARIO et al. (2005), valendo-se de técnica semelhante de oclusão para aplicação da células-tronco, constatou adequada distribuição das mesmas no miocárdio lesado duas semanas após o procedimento. Embora seja considerada de fácil realização e menos invasiva, a técnica de transplante intracoronariano escolhida para este estudo apresenta como desvantagens a necessidade de treinamento adequado e equipamentos especializados para sua realização. Adicionalmente, existe a possibilidade de que parte das células infundidas não se alojem no miocárdio lesado, distribuindo-se aleatoriamente pelo organismo após serem transportadas para a circulação sistêmica (KORNOWSKI et al., 2000; YOKOYAMA et al., 2006). Contudo, diversos estudos já demonstraram que a distribuição das células mononucleares transplantadas por via trans-coronariana é viável e permite que um número considerável de células, de fato, se instale no tecido miocárdico. Em ratos com infarto do miocárdio experimentalmente induzido, SAITO et al. (2003) constataram que a maioria das células-tronco marcadas geneticamente e infundidas diretamente nas coronárias encontravam-se alojadas na região cicatricial e pericicatricial e, inclusive, expressavam cadeias pesadas da miosina e troponina I-C específica dos cardiomiócitos.

Com relação aos dois óbitos ocorridos neste estudo, VILAS-BOAS et al. (2006) também relatou um caso de morte súbita ocorrido ao longo de dois meses de avaliação pós-transplante de células-tronco autólogas, não tendo, contudo, encontrado relação causal ou temporal entre o procedimento e a morte. Um dos animais vitimados apresentou morte súbita alguns dias após o transplante celular. Arritmias ventriculares paroxísticas podem, eventualmente, ter desencadeado o quadro em questão, uma vez que a ocorrência de potenciais tardios já foi demonstrada em humanos e cães com enfermidade de Chagas (FERREIRA, 2003).

A ausência de variações clinicamente importantes nos parâmetros eletrocardiográficos após a realização da terapia celular nos pacientes incluídos neste estudo provavelmente relaciona-se à inexistência de modificações estruturais e funcionais no sistema de condução elétrica do miocárdio. Além disso, no que tange às variações nas dimensões das estruturas cardíacas, tais como septo interventricular e

parede livre do ventrículo esquerdo, mesmo que houvessem sido constatadas grandes variações em seus diâmetros, ainda sim, dada a pouca sensibilidade do exame eletrocardiográfico em detectar tais modificações, seria possível que as variáveis eletrocardiográficas se mantivessem relativamente constantes ao longo do estudo (TILLEY, 1992; GOODWIN, 2002). Ressalta-se ainda que, embora tenham sido evidenciadas importantes arritmias durante o procedimento de transplante intracoronariano, não foram observados distúrbios do ritmo ao longo dos seis meses subseqüentes. Não obstante, a ocorrência de arritmias não pode ser completamente descartada, uma vez que os animais foram avaliados pontualmente, não sendo submetidos à eletrocardiografia dinâmica pelo período de 24 horas para se descartar eventuais anormalidades eletrocardiográficas paroxísticas (GOODWIN, 2002; MUCHA, 2007).

Embora não significativo à luz da análise estatística, pode-se observar incremento dos parâmetros ecocardiográficos indicadores da função sistólica (FEJ e FEC), bem como minimização dos indicadores de pré-carga e pós-carga (IEPd e IEPs, respectivamente). Considerando-se que a FEC é influenciada por pré-carga, pós-carga e contratilidade, acredita-se que sua elevação, neste caso, deva-se à redução na pós-carga e à elevação da força contrátil do miocárdio (BOON, 1998; FERRARIS, 2007). Quanto à fração de ejeção, embora retrate a variação fracional de uma medida volumétrica (HENIK, 2002), é verdadeiramente derivada de mensurações realizadas em imagens unidimensionais. Neste estudo, os volumes ventriculares esquerdos em sístole e diástole foram calculados pela fórmula cúbica corrigida de Teichholz e, portanto, os valores de FEJ são proporcionais à FEC. Desse modo, a variação positiva constatada nos parâmetros FEC e FEJ durante o estudo em tela corrobora os achados de VILAS-BOAS et al. (2006) em seres humanos chagásicos, cujos benefícios do transplante de células-tronco autólogas sobre a função ventricular foram atestados valendo-se da fração de ejeção, com resultados satisfatórios determinados já a partir do primeiro mês pós-transplante. De forma similar, SAITO et al. (2003) também verificaram melhora da FEC e DIVEd em ratos que receberam células-tronco autólogas duas semanas após a indução de infarto do miocárdio. Em ratos com cardiomiopatia chagásica, GUARITA-

SOUZA et al. (2006) constataram elevação na fração de ejeção quatro semanas após o transplante de células-tronco mesenquimais autólogas oriundas da medula óssea em associação com cultura de mioblastos esqueléticos.

Considerando-se que a relação PPE/TEVE é inversamente proporcional à contratilidade miocárdica em face da inexistência de variações na frequência cardíaca (HENIK, 2002; SOUSA et al., 2007), tal parâmetro reflete o incremento da contratilidade nos cães submetidos ao transplante autólogo de células-tronco. Embora tenham sido encontrados indicadores de redução da pré-carga e pós-carga, a redução do volume aumenta essa relação matemática, ao passo que a resistência diminuída a diminui. Quando ambos são considerados conjuntamente, entretanto, o reflexo dessas variações sobre o parâmetro em questão é nulo (BOON, 1998), permitindo deduzir que, de fato, a redução do PPE/TEVE ao longo do período de avaliação tem relação com a melhora na contratilidade.

De fato, é provável que a capacidade contrátil tenha se aprimorado ao longo do período de avaliação. A redução do volume de ejeção é, sabidamente, desencadeadora de redução no pico de velocidade mensurado em um espectro Doppler transvalvar (BOON, 1998). Ao analisar os dados referentes aos picos de velocidade dos fluxos transvalvares, nota-se elevação de todos ao longo do período experimental, com destaque para o espectro trans-aórtico, cuja variação foi, inclusive, significativa a partir do terceiro mês pós-transplante. Considerando-se que houve redução da pré-carga nos animais estudados, é provável que o volume de ejeção tenha sofrido acréscimo em face do incremento da contratilidade ou da redução da pós-carga (FERRARIS, 2007).

No que tange à função diastólica, inicialmente todos os animais apresentavam disfunção caracterizada por inversão da relação E:A mitral, ou seja, decorrente de relaxamento ventricular inadequado. Ademais, os valores elevados do tempo de relaxamento isovolumétrico encontrados nos mesmos animais são condizentes com tal condição. O comprometimento do relaxamento miocárdico é fruto da miocardite chagásica, cujos danos às fibras musculares, componentes do sistema de sustentação e interstício resultam em focos de fibrose (CAROD-ARTAL et al., 2003;

OLIVEIRA-ALVES, 2003). A partir do quinto mês pós-transplante notou-se, entretanto, tendência de correção da relação E:A em dois cães estudados, bem como importante redução do tempo de relaxamento isovolumétrico, fatos estes compatíveis com a reestruturação da complacência diastólica do ventrículo esquerdo (BERRY et al., 2006). Em estudo conduzido por SILVA et al. (2005) em cães que apresentavam isquemia miocárdica crônica induzida experimentalmente, notou-se um menor grau de fibrose cardíaca após transplante intramiocárdico de células-tronco mesenquimais. Em outro estudo, SCHUSTER et al. (2004) demonstrou que células progenitoras endoteliais contidas na medula óssea podem induzir neovascularização miocárdica, prevenir a apoptose de miócitos e a substituição progressiva por colágeno, impedindo, portanto, o processo de remodelamento miocárdico. Todavia, para o ventrículo direito, a avaliação da função diastólica é sabidamente mais complexa sem os recursos do Doppler tecidual. Embora tal recurso não tenha sido empregado na monitoração da função cardíaca dos pacientes estudados, já se demonstrou disfunção diastólica do ventrículo direito em pacientes humanos chagásicos (BARROS et al., 2002).

Analisando-se o índice de desempenho miocárdico de Tei, pode-se observar importante recuperação da função cardíaca global ao longo do período experimental. Este índice vale-se dos tempos de contração e relaxamento isovolumétricos, bem como do tempo de ejeção ventricular esquerda, para avaliar de forma conjunta a função sistólica e diastólica (TEI, 1995; PELLET et al., 2004). Considerando-se ser o índice independente da geometria ventricular e não sendo afetado significativamente por frequência cardíaca, pressão arterial, pré-carga e pós-carga, os resultados encontrados neste estudo tornam-se condizentes com as demais variáveis que retratam a função sistólica e diastólica de forma isolada (TEI et al., 1995; SOUSA et al., 2007). A neovascularização miocárdica induzida pelo transplante de células-tronco pode, eventualmente, ter desencadeado a proliferação de miócitos cardíacos, com efeitos benéficos sobre a contratilidade e, ainda, atenuado a redução da complacência ventricular em face da fibrose miocárdica (SCHUSTER et al., 2004; SILVA et al., 2005; GUARITA-SOUZA et al., 2006).

Um dos mecanismos propostos para a melhoria dos parâmetros de avaliação da função cardíaca diz respeito à neovascularização do miocárdio lesado. A angiogênese, por sua vez, corresponde ao processo de formação de uma rede vascular que agrega diversos mecanismos, tais como brotamento, crescimento e remodelamento (YANCOPOULOS et al., 2000). O recrutamento de células musculares lisas e pericitos ao redor das células endoteliais estabiliza o tubo vascular primitivo, tornando-se, portanto, essencial na maturação do vaso em desenvolvimento. Tal processo é regulado minuciosamente pela expressão seqüenciada de diversos fatores de crescimento angiogênico, quimiocinas, moléculas de adesão e enzimas proteolíticas (SIMONS et al., 2000; YOKOYAMA et al., 2006). A população de células oriundas da medula óssea contém inúmeros tipos celulares progenitores, incluindo células-tronco hematopoiéticas, células progenitoras endoteliais e células-tronco mesenquimais. Acredita-se que as células endoteliais progenitoras aumentem a perfusão tecidual pela diferenciação em células endoteliais no sítio de neovascularização (KOCHER et al., 2001), bem como pelo aporte de um coquetel natural de citocinas angiogênicas e arteriogênicas para o miocárdio (KINNAIRD et al., 2004). Estudo recente conduzido em porcos com isquemia miocárdica crônica evidenciou o aumento do fluxo coronariano colateral, da densidade capilar e da contratilidade miocárdica regional após a aplicação trans-endocárdica de células não selecionadas provenientes da medula óssea (KAWAMOTO et al., 2003).

5. CONCLUSÕES

Baseando-se nos resultados obtidos após o desenvolvimento da metodologia proposta, foi possível concluir que:

- 1) O transplante intracoronariano de células-tronco autólogas é exequível em cães com cardiomiopatia chagásica;
- 2) Embora as células mononucleares não tenham sido marcadas, a evolução positiva em alguns parâmetros ecocardiográficos ao longo do período experimental sugere ser esta via satisfatória no sentido de permitir o alojamento celular no tecido miocárdico;
- 3) As variações observadas nos parâmetros sistólicos demonstram efeitos favoráveis sobre a capacidade contrátil do miocárdio no período pós-transplante;
- 4) As variações observadas nos parâmetros diastólicos do ventrículo esquerdo revelam recuperação da complacência ventricular no período pós-transplante, com minimização da disfunção diastólica;
- 5) Arritmias e alterações eletrocardiográficas sugestivas de hipóxia do miocárdio representam as principais complicações verificadas durante o procedimento de cateterização intracoronariana direita, ao passo que a cateterização da artéria coronária esquerda é bem tolerada em pacientes caninos com cardiomiopatia chagásica;
- 6) Em cães chagásicos, o transplante intracoronariano de células-tronco autólogas não desencadeia alterações clinicamente importantes nos parâmetros eletrocardiográficos e na pressão arterial no período de seis meses pós-transplante;
- 7) O transplante de células-tronco hematopoiéticas autólogas traz benefícios à função cardíaca de cães com cardiomiopatia chagásica crônica.

6. REFERÊNCIAS¹

ASAHARA, T.; KALKA, C.; ISNER, J.M. Stem cell therapy and gene transfer for regeneration. *Gene Ther.*, v.7, p.421-457, 2000.

BARROS, M.V.; MACHADO, F.S.; RIBEIRO, A.L. et al. Detection of early right ventricular dysfunction in Chagas' disease using Doppler tissue imaging. *Journal of the American Society of Echocardiography*. v.15, n.10, p.1197-1201, 2002.

BERRY, M.F.; ENGLER, A.J.; WOO, Y.J. et al. Mesenchymal stem cell injection after myocardial infarction improves myocardial compliance. *American Journal of Physiology Heart Circulation Physiology*. V.290, n.6, p.2196-2203, 2006.

BOON, J.A. *Manual of veterinary echocardiography*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1998. 487p.

BOYUN, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood: isolation of mononuclear cells by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1g. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* v.21, supl.97, p.77-89, 1968.

CAMACHO, A.A. et al. Miocarditis chagásica aguda experimental en perros. In.: CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 14., 1994, Acapulco, México. Memórias... p.108.

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.
NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. List of journals indexed in Index Medicus. Washington, 1997. 240p.

CAMACHO, A.A.; TEIXEIRA, M.S.S.; OLIVEIRA-ALVES, R. Electrocardiography in adult dogs infected with *Trypanosoma cruzi* during acute and chronic phases. *Ars Veterinaria*, Jaboticabal, v. 16, n. 3, p. 158-164, 2000.

CARMELIET, P.; LUTTUN, A. The emerging role of the bone marrow-derived stem cells in (therapeutic) angiogenesis. *Thromb. Haemost.*, v.86, p.289-297, 2001.

CAROD-ARTAL, F.J.; VARGAS, A.P.; MELO, M. et al. American tripanosomiasis (Chagas' disease): an unrecognised cause of stroke. *Journal of Neurology and Neurosurgery Psychiatry*. v.74, n.4, p.516-518, 2003.

FERRARIS, S.R. Ecocardiografia. In: BELERENIAN, G.; MUCHA, C.J.; CAMACHO, A.A. et al. *Afecciones cardiovasculares en pequeños animales*. 2.ed. Buenos Aires: Inter-médica, 2007. p.129-177.

FERREIRA, W.L. Estudo da eletrocardiografia de alta resolução em cães. 2003, 71f. Tese (Doutorado em Clínica Médica Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, Jaboticabal, São Paulo, 2003.

FUCHS, S.; BAFFOUR, R.; ZHOUR, Y.F. et al. Transendocardial delivery of autologous bone marrow enhances collateral perfusion and regional functions in pigs with chronic experimental myocardial ischemia. *J. Am. Coll. Cardiol.*, v.37, p.1726-1732, 2001.

FUCHS, S.; KORNOWSKI, R.; WEISZ, G. et al. Safety and feasibility of transendocardial autologous bone marrow transplantation in patients with advanced heart disease. *Am. J. Cardiol.*, v.97, p.823-829, 2006.

GUARITA-SOUZA, L.C.; CARVALHO, K.A.; WOITOWICZ, V. et al. Simultaneous autologous transplantation of cocultured mesenchymal stem cells and skeletal

myoblasts improves ventricular function in a murine model of Chagas disease. *Circulation*. v.113, n.1, suplemento 1, p.120-124, 2006.

GOODWIN, J.K. Eletrocardiografia. In: TILLEY, L.P.; GOODWIN, J.K. Manual de cardiologia para cães e gatos. 3.ed., São Paulo: São Paulo, 2002. p.39-65.

GRAPHPAD. InStat guide to choosing and interpreting statistical tests. San Diego: GraphPad Software, 1998. Disponível em <<http://www.graphpad.com>>. Acesso em: 28/set./2003.

HENIK, R.A. Ecocardiografia e ultra-som Doppler. In: TILLEY, L.P.; GOODWIN, J.K. Manual de cardiologia para cães e gatos. 3.ed., São Paulo: São Paulo, 2002. p.67-94.

KAMIHATA, H.; MATSUBARA, H.; NISHIUE, T. et al. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances perfusion and regional function via side supplí of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation*, v.104, p.1046-1052, 2001.

KAWAMOTO, A.; TKEBUCHAVA, T.; YAMAGUCHI, J. et al. Intramyocardial transplantation of autologous endotelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circulation*. v.107, p.461-468. 2003.

KINNAIRD, T.; STABILE, E.; BURNETT, M.S. et al. Marrow-derived stromal cells genes encoding a broad spectrum of arteriogenesis through paracrine mechanism. *Circulation Research*. v.94, p.678-685. 2004.

KLEIN, R.P. Avaliação clínica e contagem neuronal em gânglios nervosos cardíacos em cães experimentalmente infectados com *Trypanosoma cruzi*. 1995.

109f. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1995.

KOCHER, A.A.; SCHUSTER, M.D.; SZABOLES, M.J. et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblast prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nature Medicine*. v.7, p.430-436. 2001.

KORNOWSKI, R. et al. Delivery strategies to achieve therapeutic myocardial angiogenesis. *Circulation*, v.101, p.454-458, 2000.

MUCHA, C.J. Electrocardiografía ambulatoria y de contacto. In: BELERENIAN, G.; MUCHA, C.J.; CAMACHO, A.A. et al. *Afecciones cardiovasculares en pequeños animales*. 2.ed. Buenos Aires: Inter-médica, 2007. p.121-128.

MUCHA, C.J.; CAMACHO, A.A. Determinación de la presión arterial. In.: BELENERIAN, G.C.; MUCHA, C.J.; CAMACHO, A.A. *Afecciones cardiovasculares en pequeños animales*, Buenos Aires: Inter-Médica, 2001. p.59-64.

OLIVEIRA-ALVES, R. Avaliações ecodopplercardiográfica, eletrocardiográfica computadorizada e dinâmica (sistema Holter) e clínico-patológica em cães com cardiomiopatia chagásica experimental. 2003, 90f. Tese (Doutorado em Clínica Médica Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, Jaboticabal, São Paulo, 2003.

PELLETT A.; TOLAR W.G.; MERWIN, B.S. et al. The Tei index: methodology and disease state values. *Echocardiography*, v.21, n.7, p.669-672, 2004.

SAITO, T.; KUANG, J.Q.; LIN, C.C.H. et al. Transcoronary implantation of bone marrow stromal cells ameliorates cardiac function after myocardial infarction. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. V.126, n.1, p.114-122, 2003.

SELDINGER, S.I. Catheter replacement of the needle in percutaneous arteriography: a new technique. *Acta Radiologica*. v.39, n.5, p.369-376, 1953.

SHAKE, J.G.; GRUBER, P.J.; BAUMGARTNER, W.A. et al. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann. Thorac. Surg.*, v.73, p.1919-1925, 2002.

SCHUSTER, M.D.; KOCHER, A.A.; MARTENS, T.P. et al. Myocardial neovascularization by bone marrow angioblasts results in cardiomyocyte regeneration. *American Journal of Physiology Heart Circulation Physiology*. v.287, n.2, p.525-532, 2004.

SILVA, G.V.; LITOVSKY, S.; ASSAD, J.A. et al. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation*. v.111, n.2, p.150-156, 2005.

SIMONS, M.; BONOW, R.O.; CHRONOS, N.A. et al. Clinical trials in coronary angiogenesis: issues, problems, consensus: an expert panel summary. *Circulation*. v.102, p.73-86. 2000.

SOUSA, M.G. Ecodopplercardiografia de cães submetidos ao teste de estresse com dobutamina, em diferentes modelos experimentais de cardiomiopatia. 2004, 134f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, Jaboticabal, São Paulo, Brasil, 2004.

SOUSA, M.G.; CARARETO, R.; DE-NARDI, A.B. et al. Effects of isoflurane on Tei-index of myocardial performance in healthy dogs. *Canadian Veterinary Journal*. v.48, p.277-283, 2007.

STRAUER, B.E.; BREHM, M.; ZEUS, T. et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation*, v.106, p.1913-1918, 2002.

TEI, C. New non-invasive index for combined systolic and diastolic ventricular function. *J. Cardiol.*, v.26, n.2, p.135-136, 1995.

TEI, C.; LING, L.H.; HODGE, D.O. et al. New index of combined systolic and diastolic myocardial performance: a simple and reproducible measure of cardiac function – a study in normals and dilated cardiomyopathy. *J. Cardiol.*, v.26, n.6, p.357-366, 1995.

TILLEY, L.P. *Essentials of canine and feline electrocardiography*. 3. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992. 470p.

TOMITA, S.; MICKIE, D.A.; WEISEL, R.D. et al. Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, v.123, p.1132-1140, 2002.

VICARIO, J.; CAMPO, C.; PIVA, J. et al. One-year follow-up of transcatheter sinus administration of autologous bone marrow in patients with chronic refractory angina. *Cardiovascular Revascularization Medicine*. v.6, p.99-107, 2005.

VILAS-BOAS, F.; FEITOSA, G.S.; SOARES, M.B.P. et al. Bone marrow cell transplantation to the myocardium of a patient with heart failure due to Chagas' disease. *Arq. Brasil. Cardiol.*, v.82, n.2, p.185-187, 2004.

VILAS-BOAS, F.; FEITOSA, G.S.; SOARES, M.B.P. et al. Early results of bone marrow cell transplantation to the myocardium of patients with heart failure due to Chagas disease. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. v.87, n.2, p.159-166, 2006.

WOLF, R.; CAMACHO, A.A.; SOUZA, R.C.A. Eletrocardiografia computadorizada em cães. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, Belo Horizonte, v. 52, n. 6, p. 610-615, 2000.

YANCOPOULOS, G.D.; DAVIS, S.; GALE, N.W. et al. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*. v.407, p.242-248. 2000.

YOKOYAMA, S.I.; NOBORU, F.; LI, Y. et al A strategy of retrograde injection of bone marrow mononuclear cells into the myocardium for the treatment of ischemic heart disease. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. v.40, p.24-34. 2006.

Capítulo III



FUNÇÃO CARDÍACA DE CÃES COM CARDIOMIOPATIA INDUZIDA PELA DOXORRUBICINA SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos tempos tem se discutido bastante acerca do potencial terapêutico das células-tronco. Trata-se, na verdade, da tentativa de conhecer um tratamento alternativo a diversas enfermidades já conhecidas. Sabe-se que as células-tronco possuem a capacidade de auto-renovação e geração de células diferenciadas, sendo portanto, uma população de células imaturas progenitoras, as quais acredita-se poder fornecer ou substituir células nos diversos tecidos do organismo (DOHMANN et al., 2005).

Especificamente no que tange a função cardíaca, diversos estudos vêm mostrando que a terapia celular pode, potencialmente, apresentar benefícios sobre a função cardíaca comprometida, tal como na doença isquêmica do miocárdico (SAITO et al.; 2003; PERIN et al., 2004; FUCHS et al., 2006).

Embora apresente diversas indicações na oncologia médica e veterinária, a doxorrubicina tem seu uso limitado pelo desenvolvimento de uma cardiomiopatia dose-dependente que pode, inclusive, resultar em insuficiência cardíaca congestiva (SUSANECK, 1983; MAUDLIN et al., 1992; DE-ANDRADE, J.N.B. et al., 2005; SILVA & CAMACHO, 2005; SOUZA & CAMACHO, 2006). Em um modelo experimental de cardiomiopatia induzida pela doxorrubicina em ratos, demonstraram-se modificações favoráveis nos parâmetros de função cardíaca determinados por ecocardiografia e em um sistema de órgão isolado, após terapia com células mononucleares oriundas da medula óssea (ISHIDA et al., 2004).

Considerando as diversas aplicações da doxorrubicina na prática veterinária e humana, bem como valendo-se da cardiotoxicidade desse fármaco para o desenvolvimento de um modelo experimental de cardiomiopatia dilatada, objetivou-se,

com este estudo, avaliar a função cardíaca de cães tratados cronicamente com doxorrubina e submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas autólogas, baseando-se em parâmetros eletrocardiográficos, ecodopplercardiográficos e de pressão arterial.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local da realização da pesquisa

O experimento foi conduzido nos Laboratórios de Cardiologia, Patologia Clínica e Reprodução Animal do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” (HVGLN) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista – Unesp – campus de Jaboticabal – SP.

2.2. Animais

Foram utilizados sete cães adultos (seis fêmeas e um macho), sem raça definida, com peso médio de 17,4 Kg, selecionados a partir do canil da Prefeitura Municipal de Araraquara - SP.

Uma vez selecionados, os cães foram avaliados clinicamente valendo-se de um detalhado exame físico e do perfil laboratorial, composto, inclusive, de sorologia para leptospirose e toxoplasmose, buscando-se excluir possíveis enfermidades sistêmicas. Subseqüentemente, procedeu-se a realização de exame eletrocardiográfico e ecodopplercardiográfico nos cães, de modo a descartar quaisquer cardiopatias.

Os animais receberam imunoprofilaxia¹ contra parvovirose, coronavirose, hepatite, leptospirose, parainfluenza, cinomose e raiva, além de vermifugação² antes do início do protocolo experimental. Além disso, todos os animais receberam, diariamente, ração comercial³ para cães e água à vontade. Foram, ainda, condicionados ao ambiente experimental, por meio de visitas à sala de ecocardiografia, além de passeios com a equipe de trabalho.

Tendo terminado o período de seleção e condicionamento dos animais, os cães foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais:

¹ Vanguard® HTLP 5/CV L e Defensor® – Pfizer – Guarulhos – SP.

² Panacur Plus® – Intervet – São Paulo – SP.

³ Friskies Alpo® – Nestlé Purina – São Paulo – SP.

- G1: células-tronco – quatro fêmeas, peso médio 18,7 kg;
- G2: controle – duas fêmeas e um macho, peso médio 16,1 kg.

2.2.1. Indução da cardiomiopatia pela doxorrubicina

A indução da cardiomiopatia foi realizada da mesma forma em ambos os grupos. Para tanto, foram utilizados frascos-ampola contendo 50 miligramas de cloridrato de doxorrubicina¹, sob a forma de pó liofilizado. Imediatamente antes da infusão, a doxorrubicina foi diluída em solução fisiológica² 0,9% estéril, obtendo-se uma concentração final de 2 mg/mL (SOUZA, 2004, SILVA & CAMACHO, 2005; SOUZA & CAMACHO, 2006).

Os cães receberam 30 mg de cloridrato de doxorrubicina por m² de superfície corpórea a cada 21 dias, por via intravenosa lenta, perfazendo uma dose cumulativa de 210 mg/m² ao longo de sete aplicações. Previamente a cada aplicação da doxorrubicina, administrou-se cloridrato de prometazina³ (0,5 mg/kg) por via intravenosa para minimizar a ocorrência de efeitos indesejados decorrentes da liberação de histamina (DAL FARRA et al., 1995; DIAS et al., 2003; SOUZA, 2004; SILVA & CAMACHO, 2005; SOUZA & CAMACHO, 2006).

2.3. Terapia com células-tronco

Terminado o período de indução da cardiomiopatia, os animais foram avaliados clinicamente por um mês. Em seguida, os animais do grupo G1 foram submetidos ao transplante autólogo de células-tronco e, subseqüentemente, avaliados pelo período de seis meses.

¹ Adriblastina® RD 50 mg – Pharmacia & Upjohn – São Paulo – SP.

² Solução Fisiológica de NaCl a 0,9% – JP Indústria Farmacêutica – Ribeirão Preto – SP.

³ Fenegan, Aventis-Pharma®, São Paulo – SP

2.3.1. Colheita da medula óssea

Para colheita da medula óssea, procedeu-se a anestesia geral dos animais. Desse modo, cada cão recebeu propofol¹ (8 mg/kg IV), sendo intubado com sonda de Magill de diâmetro compatível com o porte do animal. Ato contínuo, a sonda foi conectada a um circuito anestésico do tipo semi-fechado², por onde o cão recebeu sevofluorano³ diluído em oxigênio puro (30 mL/kg/minuto) em concentração que aproximava-se de 1,0 CAM (2,36%), mensurada em analisador de gases digital⁴.

Estando o animal anestesiado, procedeu-se o preparo cirúrgico da região ilíaca direita, com tricotomia e anti-sepsia apropriadas. Utilizou-se uma agulha para punção de medula óssea⁵. Tal instrumento foi introduzido cuidadosamente de modo paralelo ao eixo principal da crista ilíaca direita. Ao cessar a resistência à introdução da agulha, o mandril foi removido e iniciou-se a aspiração da medula óssea (Apêndice 2). Para tanto, seringas de 20 mL previamente heparinizadas (20 U/mL) foram utilizadas. Foram coletados aproximadamente 40 mL de medula óssea em cada um dos animais de G1. Tendo terminado o procedimento de colheita, encerrou-se a oferta do anestésico, sendo o circuito saturado com oxigênio. A sonda de Magill foi removida e aguardou-se a recuperação do animal.

2.3.2. Separação das células-tronco

Imediatamente após colheita de tecido hematopoiético central, uma pequena amostra do material foi utilizada para confeccionar um esfregaço que, uma vez corado, foi avaliado para se determinar a existência de sangue periférico. O material foi submetido à contagem global de células⁶, a ser empregada posteriormente para quantificação da amostra e cálculo da recuperação celular. Em seguida, procedeu-se a

¹ Profolen, Blausilgel®, Cotia – SP

² Aparelho de anestesia inalatória KT-10, série Nissei, Takaoka®, São Paulo – SP

³ Sevocris, Cristália®, Itapira – SP

⁴ DX 2010, Dixtal®, Manaus – AM

⁵ Agulha Rosenthal, Beckton-Dicknson®, Curitiba – PR

⁶ Contador automático de células ACT-8, Coulter, Estados Unidos

separação da fração de células mononucleares, na qual encontram-se as células-tronco hematopoiéticas e mesenquimais, valendo-se da metodologia descrita por BOYUN (1968). Todo o procedimento foi realizado em fluxo laminar vertical do Laboratório de Reprodução Animal da FCAV-UNESP-Jaboticabal para evitar contaminação do material.

A separação foi realizada em gradiente de densidade com ficol ($d=1,077$ g/mL). Assim, o volume inicial de 40 mL de medula óssea foi dividido em duas alíquotas de 20 mL colocadas em tubos plásticos estéreis de 50 mL. Em cada tudo foram acrescentados 20 mL de solução fisiológica¹, perfazendo um volume de 40 mL, o qual foi cuidadosamente homogeneizado com auxílio de um pipetador automático². Ambos os tubos foram centrifugados³ a 400G por 10 minutos à temperatura de 20°C. Ao término dessa etapa, procedeu-se a retirada do sobrenadante, constituído especialmente da porção gordurosa da medula óssea. Os tubos foram, então, completados com solução fisiológica até o volume de 40 mL, sendo subseqüentemente homogeneizados com o pipetador automático. Outros dois todos plásticos estéreis de 50 mL foram preparados, sendo transferidos 10 mL de ficol⁴ para cada um deles com auxílio de uma pipeta graduada estéril. A medula óssea homogeneizada em solução fisiológica foi cuidadosamente transferida para os tubos contendo ficol, de modo que cada tubo continha 40 mL de medula óssea + NaCl 0,9% e 10 mL de ficol. Desse modo, foram constituídos dois tubos com tal composição.

Em seguida, os tubos foram centrifugados a 400G por 15 minutos à temperatura de 20°C. Ao término da centrifugação, parte do sobrenadante foi removido com auxílio do pipetador automático. Ato contínuo, o anel de células mononucleares localizados entre as fases de ficol e soro foi aspirado e transferido para um novo tubo plástico estéril de 50 mL. Esse procedimento foi realizado nos dois tubos e o material restante (ficol + células vermelhas) foi descartado. Subseqüentemente, os botões de células mononucleares recém transferidos para os novos tubos foram acrescidos de

¹ Solução fisiológica NaCl 0,9%, JP Indústria Farmacêutica, Ribeirão Preto – SP

² Stripettor, Corning®, São Paulo – SP

³ Centrífuga Universal 32R, Hettich Zentrifugen®, Tuttlingen, Alemanha

⁴ Ficoll-Paque Plus, Amersham Biosciences®, Uppsala, Suécia

meio de cultura celular¹ até o volume de 40 mL em cada tubo, os quais foram novamente centrifugados a 400G por 7 minutos à temperatura de 20°C. Ao término do procedimento, o sobrenadante foi removido utilizando-se do pipetador automático e o botão de células localizado no fundo dos tubos foi ressuspensionado em 15 mL de solução de plasma canino a 5%, previamente preparada com material originário do animal em questão. Uma vez homogeneizada na solução de plasma, a suspensão celular foi filtrada em membrana de 150 µm. O filtrado foi novamente centrifugado a 400G por 10 minutos à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensionadas em 15 mL de solução de plasma canino a 5%. Uma alíquota foi removida para quantificação celular em contador automático.

Baseado na quantificação anterior, o volume a ser aspirado foi determinado, de modo que fossem transferidas para um novo tubo aproximadamente 100 milhões de células mononucleares. Tendo sido transferido volume correspondente, acrescentou-se solução de plasma canino a 5%, resultando numa solução celular, cuja concentração final foi de 10 milhões de células mononucleares por mililitro. Subseqüentemente, duas seringas estéreis de três mililitros foram utilizadas para aspirar seis mililitros da solução celular final, que foram então conservados sob refrigeração até o momento da aplicação intracoronariana. Parte do material filtrado foi utilizado para determinação da viabilidade celular em câmara de Neubauer pela técnica dye exclusion, baseada no líquido de turk, que lisa as hemáceas e cora o núcleo dos granulócitos, e no azul de tripan, que cora apenas as células mortas.

No Apêndice 3 podem ser visibilizadas imagens do processo de separação celular descrito anteriormente.

2.3.3. Transplante das células-tronco

Para proceder a cateterização coronariana os animais foram submetidos à anestesia geral inalatória. Como medicação pré-anestésica os cães receberam

¹ RPMI 1640, Sigma®, Saint Louis, Estados Unidos

levomepromazina¹ (1 mg/kg IV). Decorridos 15 minutos, procedeu-se a indução anestésica com propofol² (8 mg/kg IV), sendo os animais subsequentemente intubados com sonda orotraqueal de Maggil de diâmetro compatível com o porte do paciente. Uma vez posicionada, o cuff foi inflado e a sonda imediatamente conectada a um circuito anestésico semi-fechado, através do qual vaporizou-se sevoflurano³ em concentração que se aproximava de 1,0 CAM (2,36%), diluído em oxigênio 100% (30 mL/kg/hora).

Estando o animal em plano anestésico adequado, procedeu-se a tricotomia e anti-sepsia da face interna do membro pélvico direito. O animal foi então posicionado sobre uma mesa hemodinâmica móvel⁴, acoplada ao angiógrafo em arco⁵. A cateterização foi realizada por meio da técnica de Seldinger (SELDINGER, 1953). Para tanto, a artéria femoral direita foi localizada e exposta por dissecação simples da pele, tecido subcutâneo e musculatura com auxílio de lâmina de bisturi, tesoura romba-romba e pinça anatômica. Concluído o procedimento, dois fios de reparo foram passados ao redor do vaso para facilitar sua exposição. Desse modo, uma punção foi feita na face exposta da artéria utilizando-se de uma lâmina de bisturi. Ato contínuo, a artéria foi cateterizada com o cateter introdutor/dilatador⁶ com guia de diâmetro 8F (Apêndice 4). Para evitar o deslocamento indevido do cateter, o introdutor foi imediatamente fixado à pele adjacente à área dissecada com fio mononylon 3-0. Pelo introdutor/dilatador foi então inserido o cateter guia Judkins esquerdo⁷ de diâmetro 6F. Uma válvula hemostática com duas vias⁸ (válvula em Y) foi imediatamente acoplada ao cateter Judkins para impedir o extravasamento de sangue e, simultaneamente, permitir a introdução do cateter subsequente. Procedeu-se, então, a introdução do cateter balão para angioplastia⁹ (9 x 3,5), em cujo lúmen foi previamente introduzida a

¹ Neozine, Aventis-Pharma®, São Paulo – SP

² Profolen, Blausilgel®, Cotia – SP

³ Sevocris, Cristália®, Itapira – SP

⁴ Angio Cardio CGT, J. Procópio Equipamentos Hospitalares, Itapetecica da Serra – SP

⁵ OEC 9800 Plus, GE® Medical Systems S.A., Buc Cedex, França

⁶ Cateter introdutor/dilatador com guia, Bioxxi®, Rio de Janeiro – RJ

⁷ Cateter guia Wiseguide Judkins Left, Boston Scientific Scimed®, Maple Grove, Estados Unidos

⁸ Válvula hemostática com duas vias, Bioxxi®, Rio de Janeiro – RJ

⁹ Cateter balão Over-The-Wire Raptor, Bioxxi®, Rio de Janeiro – RJ

guia para cateter de angioplastia¹ (0,14 x 19 cm). Com auxílio de imagens fluoroscópicas² em tempo real, o cateter Judkins foi introduzido através da artéria femoral e artéria aorta, sendo posicionado no seio coronariano, imediatamente superior aos folhetos da válvula aórtica. Realizou-se a angiografia coronariana com aplicação de ioxitalamato de meglumina e de sódio³ (cinco mililitros em injeção rápida). Com as coronárias contrastadas (Apêndice 5), o cateter Judkins esquerdo foi posicionado frente ao óstio coronariano esquerdo e, imediatamente, o guia para cateter de angioplastia introduzido na coronária esquerda com auxílio de um torquer⁴ acoplado para facilitar a movimentação do guia. Infundindo-se ioxitalamato de meglumina e de sódio de modo intermitente, o guia foi introduzido adequadamente na coronária esquerda e o cateter balão posicionado de forma correta. Sob visualização fluoroscópica, o cateter balão foi distendido com solução fisiológica. Tal procedimento foi realizado imediatamente antes da aplicação da solução de células-tronco mantidas sob refrigeração e por tempo inferior a 10 segundos. Inicialmente cateterizou-se o ramo interventricular paraconal, no qual foram liberados três mililitros da solução preparada, contendo cerca de 30 milhões de células. Subsequentemente, cateterizou-se o ramo circunflexo, onde foi injetado três mililitros da solução preparada, contendo adicionais 30 milhões de células.

Tendo finalizado o procedimento, todos os cateteres foram removidos, exceto o introdutor/dilatador. Previamente à sua remoção, procedeu-se a ligadura parcial da artéria femoral, de modo a evitar hemorragias. O cateter introdutor/dilatador foi retirado e a artéria femoral completamente ligada com fio mononylon 3-0 em dois locais distintos, sendo um anterior e outro posterior ao sítio de incisão por onde foi introduzido o cateter dilatador. Em seguida, procedeu-se a aproximação do subcutâneo com fio categute cromado 3-0 e a síntese da pele com fio mononylon 3-0. A ferida cirúrgica foi limpa e um curativo com anti-séptico feito no local. Após o procedimento, o fornecimento do anestésico foi suspenso, mantendo-se apenas o fornecimento de oxigênio até a remoção da sonda orotraqueal. Os animais receberam como fármacos

¹ Guia para cateter de angioplastia, Bioxxi[®], Rio de Janeiro – RJ

² OEC 9800 Plus, GE[®] Medical Systems S.A., Buc Cedex, França

³ Telebrix Coronar, Guerbet[®], Rio de Janeiro – RJ

⁴ Torquer para cateter guia, Bioxxi[®], Rio de Janeiro – RJ

antibiótico e anti-inflamatório benzilpenicilina benzatina¹ (25.000 UI/kg IM) e meloxicam² (0,2 mg/kg SC), respectivamente.

2.4. Avaliação dos animais

2.4.1. Eletrocardiografia

Para a realização do ECG, foi empregado aparelho computadorizado³, que permitiu a obtenção simultânea de 6 derivações (DI, DII, DIII, aVL, aVF e aVR), na velocidade de 50 mm/segundo. Para tanto, utilizou-se a calibração de um milivolt igual a um centímetro, sendo o exame realizado de acordo com técnica descrita por TILLEY (1992).

Uma vez o cão estando em decúbito lateral direito, foram acoplados quatro eletrodos, sendo um em cada membro locomotor, permitindo a obtenção do traçado eletrocardiográfico que foi gravado em arquivo eletrônico para posterior interpretação. Foram mensurados a duração e amplitude da onda P (Pms e PmV, respectivamente), a duração do intervalo PR (PRms), a duração do complexo QRS (QRSms), a amplitude da onda R (RmV) e a duração do intervalo QT (QTms). Para cada uma das variáveis, foram consideradas as médias de três medidas consecutivas. Adicionalmente, mensurou-se a frequência cardíaca (FC) e registraram-se as alterações no ritmo cardíaco e no segmento ST (WOLF et al., 2000).

2.4.2. Pressão arterial

A pressão arterial foi obtida por meio de aparelho de pressão não-invasiva do tipo oscilométrico⁴.

¹ Benzatron, Ariston[®], São Paulo – SP

² Movatec, Boehringer Ingelheim[®], Itapeverica da Serra – SP

³ Módulo de aquisição de eletrocardiograma para computador modelo ECG-PC – marca TEB – São Paulo – SP

⁴ DX 2710 – Dixtal[®] – Manaus – AM.

Para a determinação da pressão, os cães foram inicialmente colocados em decúbito lateral direito e, em seguida, posicionado um manguito de monitoração de pressão ao redor da base da cauda do animal. Foram aferidas as pressões arteriais sistólica (PAS), média (PAM) e diastólica (PAD), sendo considerado como valor final a média de três medidas consecutivas (MUCHA & CAMACHO, 2001).

2.4.3. Ecodopplercardiografia

Para realização da ecocardiografia, foi empregado ecodopplercardiógrafo¹, com transdutor multifrequencial de 5,0 – 7,5 MHz, sendo os dados armazenados na memória do aparelho para realização das medidas e cálculos posteriormente. Simultaneamente ao exame ecocardiográfico, também foi realizado ECG bipolar monocanal, para permitir a mensuração de algumas variáveis dependentes do traçado eletrocardiográfico, além de facilitar a observação imediata de eventuais arritmias.

Com o animal posicional em decúbito lateral direito, localizou-se a janela paraesternal direita entre o quarto e quinto espaços intercostais. A partir da visualização bidimensional do ventrículo esquerdo em eixo transversal, obteve-se imagem em modo-M, com o cursor posicionado eqüidistante dos músculos papilares em plano cordal. Assim, foram mensurados o diâmetro interno do ventrículo esquerdo na sístole (DIVEs) e diástole (DIVEd), espessura do septo interventricular na sístole (ESIVs) e diástole (ESIVd), além da espessura da parede livre do ventrículo esquerdo na sístole (EPLVEs) e diástole (EPLVEd). Em seqüência à imagem anterior, inclinou-se o transdutor dorsalmente, alcançando-se o plano mitral, onde foi mensurada a separação septal do ponto E (SSPE). Dando prosseguimento à inclinação dorsal do transdutor, pode-se visualizar a artéria pulmonar. Utilizando-se dessa imagem, o cursor Doppler foi posicionado distalmente às válvulas pulmonares, sendo, então, mensurado o pico de velocidade do fluxo transpulmônico (PVPUL) utilizando-se o Doppler do tipo pulsado.

Subseqüentemente, o animal foi posicionado em decúbito lateral esquerdo, sendo obtida imagem apical quatro câmaras pela janela paraesternal esquerda. A partir

¹ 300S Pandion Vet – Pie Medical® Equipment – Maastricht – Holanda.

dessa imagem bidimensional, mensurou-se o pico de velocidade do enchimento ventricular esquerdo rápido – onda E (PVME) e lento – onda A (PVMA), posicionando-se o cursor do Doppler pulsado na extremidade dos folhetos da valva mitral durante sua abertura. A partir da imagem apical cinco câmaras obtida pela mesma janela, mensurou-se o pico de velocidade do fluxo transaórtico (PVAO). Para mensuração do período de pré-ejeção (PPE), determinou-se o tempo desde a onda Q observada no traçado eletrocardiográfico simultâneo até o início do fluxo aórtico. O tempo de ejeção ventricular esquerda (TEVE) foi mensurado do início ao final do fluxo transaórtico. Para mensuração do tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV), o cursor do Doppler pulsado foi posicionado eqüidistante entre a via de saída do ventrículo esquerdo e o fluxo transmitral, sendo determinado o tempo desde o término do fluxo transaórtico até o início do enchimento ventricular rápido (onda E). Em seguida, obteve-se a imagem do átrio direito e aurícula pela janela paraesternal esquerda cranial, para visualização da valva tricúspide. A partir dessa imagem bidimensional, o cursor do Doppler pulsado foi posicionado na extremidade dos folhetos valvares durante sua abertura para mensuração do pico de velocidade do enchimento ventricular direito rápido – onda E (PVTE) e lento – onda A (PVTA).

De posse dos parâmetros mensurados, diversos índices ecocardiográficos foram calculados: espessamento fracional do septo interventricular (SIV), espessamento fracional da parede livre do ventrículo esquerdo (PLVE), fração de ejeção (FEJ), fração de encurtamento (FEC), índice de estresse da parede ao final da sístole (IEPs), índice de estresse da parede ao final da diástole (IEPd), índice de ejeção (IE), índice cardíaco (IC), encurtamento circunferencial das fibras miocárdicas (VMEF), além das relações entre PPE e TEVE (PPE/TEVE), PVME e PVMA (PVME/PVMA), e PVTE e PVTA (PVTE/PVTA).

O índice de desempenho miocárdico de Tei (ITEI) também foi calculado. Para tanto, mensurou-se o intervalo entre o término do espectro da onda A mitral e o início da onda E mitral subsequente. Desse valor subtraiu-se TEVE, sendo o resultado dividido pelo próprio TEVE (Apêndice 7) (TEI, 1995; TEI et al., 1995; PELLET et al., 2004).

As fórmulas matemáticas utilizadas para cálculo destas variáveis podem ser observadas no Apêndice 8 (BOON, 1998; SOUSA, 2004).

O resultado das mensurações ecodopplercardiográficas foi considerado como a média de três ciclos cardíacos consecutivos. Especificamente para os parâmetros Doppler, foram considerados três ciclos cardíacos com picos máximos de velocidade e o direcionamento do cursor foi otimizado por meio do sinal de áudio, visando maximizar o espectro do pico de velocidade do fluxo sanguíneo e obter o tom mais puro (BOON, 1998; SOUSA, 2004).

2.5. Momentos de avaliação

Os animais foram avaliados em dois ciclos distintos: a fase de indução da cardiomiopatia dilatada pela doxorrubicina e fase pós-transplante de células-tronco. Na primeira fase, o protocolo constitui-se de oito avaliações seriadas, iniciadas antes da indução da cardiomiopatia (Dox0) e feitas sempre imediatamente antes da aplicação da doxorrubicina (Dox30 a Dox210), de modo a representar as alterações progressivas à medida que aumentava-se a dose cumulativa do fármaco. No segundo ciclo de avaliação, os animais, já apresentando sinais evidentes da cardiomiopatia induzida pela doxorrubicina, foram examinados antes (M0) e após o transplante de células-tronco autólogas (G1). Embora não tenham sido submetidos ao transplante, os cães incluídos em G2 foram avaliados nos mesmos momentos que os animais de G1, servindo, portanto, como animais controle. Nessa segunda fase, o protocolo de avaliação constituiu-se de 7 avaliações seriadas.

Primeiro ciclo de avaliação: Fase de indução da cardiomiopatia

- Dox0: avaliação basal (cães normais e hípidos);
- Dox30: dose cumulativa de doxorrubicina 30 mg/m²;
- Dox60: dose cumulativa de doxorrubicina 60 mg/m²;
- Dox90: dose cumulativa de doxorrubicina 90 mg/m²;
- Dox120: dose cumulativa de doxorrubicina 120 mg/m²;

- Dox150: dose cumulativa de doxorubicina 150 mg/m²;
- Dox180: dose cumulativa de doxorubicina 180 mg/m²;
- Dox210: dose cumulativa de doxorubicina 210 mg/m²;

Segundo ciclo de avaliação: Fase pós-transplante de células-tronco

- M0: avaliação basal antes do transplante de células-tronco;
- M1: um mês após o procedimento;
- M2: dois meses após o procedimento;
- M3: três meses após o procedimento;
- M4: quatro meses após o procedimento;
- M5: cinco meses após o procedimento;
- M6: seis meses após o procedimento.

Em todos os momentos de avaliação foram realizados exames eletrocardiográfico, ecocardiográfico e determinação da pressão arterial em todos os animais incluídos no estudo. Adicionalmente, os cães eram observados todos os dias e avaliados clinicamente em intervalos semanais.

2.6. Análise estatística

Os parâmetros eletrocardiográficos, ecodopplercardiográficos e da pressão arterial foram analisados por meio de análise de variância, que determinou a existência ou não de diferenças ao longo dos momentos de avaliação dentro de cada grupo. Sendo observada variação significativa, empregou-se o teste de Dunnett para comparar individualmente cada momento com o controle definido para cada ciclo de avaliação, isto é, Dox0 na fase de indução ou M0 na fase pós-transplante. Desse modo, foi possível determinar em quais momentos ocorreram alterações significativas nos parâmetros avaliados em ambos os ciclos. Para determinar diferenças entre G1 e G2 empregou-se o teste T não pareado. Em todas as análises, considerou-se $P < 0,05$ (GRAPHPAD, 1998).

A análise estatística foi realizada com o programa Graphpad InStat[®] versão 3.05 para Windows 95/NT, desenvolvido pela Graphpad Software[®], San Diego, Califórnia (2000).

3. RESULTADOS

3.1. Indução da cardiomiopatia dilatada com a doxorubicina

Durante a fase de indução da cardiomiopatia dilatada com a doxorubicina não foram observadas complicações. Embora a perda de peso ao longo da indução da cardiomiopatia tenha sido perceptível (G1 – peso inicial: $18,7 \pm 6,0$ kg; peso ao final da fase de indução: $15,6 \pm 4,1$ kg; $P=0,5010$ / G2: – peso inicial: $16,1 \pm 3,2$ kg; peso ao final da fase de indução: $14,4 \pm 1,8$ kg; $P=0,4675$), tal variação não foi considerada significativa quando analisada estatisticamente. Adicionalmente, não foram observadas outras alterações clínicas em todos os cães.

3.2. Preparo das células-tronco

As células hematopoiéticas medulares foram coletadas apenas nos animais incluídos em G1 ($n=4$). Os procedimentos realizados durante a colheita e separação das células-tronco transcorreram sem complicações.

Os dados referentes ao processo de separação celular encontram-se registrados na Tabela 7.

3.3. Transplante de células-tronco

A cateterização coronariana foi realizada apenas nos cães incluídos em G1 para permitir o transplante das células-tronco autólogas previamente separadas. O procedimento transcorreu sem quaisquer complicações em todos os animais. Não foram observadas alterações no ritmo cardíaco ou na morfologia das ondas eletrocardiográficas durante o procedimento de cateterização coronariana.

3.4. Óbitos

Apenas um animal evoluiu desfavoravelmente dentre os cães incluídos em G1. O animal em questão veio a óbito apresentando insuficiência renal 12 dias após receber o transplante de células-tronco autólogas. Embora tenham sido adotadas todas as medidas cabíveis na tentativa de poupar a vida do animal, houve deterioração do quadro clínico, com desenvolvimento de uremia, gastropatia urêmica, estomatites, além de severo estado de desequilíbrio hidro-eletrolítico e ácido-base. Desse modo, os resultados das avaliações referentes aos parâmetros cardiovasculares foram considerados como a média dos três animais sobreviventes no grupo G1. Em G2 não ocorreram quaisquer complicações e as médias apresentadas representam os dados referentes aos três animais incluídos inicialmente nesse grupo.

3.5. Eletrocardiografia

A avaliação eletrocardiográfica durante a fase de indução da cardiomiopatia não mostrou alterações significativas. Exceto pelas variáveis QRSms e RmV que, embora não significativa, evidenciaram tendência de aumento ao longo da infusão de doses cumulativas de doxorubicina. Na avaliação pós-transplante, os parâmetros eletrocardiográficos também não apresentaram alterações significativas. Nessa fase, entretanto, as variáveis Pms e PRms mostraram-se diferentes ($P < 0,05$) entre G1 e G2 no momento M4.

A evolução dos parâmetros eletrocardiográficos ao longo da fase de indução da cardiomiopatia, assim como os valores de P referente à análise de variância, encontram-se representados na Tabela 8. A variação de tais parâmetros após o transplante das células-tronco encontra-se expressa na Tabela 9. A representação gráfica das médias e desvios-padrão dos parâmetros eletrocardiográficos pode ser observada na Figura 12 e Figura 13.

Tabela 7 – Parâmetros avaliados durante o processo de separação das células mononucleares de cães com ca-
pela doxorubicina (n=4). Unesp, Jaboticabal, SP (2007).

| Animal | Medula coletada | Concentração do aspirado | Células totais no início do processamento | Concentração do filtrado | Concentração do filtrado lavado | Células totais no final do processamento |
|--------|-----------------|------------------------------|---|------------------------------|---------------------------------|--|
| 1 | 40 mL | $2,95 \times 10^7/\text{mL}$ | $1,18 \times 10^9$ | $1,62 \times 10^7/\text{mL}$ | $0,97 \times 10^8/\text{mL}$ | $0,24 \times 10^9$ |
| 2 | 40 mL | $2,95 \times 10^7/\text{mL}$ | $1,18 \times 10^9$ | $1,63 \times 10^7/\text{mL}$ | $0,98 \times 10^8/\text{mL}$ | $0,24 \times 10^9$ |
| 3 | 40 mL | - | - | $2,41 \times 10^7/\text{mL}$ | $1,03 \times 10^8/\text{mL}$ | $0,36 \times 10^9$ |
| 4 | 40 mL | $4,20 \times 10^7/\text{mL}$ | $1,68 \times 10^9$ | $2,98 \times 10^7/\text{mL}$ | $1,11 \times 10^8/\text{mL}$ | $0,44 \times 10^9$ |

3.6. Pressão arterial

Ao longo da infusão de doses cumulativas de doxorubicina foram determinadas variações significativas na pressão arterial sistólica, média e diastólica de acordo com a análise de variância. Tais modificações foram observadas apenas em G1. Quando se empregou o teste T não pareado para comparação entre os grupos observou-se ausência de diferenças em todos os momentos da fase de indução da cardiomiopatia.

Na fase de avaliação pós-transplante das células-tronco, a análise de variância não revelou quaisquer modificações significativas na pressão arterial dos animais de ambos os grupos. Entretanto, ao serem comparados, G1 e G2 apresentaram PAM significativamente diferente em M1 ($P < 0,05$), enquanto a diferença na PAD foi observada em M2

A evolução dos parâmetros da pressão arterial durante a indução da cardiomiopatia e a fase pós-transplante, bem como os valores de P referente à análise de variância, encontram-se descritos na Tabela 10 e Tabela 11, respectivamente. A representação gráfica das médias e desvios-padrão das pressões arteriais pode ser observada na Figura 14.

3.7. Ecodopplercardiografia

Durante a fase de indução da cardiomiopatia observou-se aumento significativo nas variáveis DIVEs, SSPE, IEPs, PPE, TRIV, PPE/TEVE e ITEI em G1 e G2. Também se observou aumento de IEPd em G2. Os parâmetros PLVE, FEJ, FEC, PVAO e VMEF reduziram-se significativamente em ambos os grupos ao longo da infusão de doses cumulativas da doxorubicina. Por outro lado, EPLVEs, PVPUL, e PVME reduziram-se apenas em G2. Do mesmo modo, o aumento significativo de IEPd durante a fase de indução foi notado apenas em G2. Ainda nessa fase, quando comparados os grupos, foram observadas diferenças estatísticas ($P < 0,05$) no parâmetro PLVE em Dox30, Dox120 e Dox210, PVAO em Dox180 e PVTA em Dox180.

Na avaliação pós-transplante, verificou-se que o grupo submetido ao transplante de células-tronco autólogas (G1) apresentou redução significativa dos parâmetros diâmetro do ventrículo esquerdo na sístole (DIVEs), separação septal do ponto E (SSPE), índice de estresse da parede ventricular na sístole (IEPs), período de pré-ejeção (PPE), tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV), relação entre período de pré-ejeção e tempo de ejeção ventricular esquerda (PPE/TEVE) e índice de desempenho miocárdico de Tei (ITEI). No mesmo grupo também se constatou aumento do espessamento fracional do septo interventricular (SIV), espessamento fracional da parede livre do ventrículo esquerdo (PLVE), fração de ejeção (FEJ), fração de encurtamento (FEC), velocidade média de encurtamento circunferencial das fibras miocárdicas (VMEF) e índice de ejeção (IE).

Ao se comparar G1 com G2 pelo teste T não pareado observaram-se diferenças significativas ($P < 0,05$) no diâmetro interno do ventrículo esquerdo na sístole de M2 a M6; espessura do septo interventricular na sístole em M4; espessura da parede livre do ventrículo esquerdo na sístole em M4 e M5; espessura da parede livre do ventrículo esquerdo na diástole em M6; separação septal do ponto E em M1 e M4 a M6; espessamentos fracionais do septo interventricular e da parede livre do ventrículo esquerdo de M2 a M6; frações de ejeção e encurtamento de M2 a M6; índice de estresse da parede ventricular na sístole de M4 a M6; pico de velocidade do fluxo trans-aórtico em M6; pico de velocidade da onda E do fluxo transmitral em M2 e M4; pico de velocidade da onda E do fluxo tricúspide em M2; período de pré-ejeção de M3 a M6; tempo de relaxamento isovolumétrico de M2 a M6; relação entre o período de pré-ejeção e o tempo de ejeção ventricular esquerda em M3, M4 e M6; velocidade média de encurtamento circunferencial das fibras miocárdicas, índice de ejeção e índice de desempenho miocárdico de Tei de M2 a M6; e índice cardíaco em M3.

Embora a variação observada no parâmetro PVME/PVMA ao longo da indução da cardiomiopatia e durante a avaliação pós-transplante não tenha sido significativa, clinicamente foi considerada importante. Na fase de indução, alguns animais apresentaram inversão da relação E:A mitral a partir de Dox150 em G1 e Dox180 em G2. Após o transplante com células-tronco, a relação PVME/PVMA tornou-

se novamente superior a 1,0 a partir de M2, enquanto em G2 permaneceu inalterada (Figura 11).

A evolução dos parâmetros ecocardiográficos durante a indução da cardiomiopatia encontra-se representada nas Tabelas 12, 14, 16 e 18. Os mesmos parâmetros determinados após o transplante de células-tronco, assim como os valores de P referente à análise de variância nesse período, encontram-se detalhados nas Tabelas 13, 15, 17 e 19. A representação gráfica das médias e desvios-padrão dos parâmetros ecocardiográficos pode ser observada nas Figuras 12 a 23.

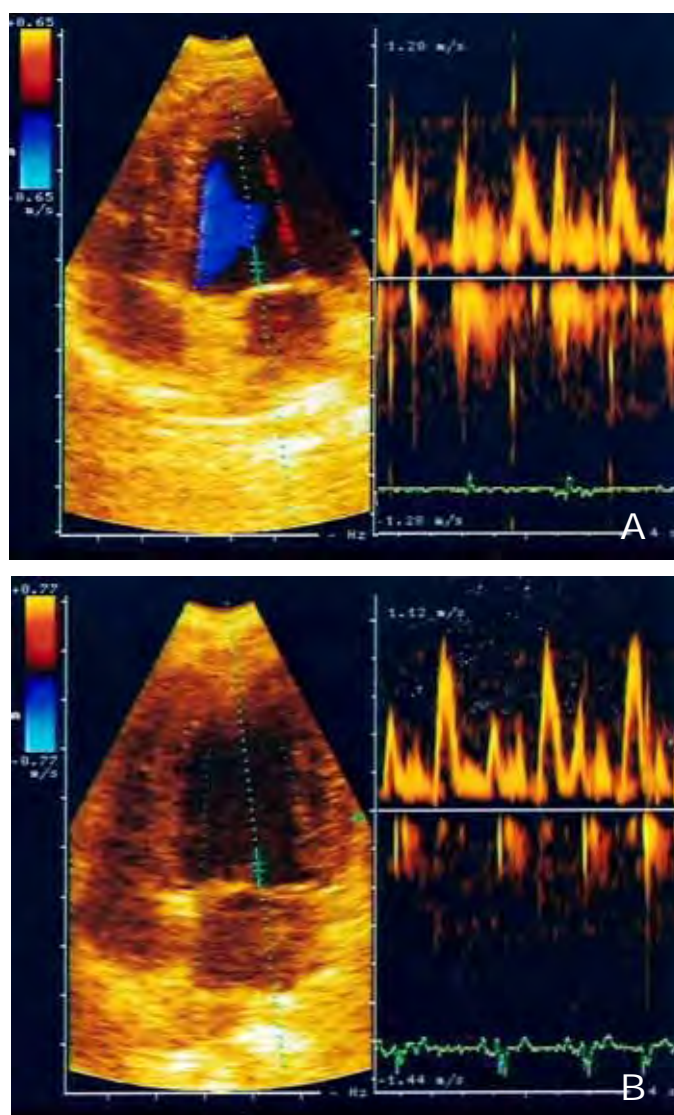


Figura 11 – Imagem ecocardiográfica ilustrativa da relação E:A mitral nos cães submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas autólogas (G1). (A) avaliação realizada imediatamente antes do transplante das células-tronco. Pode-se notar inversão da relação entre as ondas E e A do fluxo mitral; (B) observa-se a correção da relação E:A anteriormente invertida, em avaliação ecocardiográfica realizada no mesmo animal seis meses após o transplante autólogo. Unesp, Jaboticabal, SP (2007)

Tabela 8 – Parâmetros eletrocardiográficos (média ± DP) em cães ao longo da indução da cardiomiopatia dilatada por doxapram em cães da Universidade de São Paulo (Unesp, Jaboticabal, SP (2007)).

| Parâmetro | | Fase de Indução da Cardiomiopatia | | | | | | |
|-----------|----|-----------------------------------|-------------------------|--------------|-------------------------|--------------|--------------|--------------|
| | | Dox0 | Dox30 | Dox60 | Dox90 | Dox120 | Dox150 | Dox180 |
| Pms | G1 | 55,7 ± 5,1 | 52,3 ± 5,8 | 58,0 ± 4,8 | 50,0 ± 5,2 | 52,0 ± 3,9 | 52,0 ± 5,3 | 50,0 ± 5,3 |
| | G2 | 53,3 ± 3,2 | 51,0 ± 3,5 | 52,0 ± 7,1 | 56,5 ± 9,2 | 52,0 ± 7,1 | 46,5 ± 4,9 | 46,5 ± 4,9 |
| PmV | G1 | 0,26 ± 0,07 | 0,22 ± 0,09 | 0,23 ± 0,13 | 0,18 ± 0,02 | 0,23 ± 0,08 | 0,21 ± 0,05 | 0,21 ± 0,05 |
| | G2 | 0,33 ± 0,13 | 0,36 ± 0,05 | 0,28 ± 0,13 | 0,34 ± 0,16 | 0,31 ± 0,08 | 0,24 ± 0,05 | 0,28 ± 0,05 |
| PRms | G1 | 101,3 ± 15,0 | 96,7 ± 8,5 | 103,3 ± 13,5 | 91,0 ± 7,2 | 96,7 ± 6,5 | 101,3 ± 5,1 | 98,7 ± 5,1 |
| | G2 | 110,0 ± 17,6 | 106,7 ± 21,7 | 105,0 ± 17,0 | 105,0 ± 11,3 | 110,0 ± 24,0 | 112,0 ± 7,1 | 108,5 ± 7,1 |
| QRSms | G1 | 58,7 ± 5,1 | 62,0 ± 1,7 [†] | 58,7 ± 5,1 | 61,0 ± 1,7 [†] | 57,7 ± 6,8 | 62,2 ± 5,0 | 58,7 ± 5,1 |
| | G2 | 55,3 ± 4,0 | 58,0 ± 1,7 | 58,5 ± 4,9 | 55,0 ± 2,8 | 55,0 ± 2,8 | 56,5 ± 4,9 | 57,0 ± 4,9 |
| RmV | G1 | 1,55 ± 0,63 | 1,72 ± 0,69 | 1,62 ± 0,67 | 1,86 ± 0,77 | 1,68 ± 0,68 | 1,71 ± 0,86 | 1,68 ± 0,86 |
| | G2 | 1,50 ± 0,94 | 1,45 ± 0,53 | 1,32 ± 0,47 | 1,67 ± 0,40 | 1,50 ± 0,47 | 1,00 ± 0,35 | 1,57 ± 0,35 |
| QTms | G1 | 191,3 ± 5,1 | 191,0 ± 13,9 | 207,7 ± 13,5 | 195,3 ± 4,0 | 204,4 ± 8,1 | 202,0 ± 10,1 | 195,3 ± 10,1 |
| | G2 | 189,0 ± 7,2 | 185,3 ± 6,8 | 196,5 ± 19,1 | 205,0 ± 11,3 | 195,0 ± 11,3 | 211,5 ± 16,3 | 191,5 ± 16,3 |
| FC | G1 | 97,3 ± 23,6 | 118,3 ± 23,5 | 110,3 ± 20,6 | 94,3 ± 25,0 | 105,0 ± 13,2 | 123,0 ± 31,6 | 138,3 ± 31,6 |
| | G2 | 114,0 ± 23,3 | 117,3 ± 26,8 | 100,0 ± 11,5 | 111,0 ± 18,5 | 117,3 ± 25,4 | 126,7 ± 28,0 | 124,0 ± 28,0 |

Pms: duração da onda P (mseg); PmV: amplitude da onda P (mV); PRms: duração do intervalo PR (mseg); QRSms: duração do complexo QRS (mseg); QTms: duração do intervalo QT (mseg); FC: frequência cardíaca (bpm).

† Diferença significativa (P<0,05) entre grupos

Tabela 9 – Parâmetros eletrocardiográficos (média ± DP) em cães com cardiomiopatia induzida pela doxorubicina subtronco hematopoiéticas autólogas (G1; n=3) e cães controle (G2; n=3). Unesp, Jaboticabal, SP (2007)

| Parâmetro | | M0 | M1 | M2 | M3 | M4 | M5 |
|-----------|----|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------------------|--------------|
| Pms | G1 | 51,0 ± 3,5 | 48,0 ± 8,5 | 48,0 ± 1,7 | 52,0 ± 1,7 | 52,0 ± 1,7 [†] | 49,7 ± 5,0 |
| | G2 | 46,7 ± 3,5 | 49,0 ± 7,2 | 45,7 ± 2,3 | 45,3 ± 4,0 | 48,0 ± 1,7 | 45,7 ± 5,0 |
| PmV | G1 | 0,18 ± 0,09 | 0,14 ± 0,04 | 0,13 ± 0,02 | 0,12 ± 0,06 | 0,18 ± 0,05 | 0,14 ± 0,05 |
| | G2 | 0,20 ± 0,06 | 0,19 ± 0,06 | 0,19 ± 0,07 | 0,16 ± 0,05 | 0,21 ± 0,06 | 0,23 ± 0,05 |
| PRms | G1 | 105,3 ± 10,8 | 107,7 ± 5,0 | 97,0 ± 20,0 | 113,3 ± 3,5 | 99,0 ± 1,7 [†] | 113,3 ± 1,7 |
| | G2 | 119,0 ± 18,2 | 122,3 ± 21,6 | 117,0 ± 20,0 | 110,0 ± 3,6 | 112,3 ± 1,5 | 108,7 ± 1,7 |
| QRSms | G1 | 74,7 ± 15,7 | 71,0 ± 15,9 | 80,0 ± 23,6 | 73,3 ± 13,5 | 75,7 ± 2,3 | 68,7 ± 16,5 |
| | G2 | 78,7 ± 7,5 | 70,0 ± 3,0 | 71,0 ± 10,6 | 75,3 ± 10,8 | 70,0 ± 7,0 | 71,0 ± 7,0 |
| RmV | G1 | 1,72 ± 0,60 | 1,70 ± 0,70 | 1,39 ± 0,87 | 1,54 ± 0,45 | 1,51 ± 0,48 | 1,42 ± 0,45 |
| | G2 | 1,81 ± 0,23 | 1,52 ± 0,19 | 1,66 ± 0,46 | 1,29 ± 0,11 | 1,74 ± 0,21 | 1,83 ± 0,45 |
| QTms | G1 | 206,7 ± 16,5 | 204,7 ± 15,6 | 204,3 ± 31,9 | 205,7 ± 28,9 | 204,7 ± 16,6 | 215,7 ± 30,0 |
| | G2 | 215,3 ± 13,6 | 241,0 ± 33,8 | 208,7 ± 16,9 | 214,3 ± 24,2 | 215,7 ± 24,8 | 206,7 ± 10,0 |
| FC | G1 | 107,7 ± 4,0 | 107,7 ± 12,1 | 136,7 ± 16,2 | 104,0 ± 23,9 | 118,7 ± 28,6 | 104,0 ± 30,0 |
| | G2 | 108,0 ± 3,6 | 103,3 ± 4,9 | 110,0 ± 38,2 | 91,0 ± 15,1 | 117,3 ± 16,7 | 106,0 ± 20,0 |

Pms: duração da onda P (mseg); PmV: amplitude da onda P (mV); PRms: duração do intervalo PR (mseg); QRSms: duração do complexo QRS (mseg); QTms: duração do intervalo QT (mseg); FC: frequência cardíaca (bpm).

* Diferença significativa (P<0,05) em relação a M0 (pré-transplante)

† Diferença significativa (P<0,05) entre grupos

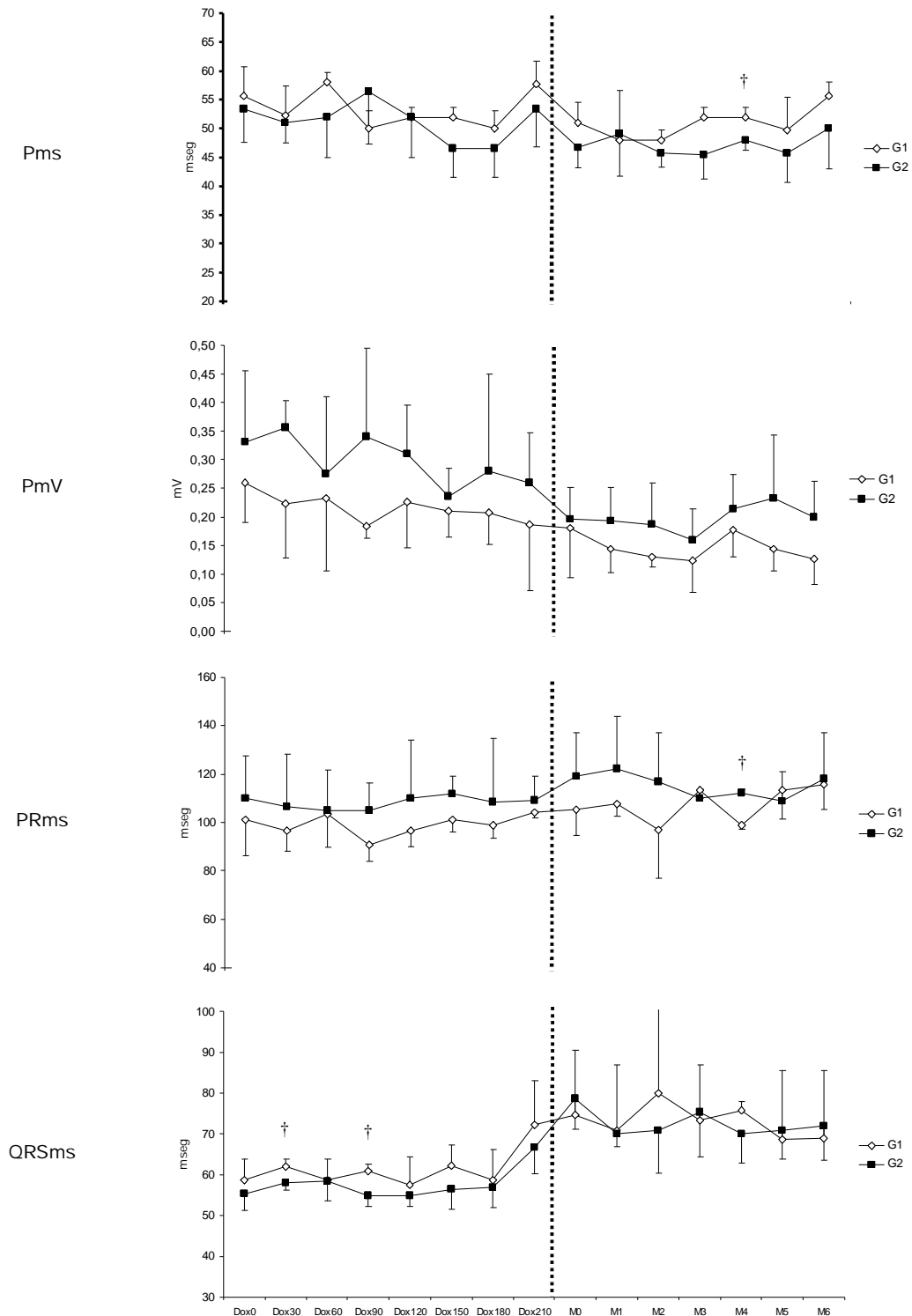


Figura 12 – Representação gráfica das médias \pm DP dos parâmetros eletrocardiográficos Pms, PmV, PRms, QRSms de cães ao longo da exposição a doses cumulativas de doxorubicina (Dox0 a Dox210) e na evolução pós-transplante (M0 a M6) de células-tronco hematopoiéticas autólogas (G1) ou não (G2). Unesp, Jaboticabal, SP (2007).

† Grupos diferem entre si ($P < 0,05$).

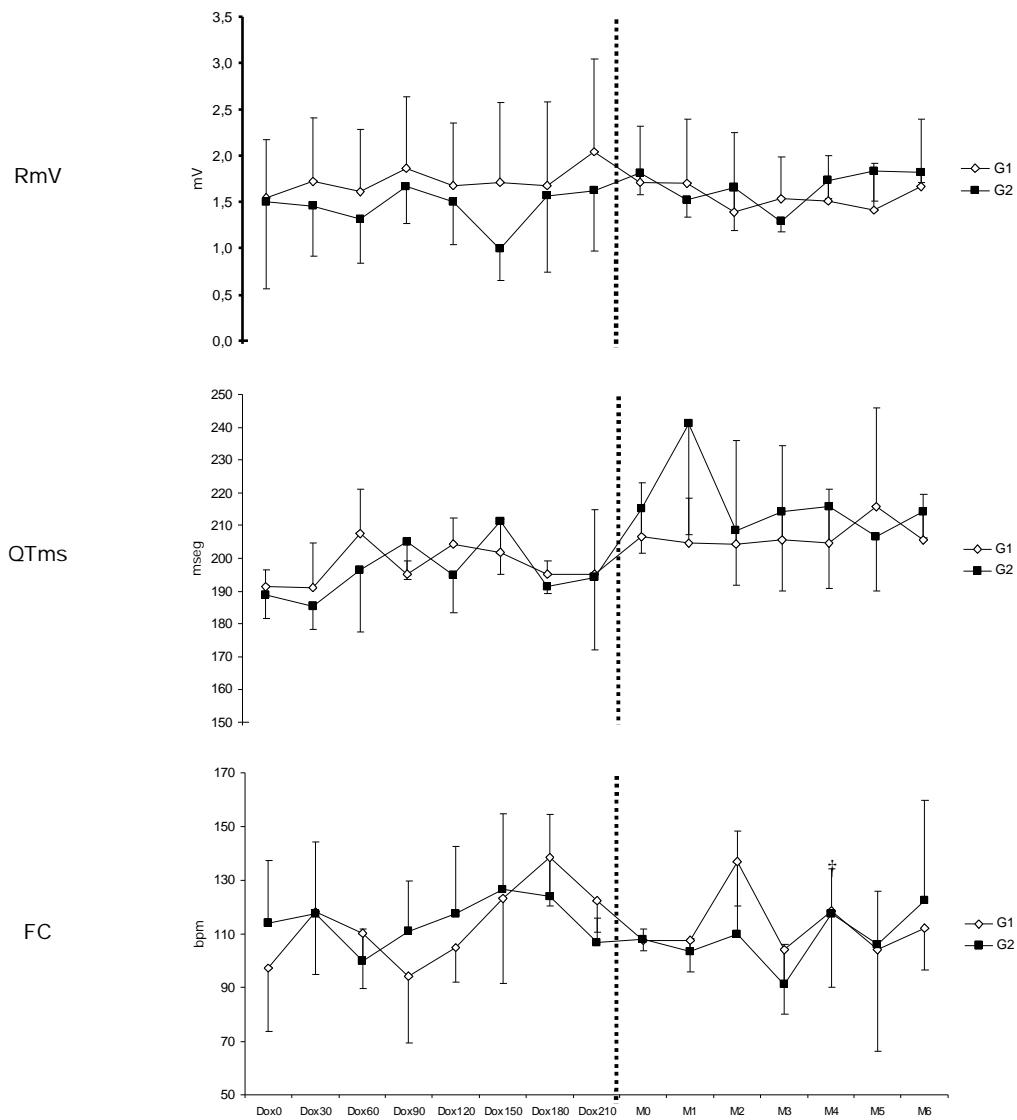


Figura 13 – Representação gráfica das médias \pm DP dos parâmetros eletrocardiográficos RmV, QTms e FC de cães ao longo da exposição a doses cumulativas de doxorubicina (Dox0 a Dox210) e na evolução pós-transplante (M0 a M6) de células-tronco hematopoiéticas autólogas (G1) ou não (G2). Unesp, Jaboticabal, SP (2007).

Tabela 10 – Pressão arterial (média ± DP) em cães ao longo da indução da cardiomiopatia dilatada pela doxorubicina em Jaboticabal, SP (2007).

| Parâmetro | | Fase de Indução da Cardiomiopatia | | | | | | |
|-----------|----|-----------------------------------|--------------|-------------|--------------|-------------|--------------|--------------|
| | | Dox0 | Dox30 | Dox60 | Dox90 | Dox120 | Dox150 | Dox180 |
| PAS | G1 | 136,9 ± 10,7 | 119,7 ± 10,2 | 131,5 ± 9,7 | 112,5 ± 7,7* | 127,1 ± 7,9 | 131,3 ± 11,2 | 144,6 ± 10,0 |
| | G2 | 137,9 ± 10,0 | 130,5 ± 19,6 | 133,1 ± 7,3 | 124,4 ± 16,1 | 136,8 ± 2,3 | 136,4 ± 2,5 | 143,9 ± 10,0 |
| PAM | G1 | 100,0 ± 8,6 | 88,1 ± 13,5 | 92,7 ± 11,3 | 83,3 ± 2,7* | 95,1 ± 8,2 | 93,6 ± 9,4 | 111,3 ± 10,0 |
| | G2 | 105,3 ± 13,4 | 98,3 ± 16,6 | 96,1 ± 8,2 | 95,1 ± 10,4 | 102,8 ± 3,9 | 98,8 ± 5,4 | 105,4 ± 10,0 |
| PAD | G1 | 80,2 ± 3,7 | 68,9 ± 9,8 | 70,1 ± 10,7 | 69,4 ± 10,2 | 76,5 ± 7,9 | 75,2 ± 9,1 | 95,8 ± 10,0 |
| | G2 | 87,2 ± 9,7 | 77,9 ± 14,8 | 74,4 ± 8,0 | 77,7 ± 8,3 | 82,0 ± 7,7 | 76,1 ± 8,5 | 88,7 ± 10,0 |

PAS: pressão arterial sistólica (mmHg); PAM: pressão arterial média (mmHg); PAD: pressão arterial diastólica (mmHg).

* Diferença significativa (P<0,05) em relação a Dox0 (basal)

Tabela 11 – Pressão arterial (média ± DP) em cães com cardiomiopatia induzida pela doxorubicina submetidos a transfusões hematopoiéticas autólogas (G1; n=3) e cães controle (G2; n=3). Unesp, Jaboticabal, SP (2007)

| Parâmetro | | M0 | M1 | M2 | M3 | M4 | M5 |
|-----------|----|-------------|-------------------------|-------------------------|--------------|-------------|--------------|
| | | | | | | | |
| PAS | G1 | 131,9 ± 8,5 | 129,9 ± 9,4 | 133,6 ± 6,0 | 134,1 ± 6,3 | 130,8 ± 9,0 | 132,0 ± 10,0 |
| | G2 | 142,7 ± 3,0 | 129,3 ± 7,1 | 130,4 ± 17,2 | 132,7 ± 19,1 | 130,0 ± 4,5 | 130,0 ± 10,0 |
| PAM | G1 | 98,7 ± 14,0 | 94,9 ± 2,1 [†] | 101,4 ± 2,2 | 104,0 ± 4,7 | 98,1 ± 5,4 | 98,0 ± 7,0 |
| | G2 | 98,9 ± 11,0 | 88,3 ± 2,5 | 91,8 ± 9,8 | 99,5 ± 15,7 | 94,2 ± 3,9 | 99,0 ± 13,0 |
| PAD | G1 | 85,1 ± 12,6 | 77,4 ± 7,0 | 86,9 ± 4,2 [†] | 94,6 ± 5,5 | 82,4 ± 7,5 | 88,0 ± 9,0 |
| | G2 | 74,9 ± 12,0 | 66,0 ± 6,2 | 67,3 ± 3,4 | 84,0 ± 16,5 | 73,7 ± 6,3 | 80,0 ± 19,0 |

PAS: pressão arterial sistólica (mmHg); PAM: pressão arterial média (mmHg); PAD: pressão arterial diastólica (mmHg).

† Diferença significativa (P<0,05) entre grupos

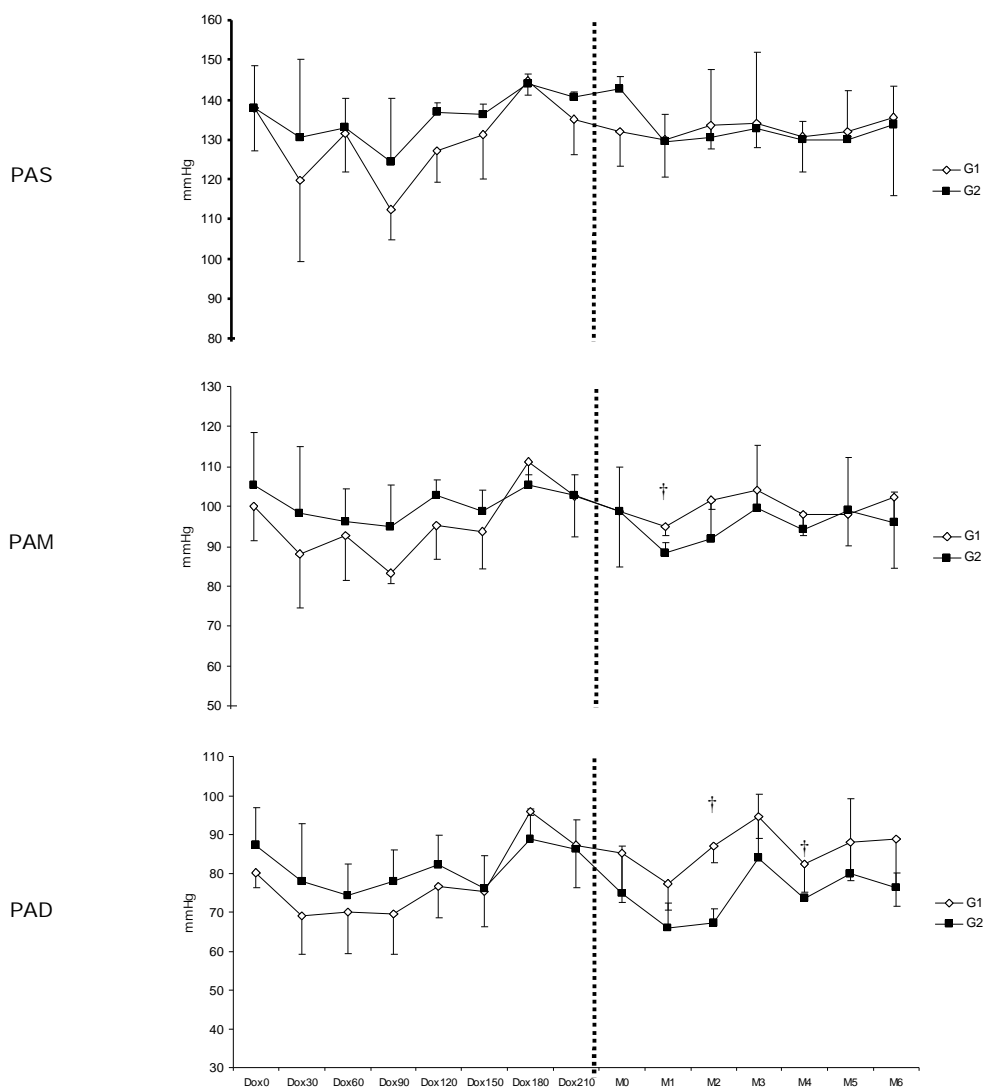


Figura 14 – Representação gráfica das médias \pm DP das pressões arteriais de cães ao longo da exposição a doses cumulativas de doxorubicina (Dox0 a Dox210) e na evolução pós-transplante (M0 a M6) de células-tronco hematopoiéticas autólogas (G1) ou não (G2). Unesp, Jaboticabal, SP (2007).

† Grupos diferem entre si ($P < 0,05$).

Tabela 12 – Parâmetros ecocardiográficos (média ± DP) obtidos pelo modo-M do ventrículo esquerdo em eixo transversal em diferentes doses cumulativas de doxorubicina para indução de cardiomiopatia dilatada (G1: n=3; G2: n=3). Unesp, Jaboticabal, 2017.

| Parâmetro | | Fase de Indução da Cardiomiopatia | | | | | | |
|-----------|----|-----------------------------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|
| | | Dox0 | Dox30 | Dox60 | Dox90 | Dox120 | Dox150 | Dox180 |
| DIVEs | G1 | 2,25 ± 0,08 | 2,26 ± 0,29 | 2,28 ± 0,33 | 2,41 ± 0,02 | 2,48 ± 0,16 | 2,72 ± 0,26 | 2,80 ± 0,26 |
| | G2 | 2,22 ± 0,09 | 2,31 ± 0,19 | 2,39 ± 0,24 | 2,53 ± 0,21 | 2,47 ± 0,33 | 2,66 ± 0,15 | 2,78 ± 0,26 |
| DIVEd | G1 | 3,63 ± 0,46 | 3,80 ± 0,40 | 3,57 ± 0,27 | 3,42 ± 0,40 | 3,50 ± 0,37 | 3,53 ± 0,29 | 3,57 ± 0,29 |
| | G2 | 3,39 ± 0,23 | 3,53 ± 0,13 | 3,50 ± 0,10 | 3,43 ± 0,27 | 3,43 ± 0,29 | 3,43 ± 0,16 | 3,49 ± 0,29 |
| ESIVs | G1 | 1,25 ± 0,30 | 1,14 ± 0,21 | 1,17 ± 0,15 | 1,19 ± 0,25 | 1,26 ± 0,24 | 1,07 ± 0,11 | 1,01 ± 0,11 |
| | G2 | 1,13 ± 0,24 | 1,10 ± 0,18 | 1,15 ± 0,09 | 1,02 ± 0,05 | 1,17 ± 0,10 | 1,02 ± 0,08 | 0,98 ± 0,11 |
| ESIVd | G1 | 0,98 ± 0,22 | 0,87 ± 0,18 | 0,96 ± 0,10 | 0,94 ± 0,24 | 0,96 ± 0,27 | 0,84 ± 0,22 | 0,81 ± 0,11 |
| | G2 | 1,01 ± 0,17 | 0,90 ± 0,08 | 0,89 ± 0,03 | 0,82 ± 0,05 | 0,86 ± 0,07 | 0,85 ± 0,06 | 0,85 ± 0,06 |
| EPLVEs | G1 | 1,31 ± 0,18 | 1,14 ± 0,14 | 1,17 ± 0,14 | 1,19 ± 0,23 | 1,10 ± 0,35 | 1,04 ± 0,13 | 1,00 ± 0,13 |
| | G2 | 1,15 ± 0,05 | 1,23 ± 0,04 | 1,07 ± 0,07 | 1,09 ± 0,13 | 0,86 ± 0,15* | 1,01 ± 0,10 | 0,95 ± 0,13 |
| EPLVEd | G1 | 0,94 ± 0,10 | 0,87 ± 0,12 | 0,84 ± 0,16 | 0,92 ± 0,10 | 0,78 ± 0,16 | 0,85 ± 0,17 | 0,81 ± 0,17 |
| | G2 | 0,80 ± 0,06 | 0,83 ± 0,11 | 0,78 ± 0,08 | 0,85 ± 0,08 | 0,71 ± 0,10 | 0,82 ± 0,07 | 0,77 ± 0,17 |
| SSPE | G1 | 0,25 ± 0,07 | 0,28 ± 0,10 | 0,27 ± 0,12 | 0,32 ± 0,13 | 0,39 ± 0,09 | 0,43 ± 0,13 | 0,60 ± 0,13 |
| | G2 | 0,26 ± 0,13 | 0,34 ± 0,10 | 0,38 ± 0,14 | 0,40 ± 0,14 | 0,43 ± 0,12 | 0,55 ± 0,12 | 0,55 ± 0,12 |

DIVEs: diâmetro interno do ventrículo esquerdo em sístole (cm); DIVEd: diâmetro interno do ventrículo esquerdo em diástole (cm); ESIVs: espessura do septo interventricular em sístole (cm); ESIVd: espessura do septo interventricular em diástole (cm); EPLVEs: espessura da parede livre do ventrículo esquerdo em sístole (cm); EPLVEd: espessura da parede livre do ventrículo esquerdo em diástole (cm); SSPE: separação septal do ponto E (cm).

* Diferença significativa (P<0,05) em relação a Dox0 (basal)

Tabela 13 – Parâmetros ecocardiográficos (média ± DP) obtidos pelo modo-M do ventrículo esquerdo em eixo transverso induzida pela doxorubicina submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas autólogas (G1: Unesp, Jaboticabal, SP (2007).

| Parâmetro | | M0 | M1 | M2 | M3 | M4 | M5 |
|-----------|----|-------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|-------------|
| DIVEs | G1 | 2,90 ± 0,21 | 2,93 ± 0,26 | 2,82 ± 0,10 [†] | 2,71 ± 0,15 [†] | 2,35 ± 0,16 ^{*†} | 2,30 ± 0,16 |
| | G2 | 2,94 ± 0,16 | 3,06 ± 0,22 | 3,11 ± 0,11 | 3,16 ± 0,12 | 3,16 ± 0,11 | 3,26 ± 0,16 |
| DIVEd | G1 | 3,71 ± 0,12 | 3,76 ± 0,41 | 3,87 ± 0,18 | 3,64 ± 0,21 | 3,50 ± 0,20 | 3,45 ± 0,16 |
| | G2 | 3,69 ± 0,52 | 3,54 ± 0,40 | 3,75 ± 0,31 | 3,71 ± 0,31 | 3,71 ± 0,30 | 3,91 ± 0,16 |
| ESIVs | G1 | 0,92 ± 0,19 | 0,91 ± 0,15 | 1,06 ± 0,28 | 1,09 ± 0,25 | 1,22 ± 0,17 [†] | 1,20 ± 0,16 |
| | G2 | 0,96 ± 0,15 | 0,86 ± 0,10 | 0,92 ± 0,25 | 0,78 ± 0,13 | 0,86 ± 0,14 | 0,89 ± 0,16 |
| ESIVd | G1 | 0,86 ± 0,20 | 0,79 ± 0,12 | 0,76 ± 0,17 | 0,66 ± 0,10 | 0,73 ± 0,10 | 0,80 ± 0,16 |
| | G2 | 0,95 ± 0,10 | 0,83 ± 0,10 | 0,79 ± 0,11 | 0,76 ± 0,10 | 0,68 ± 0,11 | 0,78 ± 0,16 |
| EPLVEs | G1 | 1,00 ± 0,10 | 1,06 ± 0,19 | 1,04 ± 0,14 | 1,07 ± 0,10 | 1,23 ± 0,10 [†] | 1,14 ± 0,16 |
| | G2 | 0,92 ± 0,10 | 1,06 ± 0,10 | 0,85 ± 0,10 | 0,88 ± 0,18 | 0,82 ± 0,15 | 0,84 ± 0,16 |
| EPLVEd | G1 | 0,77 ± 0,10 | 0,78 ± 0,12 | 0,75 ± 0,10 | 0,73 ± 0,11 | 0,86 ± 0,14 | 0,76 ± 0,16 |
| | G2 | 0,82 ± 0,10 | 0,78 ± 0,10 | 0,74 ± 0,10 | 0,67 ± 0,10 | 0,77 ± 0,10 | 0,74 ± 0,16 |
| SSPE | G1 | 0,73 ± 0,09 | 0,51 ± 0,06 [†] | 0,49 ± 0,14 | 0,49 ± 0,09 | 0,49 ± 0,03 [†] | 0,44 ± 0,16 |
| | G2 | 0,75 ± 0,10 | 0,71 ± 0,10 | 0,72 ± 0,12 | 0,71 ± 0,11 | 0,70 ± 0,10 | 0,76 ± 0,16 |

DIVEs: diâmetro interno do ventrículo esquerdo em sístole (cm); DIVEd: diâmetro interno do ventrículo esquerdo em diástole (cm); ESIVs: espessura do septo interventricular em sístole (cm); ESIVd: espessura do septo interventricular em diástole (cm); EPLVEs: espessura da parede livre do ventrículo esquerdo em sístole (cm); EPLVEd: espessura da parede livre do ventrículo esquerdo em diástole (cm); SSPE: separação septal do ponto E (cm).

* Diferença significativa (P<0,05) em relação a M0 (pré-transplante)

† Diferença significativa (P<0,05) entre grupos

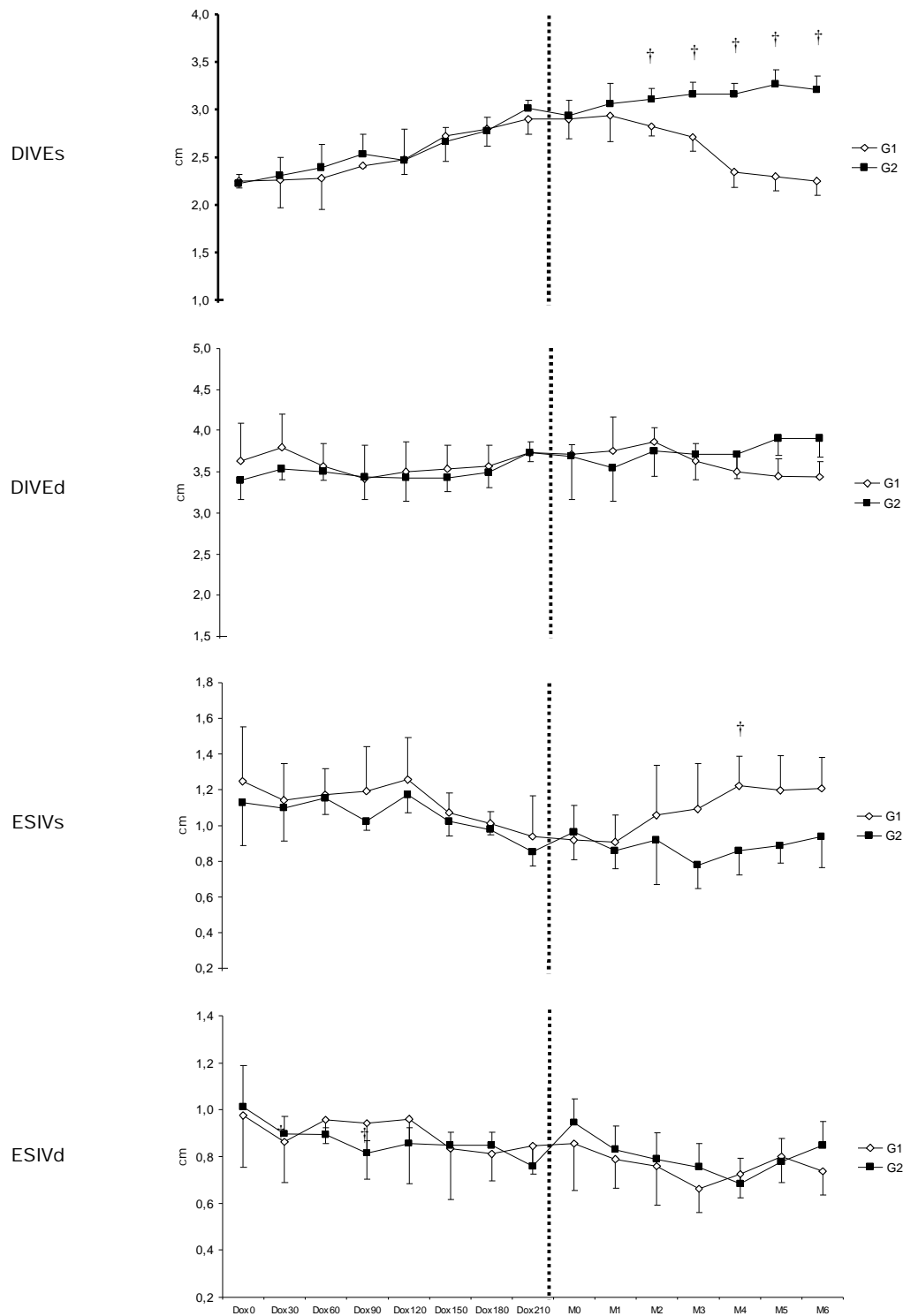


Figura 15 – Representação gráfica das médias \pm DP dos parâmetros ecocardiográficos DIVEs, DIVEd, ESIVs e ESIVd de cães ao longo da exposição a doses cumulativas de doxorubicina (Dox0 a Dox210) e na evolução pós-transplante (M0 a M6) de células-tronco hematopoiéticas autólogas (G1) ou não (G2). Unesp, Jaboticabal, SP (2007).

† Grupos diferem entre si ($P < 0,05$).

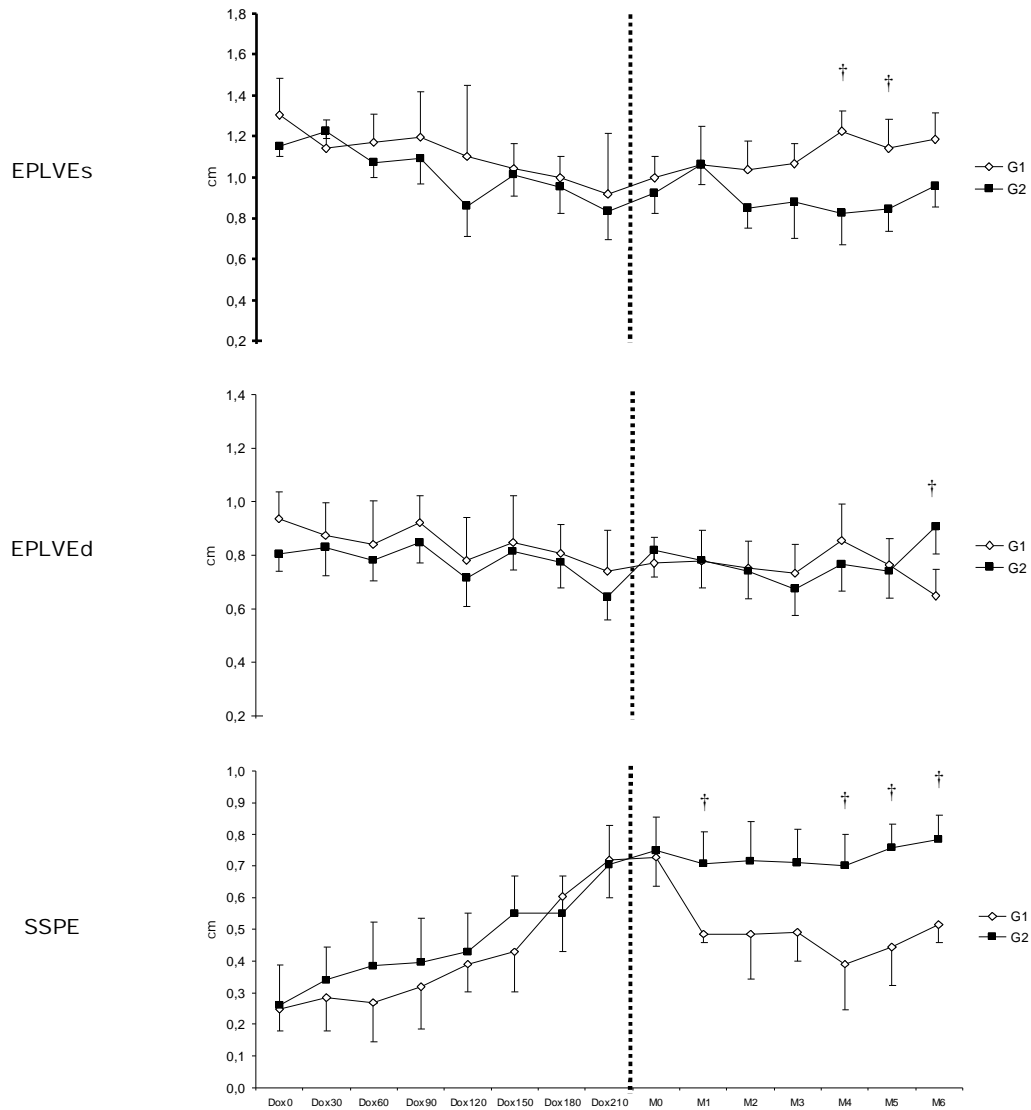


Figura 16 – Representação gráfica das médias \pm DP dos parâmetros ecocardiográficos EPLVEs, EPLVEd e SSPE de cães ao longo da exposição a doses cumulativas de doxorubicina (Dox0 a Dox210) e na evolução pós-transplante (M0 a M6) de células-tronco hematopoiéticas autólogas (G1) ou não (G2). Unesp, Jaboticabal, SP (2007).

† Grupos diferem entre si ($P < 0,05$).

Tabela 14 – Índices ecocardiográficos (média ± DP) calculados a partir de parâmetros do modo-M em cães submetidos a administração de doxorubicina para indução de cardiomiopatia dilatada (G1: n=3; G2: n=3). Unesp, Jaboticabal, SP (2007).

| Parâmetro | | Fase de Indução da Cardiomiopatia | | | | | | |
|-----------|----|-----------------------------------|-------------------------|-------------|-------------|-------------------------|-------------|-------------|
| | | Dox0 | Dox30 | Dox60 | Dox90 | Dox120 | Dox150 | Dox180 |
| SIV | G1 | 27,3 ± 3,6 | 31,0 ± 7,1 | 31,0 ± 10,8 | 28,3 ± 6,1 | 35,3 ± 10,4 | 29,3 ± 10,5 | 24,3 ± 10,5 |
| | G2 | 31,0 ± 5,3 | 22,7 ± 12,5 | 28,3 ± 5,1 | 24,7 ± 3,2 | 38,0 ± 11,9 | 21,3 ± 13,3 | 16,0 ± 10,5 |
| PLVE | G1 | 39,3 ± 6,1 | 32,7 ± 8,6 [†] | 40,3 ± 5,5 | 29,3 ± 10,6 | 39,3 ± 6,5 [†] | 24,0 ± 8,7 | 25,3 ± 10,5 |
| | G2 | 43,7 ± 7,4 | 54,7 ± 8,1 | 39,0 ± 11,3 | 30,7 ± 7,1 | 20,7 ± 3,5* | 23,7 ± 2,5* | 23,3 ± 10,5 |
| FEJ | G1 | 68,7 ± 3,5 | 64,3 ± 9,0 | 65,3 ± 10,7 | 61,7 ± 11,6 | 47,7 ± 10,3* | 44,7 ± 7,1* | 45,0 ± 10,5 |
| | G2 | 64,7 ± 5,5 | 64,3 ± 11,0 | 60,0 ± 11,4 | 52,3 ± 8,6 | 55,7 ± 10,8 | 46,0 ± 7,0 | 42,7 ± 10,5 |
| FEC | G1 | 38,0 ± 3,0 | 35,0 ± 6,6 | 35,0 ± 7,6 | 32,7 ± 8,6 | 32,7 ± 7,5 | 23,3 ± 4,0* | 21,7 ± 10,5 |
| | G2 | 34,3 ± 4,0 | 34,7 ± 7,8 | 31,7 ± 8,1 | 26,3 ± 5,0 | 28,0 ± 7,0 | 22,3 ± 3,8 | 19,7 ± 10,5 |
| IEPs | G1 | 1,87 ± 0,36 | 1,97 ± 0,19 | 2,11 ± 0,65 | 2,19 ± 0,42 | 2,53 ± 0,55 | 2,77 ± 0,10 | 2,74 ± 0,10 |
| | G2 | 2,02 ± 0,37 | 2,13 ± 0,35 | 2,10 ± 0,43 | 2,49 ± 0,40 | 2,13 ± 0,51 | 2,63 ± 0,42 | 2,85 ± 0,10 |
| IEPd | G1 | 3,71 ± 0,53 | 4,38 ± 0,56 | 3,65 ± 0,46 | 3,76 ± 0,50 | 4,10 ± 0,93 | 4,25 ± 0,80 | 4,38 ± 0,10 |
| | G2 | 3,69 ± 0,35 | 3,95 ± 0,24 | 3,92 ± 0,19 | 4,21 ± 0,38 | 4,00 ± 0,10 | 4,04 ± 0,10 | 4,10 ± 0,10 |

SIV: espessamento fracional do septo interventricular (%); PLVE: espessamento fracional da parede livre do ventrículo esquerdo (%); FEJ: fração de ejeção (%); IEPs: índice de estresse da parede em sístole; IEPd: índice de estresse da parede em diástole.

* Diferença significativa (P<0,05) em relação a Dox0 (basal)

† Diferença significativa (P<0,05) entre grupos

Tabela 15 – Índices ecocardiográficos (média ± DP) calculados a partir de parâmetros do modo-M em cães com doxorubicina submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas autólogas (G1; n=3) e com Jaboticabal, SP (2007).

| Parâmetro | | M0 | M1 | M2 | M3 | M4 | M5 |
|-----------|----|-------------|-------------|--------------|--------------|---------------|------------|
| SIV | G1 | 15,3 ± 6,4 | 18,3 ± 5,1 | 37,7 ± 6,7*† | 40,0 ± 5,3*† | 38,3 ± 8,6*† | 35,7 ± 6,3 |
| | G2 | 11,5 ± 3,6 | 12,3 ± 1,1 | 20,7 ± 7,2 | 12,3 ± 4,6 | 15,0 ± 6,6 | 11,0 ± 4,0 |
| PLVE | G1 | 21,0 ± 9,2 | 36,3 ± 4,7* | 38,3 ± 8,0*† | 37,3 ± 6,5*† | 46,7 ± 6,5*† | 61,3 ± 2,4 |
| | G2 | 22,3 ± 6,5 | 20,0 ± 10,8 | 9,0 ± 8,7 | 11,0 ± 8,0 | 9,7 ± 3,0 | 13,0 ± 3,0 |
| FEJ | G1 | 43,7 ± 3,2 | 44,3 ± 8,5 | 53,0 ± 3,6† | 52,3 ± 4,0† | 58,0 ± 1,7*† | 58,7 ± 3,2 |
| | G2 | 40,0 ± 4,9 | 36,3 ± 4,5 | 32,7 ± 4,1 | 32,0 ± 6,1 | 31,7 ± 8,9 | 30,0 ± 9,0 |
| FEC | G1 | 21,0 ± 1,7 | 21,7 ± 4,7 | 27,0 ± 2,6† | 26,7 ± 2,5† | 30,0 ± 1,7*† | 30,7 ± 2,3 |
| | G2 | 17,0 ± 2,5 | 16,7 ± 3,2 | 15,0 ± 2,0 | 14,7 ± 2,9 | 15,0 ± 6,2 | 14,0 ± 4,0 |
| IEPs | G1 | 3,29 ± 1,02 | 3,27 ± 0,29 | 2,77 ± 0,57 | 2,55 ± 0,43 | 1,92 ± 0,10*† | 2,26 ± 0,3 |
| | G2 | 3,20 ± 0,33 | 3,45 ± 0,56 | 3,69 ± 0,68 | 4,19 ± 1,22 | 3,78 ± 0,92 | 3,68 ± 0,3 |
| IEPd | G1 | 4,54 ± 1,25 | 4,79 ± 0,52 | 5,22 ± 0,93 | 5,49 ± 0,24 | 4,82 ± 0,32 | 4,73 ± 0,5 |
| | G2 | 3,90 ± 0,46 | 4,27 ± 0,48 | 4,84 ± 1,00 | 4,96 ± 0,90 | 5,55 ± 1,17 | 5,04 ± 0,3 |

SIV: espessamento fracional do septo interventricular (%); PLVE: espessamento fracional da parede livre do ventrículo esquerdo (%); FEJ: fração de ejeção (%); IEPs: índice de estresse da parede em sístole; IEPd: índice de estresse da parede em diástole.

* Diferença significativa (P<0,05) em relação a M0 (pré-transplante)

† Diferença significativa (P<0,05) entre grupos

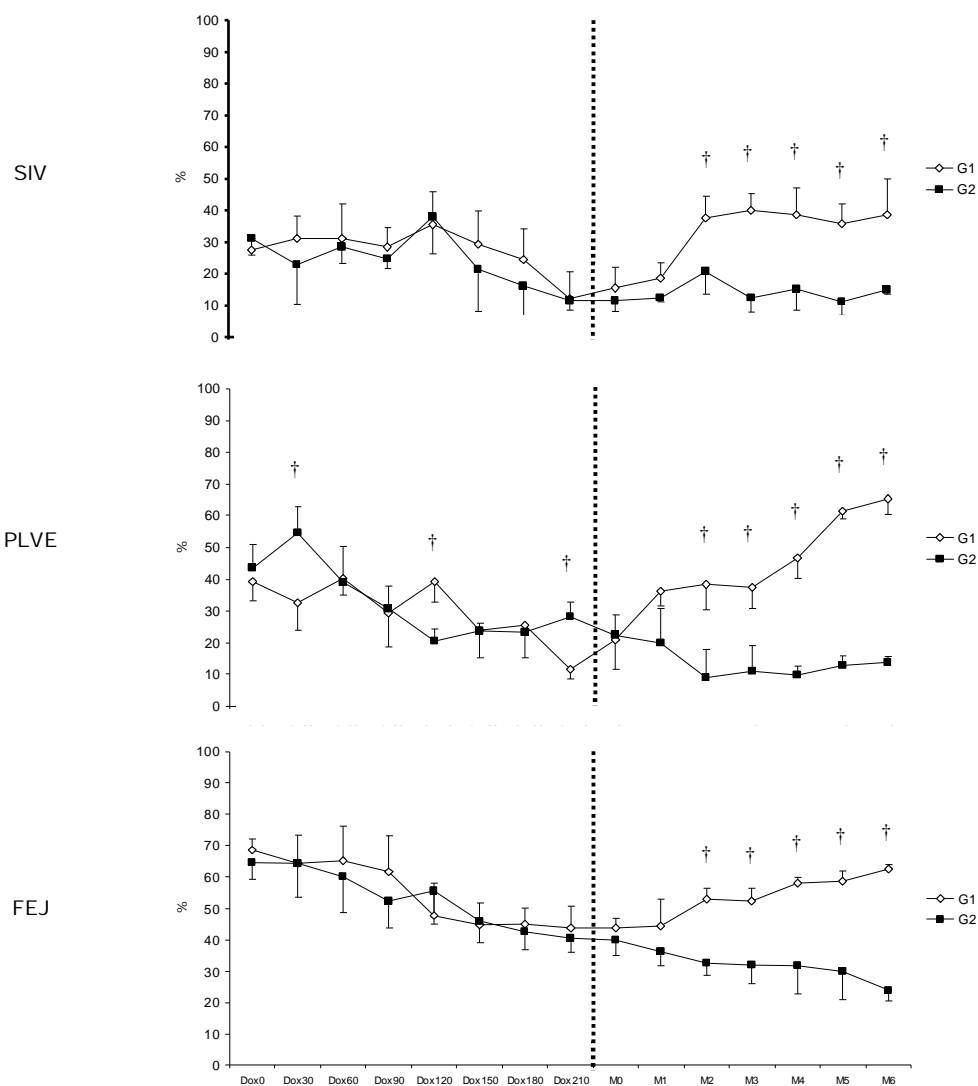


Figura 17 – Representação gráfica das médias \pm DP dos parâmetros ecocardiográficos SIV, PLVE e FEJ de cães ao longo da exposição a doses cumulativas de doxorubicina (Dox0 a Dox210) e na evolução pós-transplante (M0 a M6) de células-tronco hematopoiéticas autólogas (G1) ou não (G2). Unesp, Jaboticabal, SP (2007).

† Grupos diferem entre si ($P < 0,05$).

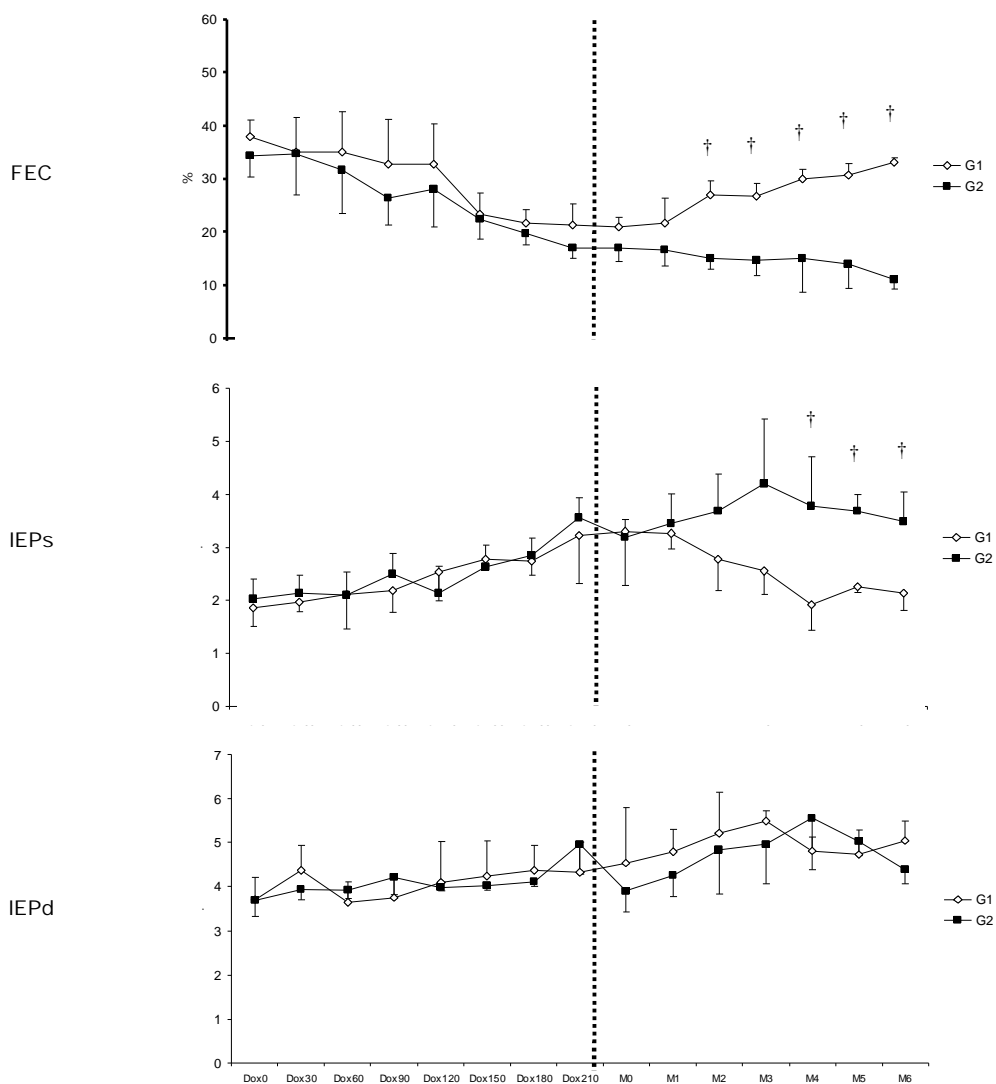


Figura 18 – Representação gráfica das médias \pm DP dos parâmetros ecocardiográficos FEC, IEPs e IEPd de cães ao longo da exposição a doses cumulativas de doxorubicina (Dox0 a Dox210) e na evolução pós-transplante (M0 a M6) de células-tronco hematopoiéticas autólogas (G1) ou não (G2). Unesp, Jaboticabal, SP (2007).

† Grupos diferem entre si ($P < 0,05$).

Tabela 16 – Parâmetros ecocardiográficos (média ± DP) obtidos pelo Doppler pulsado, em cães submetidos a doses de doxapramina durante a indução de cardiomiopatia dilatada (G1: n=3; G2: n=3). Unesp, Jaboticabal, SP (2007).

| Parâmetro | | Fase de Indução da Cardiomiopatia | | | | | | |
|-----------|----|-----------------------------------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|-------------|
| | | Dox0 | Dox30 | Dox60 | Dox90 | Dox120 | Dox150 | Dox180 |
| PVPUL | G1 | 1,11 ± 0,10 | 1,13 ± 0,04 | 1,03 ± 0,06 | 1,03 ± 0,16 | 0,99 ± 0,19 | 1,00 ± 0,17 | 0,93 ± 0,10 |
| | G2 | 1,11 ± 0,09 | 1,06 ± 0,07 | 1,02 ± 0,09 | 1,03 ± 0,06 | 0,75 ± 0,11* | 0,81 ± 0,07* | 0,88 ± 0,07 |
| PVAO | G1 | 1,24 ± 0,02 | 1,22 ± 0,07 | 1,16 ± 0,11 | 1,17 ± 0,05 | 1,18 ± 0,03 | 1,16 ± 0,04 | 1,11 ± 0,04 |
| | G2 | 1,26 ± 0,03 | 1,18 ± 0,06 | 1,16 ± 0,09 | 1,17 ± 0,06 | 1,13 ± 0,09 | 1,02 ± 0,16* | 0,85 ± 0,04 |
| PVME | G1 | 0,86 ± 0,20 | 0,86 ± 0,04 | 0,88 ± 0,05 | 0,87 ± 0,12 | 0,73 ± 0,20 | 0,76 ± 0,16 | 0,80 ± 0,04 |
| | G2 | 0,86 ± 0,21 | 0,83 ± 0,05 | 0,77 ± 0,07 | 0,71 ± 0,04 | 0,67 ± 0,14 | 0,66 ± 0,04 | 0,68 ± 0,04 |
| PVMA | G1 | 0,75 ± 0,07 | 0,69 ± 0,05 | 0,64 ± 0,11 | 0,59 ± 0,07 | 0,53 ± 0,12 | 0,57 ± 0,15 | 0,62 ± 0,04 |
| | G2 | 0,76 ± 0,10 | 0,62 ± 0,09 | 0,65 ± 0,07 | 0,68 ± 0,05 | 0,53 ± 0,11 | 0,63 ± 0,09 | 0,66 ± 0,04 |
| PVTE | G1 | 0,82 ± 0,16 | 0,59 ± 0,14 | 0,66 ± 0,03 | 0,65 ± 0,14 | 0,70 ± 0,16 | 0,79 ± 0,03 | 0,67 ± 0,04 |
| | G2 | 0,76 ± 0,12 | 0,59 ± 0,16 | 0,74 ± 0,11 | 0,64 ± 0,10 | 0,62 ± 0,09 | 0,72 ± 0,04 | 0,73 ± 0,04 |
| PVTA | G1 | 0,59 ± 0,06 | 0,59 ± 0,04 | 0,61 ± 0,20 | 0,63 ± 0,18 | 0,62 ± 0,19 | 0,56 ± 0,11 | 0,50 ± 0,04 |
| | G2 | 0,52 ± 0,12 | 0,67 ± 0,16 | 0,54 ± 0,11 | 0,74 ± 0,10 | 0,59 ± 0,09 | 0,62 ± 0,04 | 0,67 ± 0,04 |
| PPE | G1 | 36,5 ± 6,7 | 40,9 ± 5,0 | 51,1 ± 13,3 | 47,4 ± 6,0 | 43,3 ± 4,6 | 47,9 ± 5,1 | 51,2 ± 10,3 |
| | G2 | 32,0 ± 4,6 | 39,5 ± 4,5 | 45,4 ± 4,1 | 49,9 ± 10,1 | 42,4 ± 4,1 | 52,1 ± 12,3 | 55,5 ± 10,3 |
| TEVE | G1 | 212,7±11,7 | 220,3±4,6 | 222,7±10,6 | 212,3±4,6 | 205,0±4,6 | 207,7±6,6 | 220,3±11,7 |
| | G2 | 223,3±19,1 | 220,0±8,7 | 222,7±7,5 | 217,7±9,2 | 210,0±2,5 | 215,7±13,3 | 212,7±11,7 |
| TRIV | G1 | 33,1 ± 7,7 | 35,7 ± 6,5 | 41,0 ± 4,4 | 50,8 ± 5,2* | 48,0 ± 2,0* | 48,7 ± 4,6* | 54,5 ± 10,3 |
| | G2 | 30,2 ± 10,3 | 40,2 ± 4,5 | 45,6 ± 12,1 | 42,7 ± 12,0 | 48,3 ± 11,7 | 50,9 ± 5,6* | 55,0 ± 10,3 |

PVPUL: pico de velocidade do fluxo trans-pulmônico (m/s); PVAO: pico de velocidade do fluxo trans-aórtico (m/s); PVME: pico de velocidade da onda E do fluxo mitral (m/s); PVMA: pico de velocidade da onda A do fluxo mitral (m/s); PVTE: pico de velocidade da onda E do fluxo tricúspide (m/s); PVTA: pico de velocidade da onda A do fluxo tricúspide (m/s); PPE: tempo de ejeção (mseg); TEVE: tempo de ejeção ventricular esquerda (mseg); TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico (mseg).

* Diferença significativa (P<0,05) em relação a Dox0 (basal)

† Diferença significativa (P<0,05) entre grupos

Tabela 17 – Parâmetros ecocardiográficos (média ± DP) obtidos pelo Doppler pulsado em cães com cardiomiopatia dilatada submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas autólogas (G1; n=3) e cães controle (G2; n=3) em diferentes momentos (M0 a M5).

| Parâmetro | | M0 | M1 | M2 | M3 | M4 | M5 |
|-----------|----|-------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------|
| PVPUL | G1 | 0,90 ± 0,12 | 0,87 ± 0,08 | 1,03 ± 0,09 | 0,94 ± 0,20 | 1,01 ± 0,06 | 1,00 ± 0,06 |
| | G2 | 0,90 ± 0,11 | 0,89 ± 0,18 | 0,98 ± 0,19 | 0,99 ± 0,11 | 0,96 ± 0,05 | 1,01 ± 0,06 |
| PVAO | G1 | 1,02 ± 0,19 | 1,05 ± 0,16 | 1,15 ± 0,27 | 1,18 ± 0,29 | 1,11 ± 0,12 | 1,13 ± 0,12 |
| | G2 | 0,99 ± 0,07 | 0,98 ± 0,05 | 1,07 ± 0,10 | 1,11 ± 0,07 | 1,03 ± 0,08 | 1,07 ± 0,07 |
| PVME | G1 | 0,62 ± 0,18 | 0,70 ± 0,13 | 0,91 ± 0,04 [†] | 0,73 ± 0,11 | 0,81 ± 0,03 [†] | 0,78 ± 0,06 |
| | G2 | 0,59 ± 0,09 | 0,65 ± 0,06 | 0,71 ± 0,05 | 0,66 ± 0,03 | 0,71 ± 0,04 | 0,70 ± 0,04 |
| PVMA | G1 | 0,50 ± 0,14 | 0,60 ± 0,13 | 0,56 ± 0,08 | 0,52 ± 0,07 | 0,55 ± 0,08 | 0,62 ± 0,06 |
| | G2 | 0,62 ± 0,13 | 0,52 ± 0,04 | 0,53 ± 0,05 | 0,56 ± 0,12 | 0,52 ± 0,09 | 0,54 ± 0,06 |
| PVTE | G1 | 0,75 ± 0,04 | 0,63 ± 0,22 | 0,73 ± 0,04 [†] | 0,75 ± 0,05 | 0,77 ± 0,08 | 0,72 ± 0,06 |
| | G2 | 0,60 ± 0,10 | 0,59 ± 0,10 | 0,62 ± 0,02 | 0,65 ± 0,10 | 0,66 ± 0,07 | 0,64 ± 0,06 |
| PVTA | G1 | 0,54 ± 0,05 | 0,58 ± 0,12 | 0,60 ± 0,05 | 0,56 ± 0,14 | 0,48 ± 0,03 | 0,48 ± 0,03 |
| | G2 | 0,55 ± 0,15 | 0,41 ± 0,07 | 0,52 ± 0,04 | 0,52 ± 0,03 | 0,52 ± 0,07 | 0,52 ± 0,06 |
| PPE | G1 | 66,5 ± 12,2 | 57,8 ± 10,7 | 49,8 ± 9,0 | 41,2 ± 5,2 ^{*†} | 36,1 ± 3,7 ^{*†} | 34,7 ± 3,1 |
| | G2 | 68,2 ± 7,8 | 68,4 ± 14,2 | 61,0 ± 4,1 | 71,3 ± 6,4 | 72,7 ± 8,5 | 64,2 ± 13,1 |
| TEVE | G1 | 200,0±4,0 | 215,0±20,2 | 220,0±11,8 | 243,0±11,8 | 220,3±23,5 | 235,3±24,1 |
| | G2 | 225,0±16,1 | 227,7±4,1 | 225,0±8,7 | 230,7±13,3 | 227,7±17,9 | 227,7±11,1 |
| TRIV | G1 | 54,5 ± 10,5 | 39,3 ± 9,3 [*] | 34,9 ± 3,6 ^{*†} | 40,6 ± 2,7 ^{*†} | 40,6 ± 2,5 ^{*†} | 39,9 ± 2,5 |
| | G2 | 54,6 ± 4,0 | 44,7 ± 2,3 | 52,0 ± 5,4 | 57,0 ± 1,2 | 57,4 ± 8,8 | 58,0 ± 5,1 |

PVPUL: pico de velocidade do fluxo trans-pulmônico (m/s); PVAO: pico de velocidade do fluxo trans-aórtico (m/s); PVME: pico de velocidade da onda E do fluxo mitral (m/s); PVMA: pico de velocidade da onda A do fluxo mitral (m/s); PVTE: pico de velocidade da onda E do fluxo tricúspide (m/s); PVTA: pico de velocidade da onda A do fluxo tricúspide (m/s); PPE: tempo de ejeção (mseg); TEVE: tempo de ejeção ventricular esquerda (mseg); TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico (mseg).

* Diferença significativa (P<0,05) em relação a M0 (pré-transplante)

† Diferença significativa (P<0,05) entre grupos

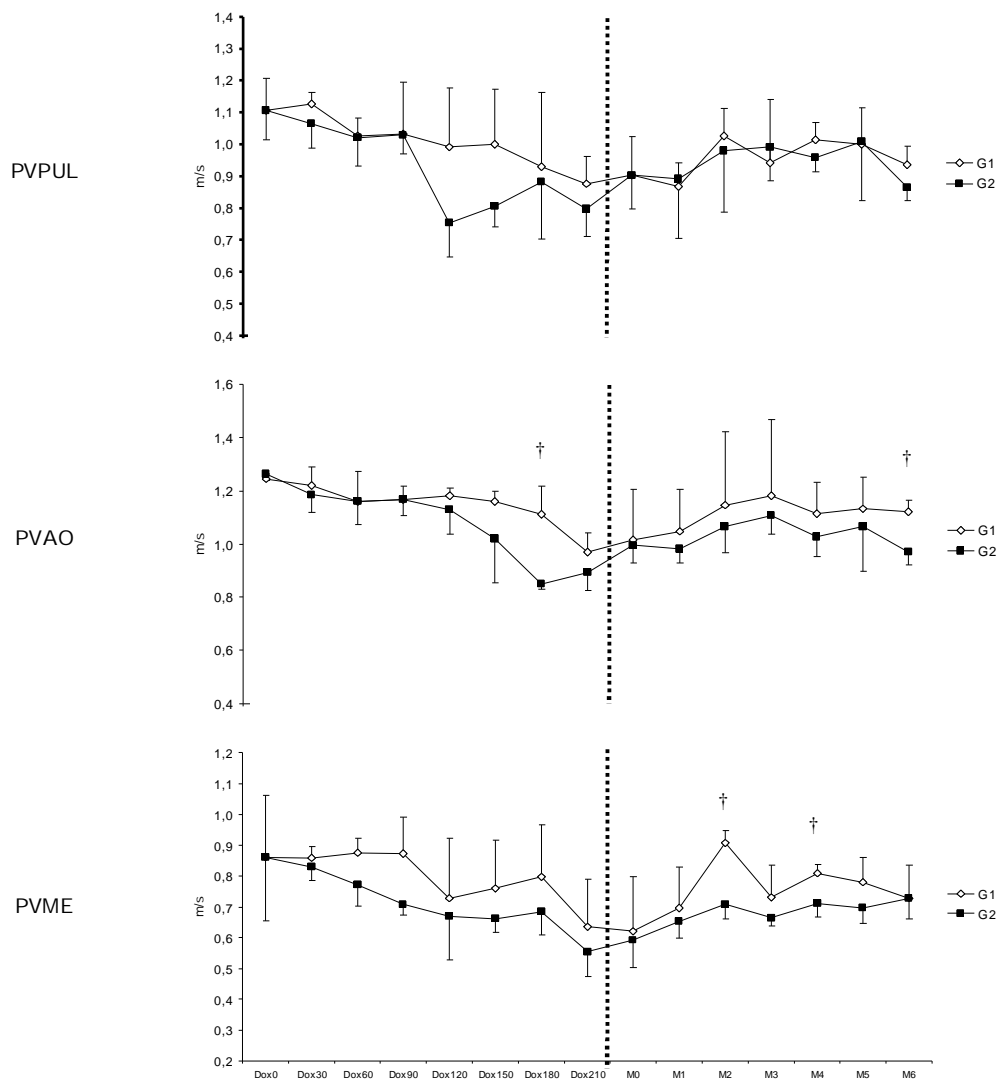


Figura 19 – Representação gráfica das médias \pm DP dos parâmetros ecocardiográficos PVPUL, PVAO e PVME de cães ao longo da exposição a doses cumulativas de doxorubicina (Dox0 a Dox210) e na evolução pós-transplante (M0 a M6) de células-tronco hematopoiéticas autólogas (G1) ou não (G2). Unesp, Jaboticabal, SP (2007).

† Grupos diferem entre si ($P < 0,05$).

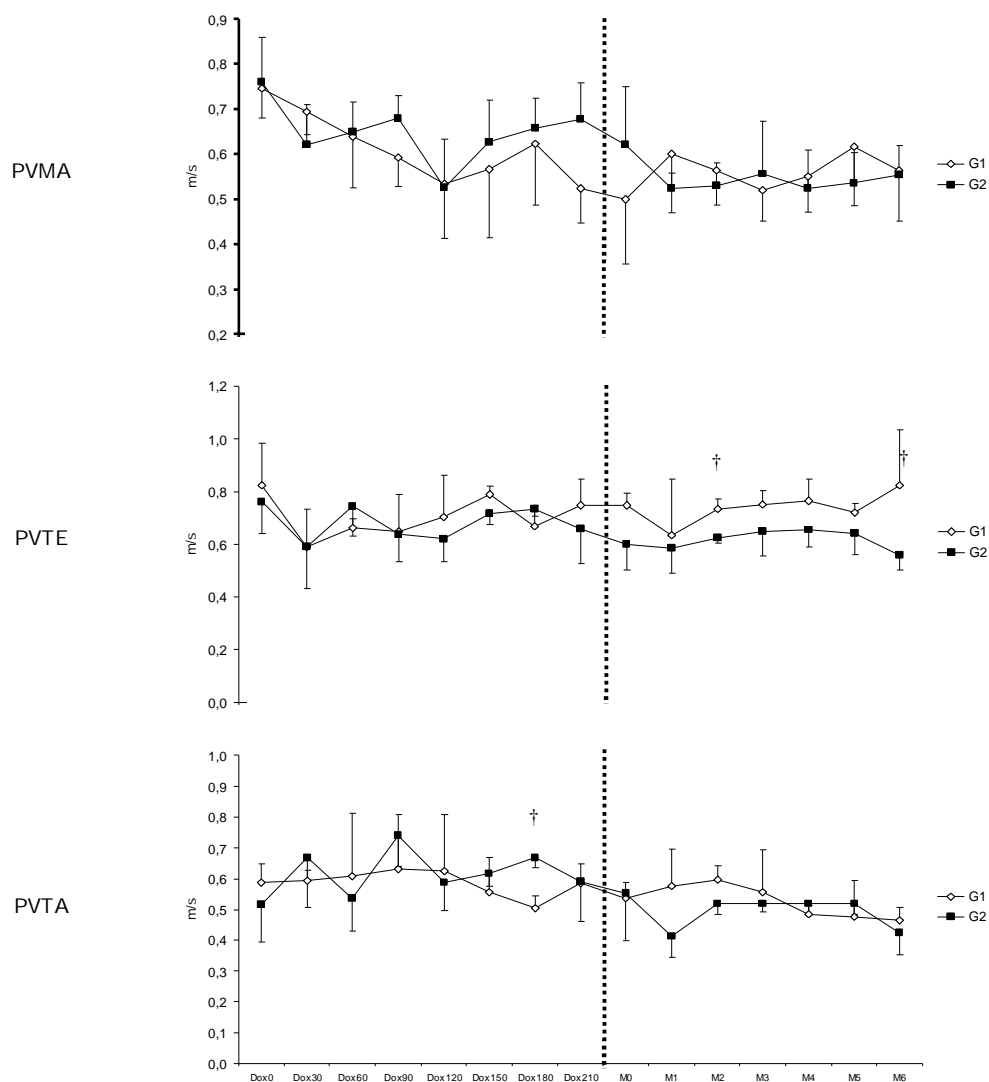


Figura 20 – Representação gráfica das médias \pm DP dos parâmetros ecocardiográficos PVMA, PVTE e PVTA de cães ao longo da exposição a doses cumulativas de doxorubicina (Dox0 a Dox210) e na evolução pós-transplante (M0 a M6) de células-tronco hematopoiéticas autólogas (G1) ou não (G2). Unesp, Jaboticabal, SP (2007).

† Grupos diferem entre si ($P < 0,05$).

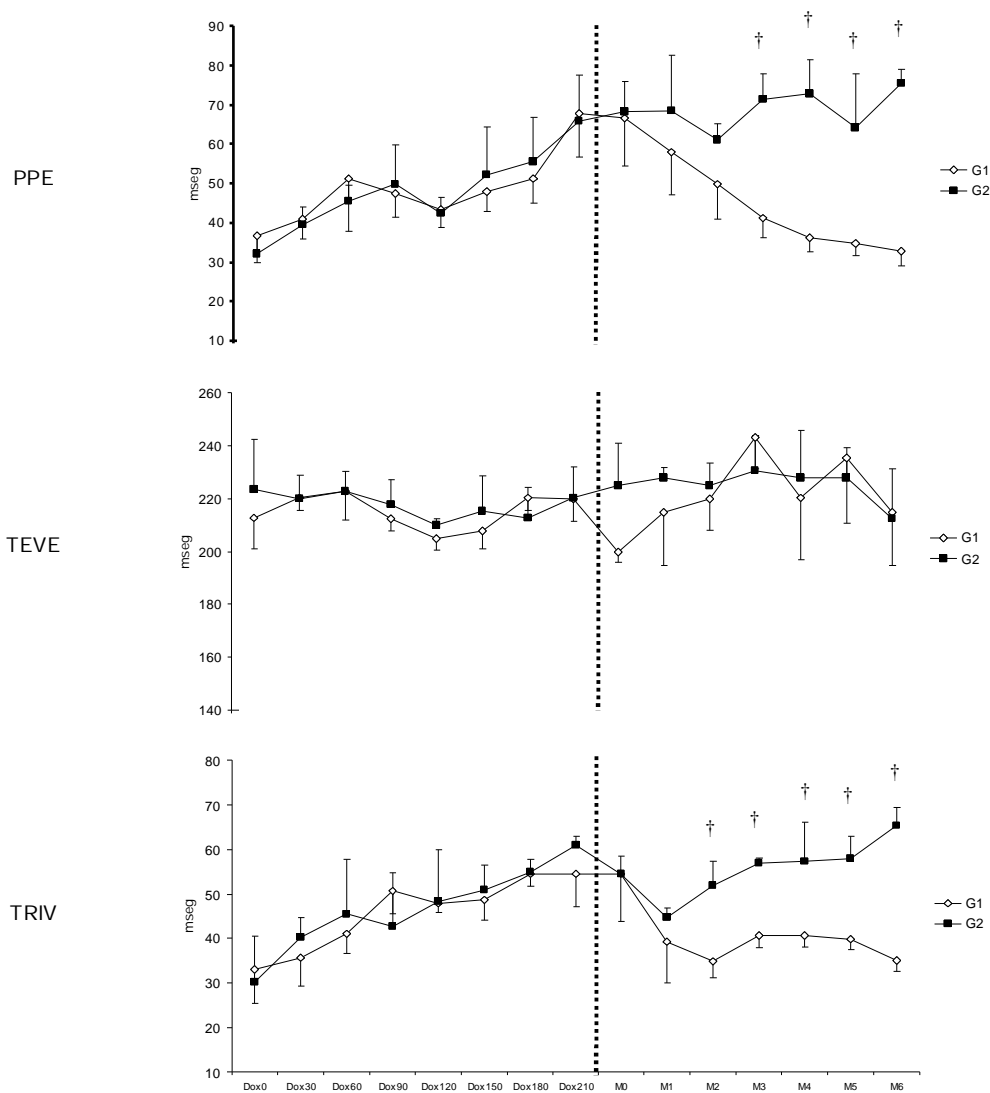


Figura 21 – Representação gráfica das médias \pm DP dos parâmetros ecocardiográficos PPE, TEVE e TRIV de cães ao longo da exposição a doses cumulativas de doxorubicina (Dox0 a Dox210) e na evolução pós-transplante (M0 a M6) de células-tronco hematopoiéticas autólogas (G1) ou não (G2). Unesp, Jaboticabal, SP (2007).

† Grupos diferem entre si ($P < 0,05$).

Tabela 18 – Índices ecocardiográficos (média ± DP) calculados a partir de parâmetros Doppler em cães submetidos a doxapramina para indução de cardiomiopatia dilatada (G1: n=3; G2: n=3). Unesp, Jaboticabal, SP (2007).

| Parâmetro | | Fase de Indução da Cardiomiopatia | | | | | | |
|---------------|----|-----------------------------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|
| | | Dox0 | Dox30 | Dox60 | Dox90 | Dox120 | Dox150 | Dox180 |
| PVME/ PVMA | G1 | 1,46 ± 0,28 | 1,24 ± 0,12 | 1,40 ± 0,25 | 1,49 ± 0,34 | 1,35 ± 0,07 | 1,45 ± 0,65 | 1,36 ± 0,12 |
| | G2 | 1,37 ± 0,30 | 1,36 ± 0,29 | 1,19 ± 0,07 | 1,14 ± 0,04 | 1,27 ± 0,02 | 1,07 ± 0,02 | 1,05 ± 0,02 |
| PVTE/ PVTA | G1 | 1,39 ± 0,13 | 1,01 ± 0,30 | 1,18 ± 0,39 | 1,10 ± 0,40 | 1,24 ± 0,57 | 1,45 ± 0,27 | 1,33 ± 0,12 |
| | G2 | 1,48 ± 0,20 | 1,46 ± 0,44 | 1,40 ± 0,11 | 1,38 ± 0,33 | 1,16 ± 0,47 | 1,24 ± 0,36 | 1,14 ± 0,12 |
| PPE/ TEVE | G1 | 0,17 ± 0,04 | 0,19 ± 0,02 | 0,23 ± 0,08 | 0,22 ± 0,02 | 0,21 ± 0,04 | 0,23 ± 0,03 | 0,23 ± 0,03 |
| | G2 | 0,13 ± 0,03 | 0,18 ± 0,02 | 0,25 ± 0,02 | 0,23 ± 0,04 | 0,20 ± 0,03 | 0,25 ± 0,08 | 0,26 ± 0,03 |
| VMEF | G1 | 1,79 ± 0,19 | 1,70 ± 0,33 | 1,59 ± 0,37 | 1,54 ± 0,40 | 1,47 ± 0,23 | 1,15 ± 0,34 | 0,98 ± 0,12 |
| | G2 | 1,42 ± 0,24 | 1,59 ± 0,41 | 1,43 ± 0,42 | 1,22 ± 0,28 | 1,33 ± 0,26 | 1,03 ± 0,12 | 0,92 ± 0,12 |
| IE | G1 | 53,3 ± 7,3 | 55,3 ± 8,1 | 46,8 ± 12,8 | 44,4 ± 14,1 | 49,1 ± 11,1 | 38,3 ± 6,0 | 36,8 ± 6,0 |
| | G2 | 46,9 ± 8,5 | 51,0 ± 11,5 | 45,8 ± 12,0 | 40,1 ± 6,2 | 42,0 ± 6,8 | 37,9 ± 3,8 | 35,3 ± 6,0 |
| IC | G1 | 5,2 ± 1,6 | 6,4 ± 0,6 | 5,0 ± 0,9 | 4,4 ± 2,5 | 5,2 ± 1,8 | 4,7 ± 1,6 | 5,1 ± 1,6 |
| | G2 | 5,5 ± 2,1 | 5,8 ± 0,2 | 4,5 ± 0,6 | 4,4 ± 0,3 | 4,9 ± 1,4 | 4,9 ± 1,5 | 4,4 ± 1,6 |
| ITEI | G1 | 0,28 ± 0,03 | 0,35 ± 0,05 | 0,42 ± 0,10 | 0,46 ± 0,03* | 0,44 ± 0,07* | 0,47 ± 0,04* | 0,48 ± 0,03 |
| | G2 | 0,25 ± 0,05 | 0,36 ± 0,03 | 0,45 ± 0,07* | 0,43 ± 0,05* | 0,43 ± 0,05* | 0,50 ± 0,07* | 0,50 ± 0,03 |

PVME/PVMA: relação entre PVME e PVMA; PVTE/PVTA: relação entre PVTE e PVTA; PPE/TEVE: relação entre PPE e TEVE; VMEF: velocidade média de fluxo em fibras miocárdicas (circunferências/s); IE: índice de ejeção (mL/batimento x m²); IC: índice cardíaco (L/min x m²); ITEI: índice de performance miocárdico

* Diferença significativa (P<0,05) em relação a Dox0 (basal)

Tabela 19 – Índices ecocardiográficos (média ± DP) calculados a partir de parâmetros Doppler em cães com cardiomiopatia dilatada submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas autólogas (G1; n=3) e cães controle (G2; n=3)

| Parâmetro | | M0 | M1 | M2 | M3 | M4 | M5 |
|---------------|----|-------------|-------------|---------------|---------------|---------------|------------|
| PVME/ PVMA | G1 | 1,26 ± 0,29 | 1,24 ± 0,50 | 1,63 ± 0,27 | 1,40 ± 0,10 | 1,49 ± 0,15 | 1,29 ± 0,0 |
| | G2 | 1,12 ± 0,30 | 1,25 ± 0,29 | 1,34 ± 0,34 | 1,23 ± 0,26 | 1,38 ± 0,42 | 1,31 ± 0,0 |
| PVTE/ PVTA | G1 | 1,40 ± 0,07 | 1,13 ± 0,43 | 1,23 ± 0,08 | 1,40 ± 0,30 | 1,58 ± 0,09 | 1,59 ± 0,0 |
| | G2 | 1,16 ± 0,41 | 1,12 ± 0,16 | 1,20 ± 0,25 | 1,25 ± 0,33 | 1,27 ± 0,36 | 1,24 ± 0,0 |
| PPE/ TEVE | G1 | 0,33 ± 0,11 | 0,27 ± 0,05 | 0,23 ± 0,05 | 0,17 ± 0,03*† | 0,16 ± 0,02*† | 0,15 ± 0,0 |
| | G2 | 0,30 ± 0,03 | 0,30 ± 0,06 | 0,27 ± 0,03 | 0,31 ± 0,04 | 0,32 ± 0,04 | 0,28 ± 0,0 |
| VMEF | G1 | 1,05 ± 0,09 | 1,01 ± 0,19 | 1,23 ± 0,07† | 1,10 ± 0,15† | 1,38 ± 0,21† | 1,32 ± 0,2 |
| | G2 | 0,84 ± 0,12 | 0,75 ± 0,01 | 0,67 ± 0,09 | 0,64 ± 0,15 | 0,66 ± 0,25 | 0,61 ± 0,0 |
| IE | G1 | 41,9 ± 7,3 | 41,7 ± 7,9 | 50,9 ± 6,5† | 43,3 ± 2,0† | 46,6 ± 2,4† | 53,3 ± 3,0 |
| | G2 | 34,2 ± 15,2 | 30,6 ± 5,2 | 34,6 ± 4,1 | 29,8 ± 3,7 | 28,6 ± 6,1 | 36,4 ± 4,0 |
| IC | G1 | 4,5 ± 1,0 | 4,5 ± 2,3 | 5,0 ± 1,6 | 4,5 ± 1,0† | 5,8 ± 2,9 | 5,2 ± 1,0 |
| | G2 | 2,9 ± 1,1 | 3,1 ± 0,4 | 3,9 ± 1,8 | 2,7 ± 0,4 | 3,3 ± 0,8 | 3,8 ± 0,0 |
| ITEI | G1 | 0,61 ± 0,13 | 0,46 ± 0,10 | 0,39 ± 0,05*† | 0,35 ± 0,03*† | 0,34 ± 0,04*† | 0,32 ± 0,0 |
| | G2 | 0,55 ± 0,03 | 0,50 ± 0,06 | 0,50 ± 0,01 | 0,56 ± 0,05 | 0,57 ± 0,05 | 0,51 ± 0,0 |

PVME/PVMA: relação entre PVME e PVMA; PVTE/PVTA: relação entre PVTE e PVTA; PPE/TEVE: relação entre PPE e TEVE; VMEF: velocidade média das fibras miocárdicas (circunferências/s); IE: índice de ejeção (mL/batimento x m²); IC: índice cardíaco (L/min x m²); ITEI: índice de performance miocárdico

* Diferença significativa (P<0,05) em relação a M0 (pré-transplante)

† Diferença significativa (P<0,05) entre grupos

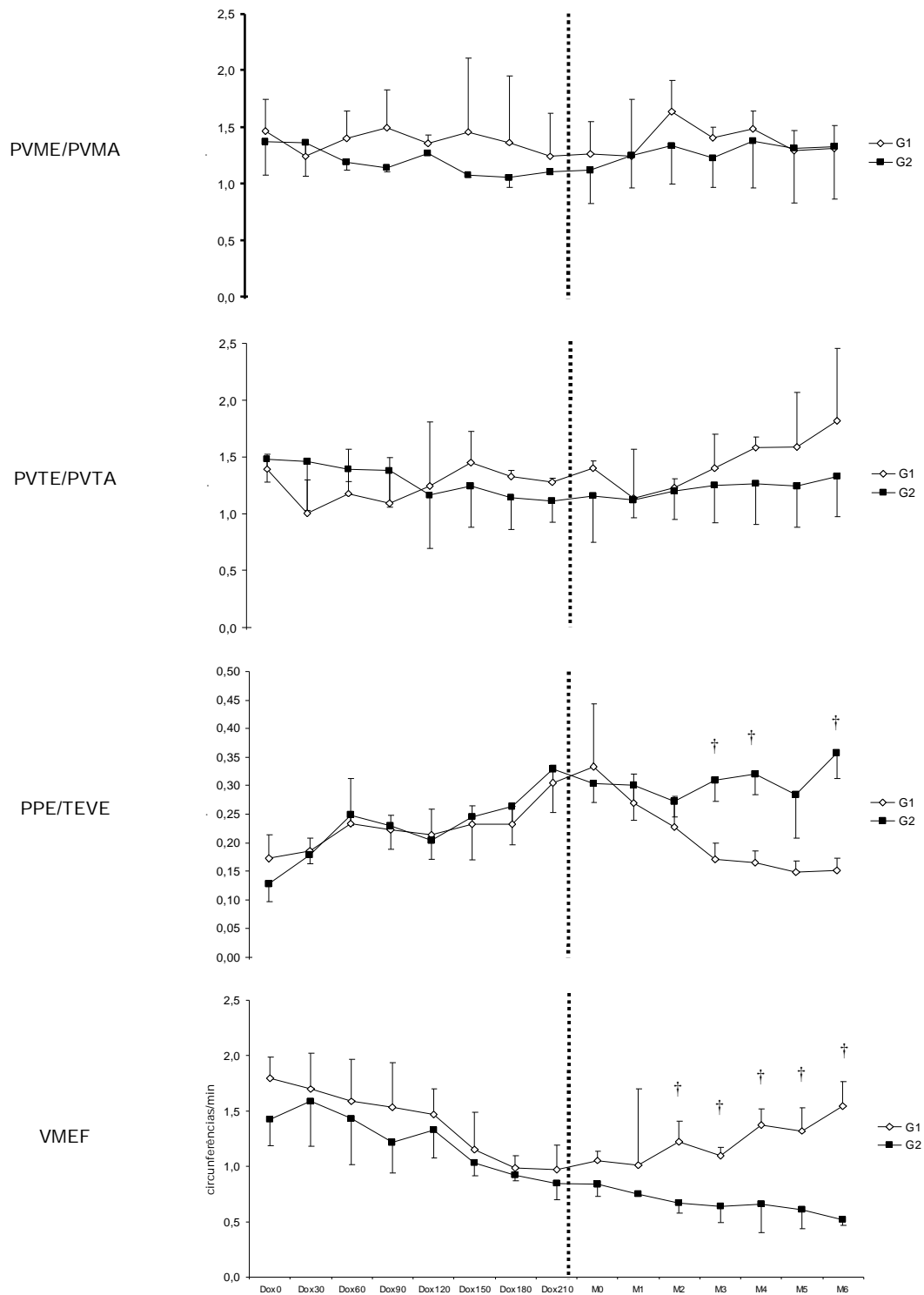


Figura 22 – Representação gráfica das médias \pm DP dos parâmetros ecocardiográficos PVME/PVMA, PVTE/PVTA, PPE/TEVE e VMEF de cães ao longo da exposição a doses cumulativas de doxorubicina (Dox0 a Dox210) e na evolução pós-transplante (M0 a M6) de células-tronco hematopoiéticas autólogas (G1) ou não (G2). Unesp, Jaboticabal, SP (2007).

† Grupos diferem entre si ($P < 0,05$).

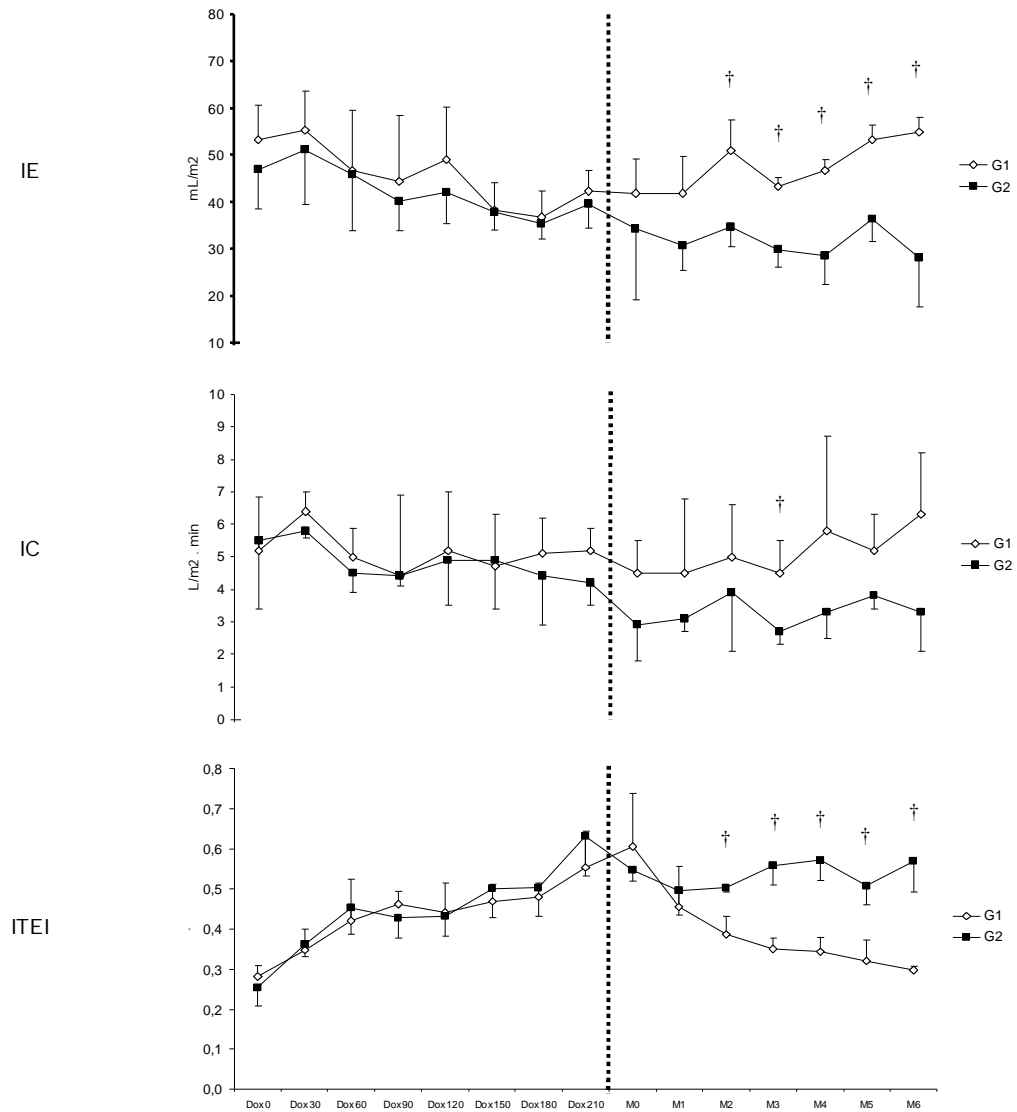


Figura 23 – Representação gráfica das médias \pm DP dos parâmetros ecocardiográficos IE, IC e ITEI de cães ao longo da exposição a doses cumulativas de doxorubicina (Dox0 a Dox210) e na evolução pós-transplante (M0 a M6) de células-tronco hematopoiéticas autólogas (G1) ou não (G2). Unesp, Jaboticabal, SP (2007).

† Grupos diferem entre si ($P < 0,05$).

4. DISCUSSÃO

Embora não seja o objetivo primário deste estudo descrever as alterações miocárdicas morfológicas e funcionais decorrentes do uso da doxorubicina, percebe-se claramente que seus efeitos cardiotoxícos são dose-dependentes (MAUDLIN et al., 1992). Tendo atingido a dose cumulativa de 120 mg de doxorubicina/m², muitos dos animais incluídos no estudo já demonstraram alterações significativas nos parâmetros indicadores de função sistólica. À medida que a infusão do fármaco progrediu, diversas variáveis também se modificaram estatisticamente, de modo que quando se alcançou 210 mg/m², todos os cães apresentavam importante disfunção sistólica valendo-se de indicadores ecocardiográficos. Tal fato corrobora outros estudos já realizados, nos quais o efeito cardiotoxíco da doxorubicina mostra-se progressivo e capaz de mimetizar os achados clínicos e ecocardiográficos da cardiomiopatia dilatada idiopática (SOUZA, 2004; SILVA & CAMACHO, 2005). Por outro lado, nenhum dos animais integrantes deste estudo apresentou sinais de insuficiência cardíaca congestiva severa, tais como edema pulmonar, contradizendo MAUDLIN et al. (1992), que reporta ser possível a ocorrência de ICC nos cães já a partir de 90 mg de doxorubicina/m². Este fato denota a variação nas respostas individuais dos animais frente à terapia antraciclínica.

Para a função diastólica, os resultados verificados na fase de indução da cardiomiopatia demonstram algum grau de comprometimento significativo a partir de 90 mg/m². Embora inadvertidamente deixada de lado em muitos estudos veterinários, já se demonstrou disfunção diastólica em pacientes humanos recebendo terapia antraciclínica em um protocolo quimioterápico para tratamento de câncer de mama (TJEERDSMA et al., 1999). Curiosamente, MARCHANDISE et al. (1989) e STODDARD et al. (1992) demonstraram que a disfunção diastólica pode revelar-se primariamente à disfunção sistólica, sendo, portanto, um indicador mais precoce da cardiotoxicidade desencadeada pela doxorubicina.

Não ocorreram quaisquer complicações durante o processo de colheita da medula óssea e separação da fração mononuclear, na qual encontram-se as células-

tronco, corroborando ISHIDA et al (2004) que efetuaram procedimento similar em ratos com cardiomiopatia induzida pela doxorrubicina e não encontraram dificuldade em coletar a medula óssea e fracionar seus componentes. O protocolo de separação utilizado neste estudo é condizente com aquele citado por VILAS-BOAS et al. (2004) e VILAS-BOAS et al. (2006), que também obtiveram taxa satisfatória de recuperação celular.

Não foram verificados distúrbios no ritmo cardíaco ao se cateterizar a artéria coronária esquerda para transplante da solução de células mononucleares. Ao transplantar células-tronco em seres humanos recebendo doxorrubicina, entretanto, ANDO et al. (2000) observaram anormalidades no segmento ST e arritmias atriais e ventriculares, bem como bloqueios atrio-ventriculares e um episódio de assistolia. CHEN et al. (2006a) estudaram os efeitos do transplante de células-tronco autólogas em coelhos com cardiomiopatia antraciclínica e constataram ser o transplante exacerbador de anormalidades na condução ventricular no sítio de aplicação, fato este atribuído ao prolongamento do tempo de ativação local, bem como ao aumento de sua dispersão. Por outro lado, ao transplantar células-tronco diretamente no seio coronariano de seres humanos com angina refratária, VICARIO et al. (2005) não detectaram distúrbios no ritmo e/ou anormalidades de condução.

A oclusão temporária da artéria coronária esquerda foi bem tolerada nos cães estudados. Embora seja considerada de fácil realização e menos invasiva, a técnica de transplante intracoronariano escolhida para este estudo apresenta como desvantagens a necessidade de treinamento adequado e equipamentos especializados para sua realização. Adicionalmente, existe a possibilidade de que parte das células infundidas não se alojem no miocárdio lesado, distribuindo-se aleatoriamente pelo organismo após serem transportadas para a circulação sistêmica (KORNOWSKI et al., 2000; YOKOYAMA et al., 2006). Embora as células transplantadas não tenham sido marcadas, é provável que um percentual razoável tenha se implantado no tecido miocárdico. Ao realizarem xenotransplante de células-tronco mesenquimais marcadas com bromodioxiuridina em coelhos com infarto do miocárdio experimental, WANG et al. (2005) constataram, quatro semanas pós-transplante, adequada distribuição celular na

região lesada a partir de focos positivos de incorporação do marcador ao DNA dos cardiomiócitos em divisão. Em tal estudo, as células de fato se transdiferenciaram em cardiomiócitos, uma vez que expressavam troponina I, característica do fenótipo celular cardíaco. VICARIO et al. (2005), por sua vez, ao transplantarem as células-tronco de forma similar àquela empregada neste estudo, constataram adequada distribuição das mesmas no miocárdio lesado duas semanas após o procedimento. Em outra pesquisa utilizando coelhos com cardiomiopatia induzida pela doxorubicina, CHEN et al. (2005) e CHEN et al. (2006b) transplantaram células-tronco diretamente na raiz aórtica durante breve oclusão da aorta ascendente com balão e ainda assim verificaram incremento na fração de ejeção quatro semanas após o procedimento, assim como constataram a distribuição celular pelas interfaces cardíacas dos ventrículos direito e esquerdo.

Apenas um óbito foi verificado ao longo do estudo, o qual deveu-se à ocorrência de insuficiência renal intratável. Embora os procedimentos anestésicos para colheita e transplante da solução de células-tronco tenham sido cuidadosamente conduzidos, os achados laboratoriais obtidos durante tal ocorrência sugerem um quadro de necrose tubular aguda (GRAUER & LANE, 1995). Ainda que tenham sido tomadas as medidas cabíveis na tentativa de reverter o processo, o paciente desenvolveu anúria não responsiva à fluidoterapia, diuréticos e infusão contínua de dopamina. Além disso, o severo quadro urêmico deteriorou acentuadamente o estado clínico do cão, tornando necessária sua eutanásia.

Embora não tenham sido identificadas variações clinicamente importantes nos parâmetros eletrocardiográficos após a realização da terapia celular nos pacientes incluídos neste estudo, CHEN et al. (2006a) já demonstraram, em coelhos tratados com doxorubicina, que o transplante de células-tronco mesenquimais poderia acentuar anormalidades na condução ventricular do coração enfermo. De forma similar, ANDO et al. (2000) também identificaram arritmias durante a infusão de solução de células-tronco em seres humanos submetidos à quimioterapia com fármacos antraciclínicos. O acréscimo verificado nos parâmetros QRSms e RmV na fase de indução da cardiomiopatia deve-se, provavelmente, à sobrecarga ventricular esquerda (TILLEY, 1992). Na fase pós-transplante, contudo, a inadequada sensibilidade do exame

eletrocardiográfico em detectar variações na dimensão e função das estruturas cardíacas possivelmente permitiu que os parâmetros eletrocardiográficos se mantivessem constantes no decorrer do estudo, exceto por pequenas variações sem implicações clínicas (TILLEY, 1992; GOODWIN, 2002). Ainda assim, não é possível descartar completamente a ocorrência de arritmias e alterações de condução elétrica, uma vez que os animais foram avaliados pontualmente, não sendo submetidos à eletrocardiografia dinâmica pelo período de 24 horas para se excluir distúrbios paroxísticos (GOODWIN, 2002; MUCHA, 2007).

Não se atribuiu importância clínica às poucas variações significativas detectadas na pressão arterial ao longo da infusão da doxorubicina e até mesmo após a terapia celular, uma vez que se inserem dentro da faixa de referência aceitável para a espécie canina e, possivelmente, refletem variações fisiológicas inerentes aos animais estudados (MUCHA & CAMACHO, 2007). Ao avaliar cães tratados cronicamente com doxorubicina, SOUZA (2004) também não identificou variações importantes na pressão arterial, diferindo, contudo, de ARNOLDA et al. (1985) em seu estudo com coelhos. Todavia, é interessante notar que a ativação de mecanismos neurohumorais compensatórios à medida que a insuficiência miocárdica sistólica se instala pela cardiotoxicidade antraciclínica, desencadeia vasoconstrição arteriolar e aumento da volemia, permitindo que a pressão arterial mantenha-se relativamente constante (SISSON et al., 1999).

No que tange à ecocardiografia, houve acentuada variação dos parâmetros indicadores de função sistólica e diastólica ao longo da indução da cardiomiopatia. Assim, à medida que se aumentava a dose cumulativa, progredia-se a disfunção miocárdica. A cardiotoxicidade em questão decorre da liberação de metabólitos do ácido araquidônico, histamina, fator ativador de plaquetas e radicais livres no músculo cardíaco, resultando em perda funcional, com conseqüente remodelamento miocárdico (TOYODA et al., 1998; SOUZA, 2004; SOUSA & CAMACHO, 2007). Tais substâncias desencadeiam deformação do núcleo celular com reorganização do sistema nucleolar, focos difusos de lise das miofibrilas, dilatação do retículo sarcoplasmático liso e do espaço perinuclear. Em conjunto, essas alterações

ultra-estruturais norteiam a degeneração dos cardiomiócitos, levando à sua apoptose e reabsorção por células mononucleares (LUSHNIKOVA et al., 2005). Os resultados encontrados neste estudo ao longo da fase de indução são semelhantes àqueles verificados nos ensaios de SOUZA (2004) e SILVA & CAMACHO (2005), os quais também notaram aumento progressivo do diâmetro interno do ventrículo esquerdo na sístole, com redução da capacidade contrátil do coração. Analisando-se o comportamento dos parâmetros estudados no grupo controle no período pós-transplante nota-se, ademais, que a disfunção miocárdica desenvolvida frente à terapia antraciclínica é irreversível, tendo tal fato sido demonstrado anteriormente por ARNOLDA et al. (1985), SOUZA (2004) e SILVA & CAMACHO (2005).

Decorridos dois meses do transplante das células mononucleares oriundas da medula óssea, notou-se acentuada recuperação da função sistólica nos animais que receberam a solução. A melhora dos parâmetros ecocardiográficos indicadores da função sistólica (DIVEs, FEC, FEJ, SIV, PLVE) no grupo que recebeu as células-tronco, provavelmente decorre do restabelecimento da capacidade contrátil do miocárdio. Considerando-se ser a FEC influenciada por pré-carga, pós-carga e contratilidade, acredita-se que sua elevação, neste caso, deva-se à redução na pós-carga (traduzida pela diminuição do IEPs) e à elevação da força contrátil do miocárdio, uma vez que pré-carga manteve-se relativamente constante na fase pós-transplante (BOON, 1998; FERRARIS, 2007). Por ser a fração de ejeção derivada dos valores das medidas unidimensionais do ventrículo esquerdo em sístole e diástole processadas pela fórmula cúbica corrigida de Teichholz (HENIK, 2002), os valores de FEJ são, destarte, proporcionais à FEC. Assim, a elevação da fração de ejeção verificada neste estudo é semelhante àquela verificada por CHEN et al. (2005) quatro semanas após transplantarem células-tronco no seio aórtico de coelhos com cardiomiopatia induzida pela doxorrubicina, bem como àquela determinada por LU et al. (2006) também decorridos quatro semanas do transplante de uma solução não-fracionada de células oriundas da medula óssea em coelhos tratados com o mesmo fármaco.

Considerando-se ser a relação PPE/TEVE inversamente proporcional à contratilidade miocárdica em face da inexistência de variações na frequência cardíaca

(HENIK, 2002; SOUSA et al., 2007), sua diminuição reflete o incremento da contratilidade nos cães submetidos ao transplante autólogo de células-tronco. Embora tenha sido identificada redução da pós-carga baseando-se em indicadores ecocardiográficos, a minimização da relação PPE/TEVE no grupo que recebeu a solução de células-tronco para valores basais encontrados antes da indução da cardiomiopatia permite inferir que, de fato, houve melhora na capacidade contrátil do miocárdio.

No que concerne à função diastólica, valendo-se do tempo de relaxamento isovolumétrico, se observou tendência de reversão do relaxamento ventricular inadequado já no primeiro mês pós-transplante. Tal fato é confirmado pela relação E:A mitral, cuja inversão ocorrida na fase de indução foi desfeita decorridos dois meses do transplante celular. O comprometimento do relaxamento miocárdico provavelmente decorre de focos de fibrose miocárdica desenvolvidos frente aos danos miocárdicos ultra-estruturais desencadeados pela terapia antraciclínica (SUSANECK, 1983; MARCHANDISE et al., 1989; STODDARD et al., 1992; TOYODA et al., 1998). Após transplante intramiocárdico de células-tronco mesenquimais em cães que apresentavam isquemia miocárdica induzida experimentalmente, SILVA et al. (2005) evidenciaram menor grau de fibrose cardíaca. Em outro estudo, SCHUSTER et al. (2004) demonstraram que células progenitoras endoteliais contidas na medula óssea podem induzir neovascularização miocárdica, prevenir a apoptose de miócitos e a substituição progressiva por colágeno, impedindo, portanto, o processo de remodelamento miocárdico. Ainda que a função diastólica do ventrículo direito não tenha sido avaliada, é provável que tenha padecido das mesmas modificações verificadas no ventrículo esquerdo na fase de indução da cardiomiopatia, uma vez que a cardiotoxicidade desencadeada pela doxorrubicina acomete o coração como um todo (TOYODA et al., 1998; SUSANECK, 1983; SOUSA & CAMACHO, 2007).

Analisando-se o índice de performance miocárdica de Tei, pode-se observar importante recuperação da função cardíaca global pós-transplante da solução de células mononucleares. Valendo-se dos tempos de contração e relaxamento isovolumétricos, bem como do tempo de ejeção ventricular esquerda, o índice de

performance miocárdica avalia conjuntamente a função sistólica e diastólica (TEI, 1995; PELLET et al., 2004). Considerando-se sua independência da geometria ventricular, bem como a pouca ou nenhuma influência exercida pela frequência cardíaca, pressão arterial, pré-carga e pós-carga em seus valores, os resultados encontrados neste estudo tornam-se condizentes com as demais variáveis que retratam a função sistólica e diastólica de forma isolada (TEI et al., 1995; SOUSA et al., 2007). É provável que a neovascularização miocárdica induzida pelo transplante de células-tronco tenha desencadeado a proliferação de miócitos cardíacos e/ou favorecido o aporte de citocinas angiogênicas que favoreçam a neovascularização miocárdica, atenuando, conseqüentemente, a redução da complacência ventricular em face da fibrose (SAITO et al., 2003; ISHIDA et al., 2004; WANG et al., 2005; LU et al., 2006).

O mecanismo exato pelo qual as células-tronco desencadeiam melhoria nos parâmetros sistólicos e diastólicos é objeto de debate. Não obstante, acredita-se que a neovascularização do miocárdio lesado desempenhe importante papel nesse sentido. Assim, a expressão seqüenciada de diversos fatores de crescimento angiogênico, quimiocinas, moléculas de adesão e enzimas proteolíticas (SIMONS et al., 2000; YANCOPOULOS et al., 2000; YOKOYAMA et al., 2006) parece estar envolvida na organização do processo de maturação do vaso em desenvolvimento. Considerando-se ser a medula óssea abastada de inúmeros tipos celulares progenitores, incluindo células-tronco hematopoiéticas, células progenitoras endoteliais e células-tronco mesenquimais, é possível que o transplante das células medulares possa aumentar a perfusão tecidual pela diferenciação em células endoteliais no sítio de neovascularização, bem como pelo aporte das citocinas angiogênicas e arteriogênicas para o miocárdio (KOCHER et al., 2001; KINNAIRD et al., 2004).

De fato, ISHIDA et al. (2004) identificaram um maior número de vasos sanguíneos miocárdicos em ratos com cardiomiopatia induzida pela doxorubicina quatro semanas após receberem células-tronco autólogas comparativamente ao grupo controle. Estudo realizado por LU et al. (2006) em coelhos com cardiomiopatia induzida pela doxorubicina corrobora essa teoria, uma vez que demonstra superexpressão do fator transformador do crescimento- β 1 e subregulação da metaloproteinase-1 e fator de

necrose tumoral após o transplante celular. Adicionalmente, tal estudo não evidencia regeneração dos cardiomiócitos, fato este que sugere melhora da função ventricular baseada apenas na alteração da expressão de diversas citocinas.

Como era esperado, contudo, outros pesquisadores já demonstraram a ocorrência de diferenciação celular. Ao transplantarem células-tronco humanas marcadas com bromodioxiidina em coelhos com infarto do miocárdio experimentalmente induzido, WANG et al. (2005) não somente constataram distribuição celular no sítio lesado, mas também verificaram que as células marcadas passaram a expressar a troponina I. Do mesmo modo, SAITO et al. (2003), valendo-se de ratos com infarto do miocárdio experimentalmente induzido, constataram que a maioria das células-tronco marcadas geneticamente e infundidas por via trans-coronariana alojaram-se na região lesada e, inclusive, expressavam as cadeias pesadas da miosina e troponina I-C específica dos cardiomiócitos.

5. CONCLUSÕES

Baseando-se nos resultados obtidos após o desenvolvimento da metodologia proposta, foi possível concluir que:

- 1) A terapia prolongada com doxorubicina desencadeia, ademais dos prejuízos à função sistólica, disfunção miocárdica diastólica;
- 2) O transplante intracoronariano de células-tronco autólogas é exeqüível em cães com cardiomiopatia induzida pela doxorubicina;
- 3) A cateterização coronariana esquerda é satisfatória para aplicação das células-tronco e, valendo-se dos resultados obtidos, parece possibilitar o adequado alojamento celular no tecido miocárdico. Ademais, é bem tolerada em pacientes caninos com cardiomiopatia induzida pela doxorubicina;
- 4) As variações observadas nos parâmetros sistólicos demonstram melhora da capacidade contrátil do miocárdio após terapia celular autóloga;
- 5) As variações observadas nos parâmetros diastólicos do ventrículo esquerdo demonstram recuperação da complacência ventricular após terapia celular autóloga, com minimização da disfunção diastólica desenvolvida ao longo da fase de indução da cardiomiopatia;
- 6) No modelo experimental empregado, o transplante intracoronariano de células-tronco autólogas não desencadeia alterações clinicamente importantes nos parâmetros eletrocardiográficos e na pressão arterial no período de seis meses pós-transplante;
- 7) O transplante de células-tronco hematopoiéticas autólogas traz benefícios à função cardíaca de cães com cardiomiopatia induzida pela doxorubicina.

6. REFERÊNCIAS¹

ANDO, M.; YOKOZAWA, T.; SAWADA, J. et al. Cardiac conduction abnormalities in patients with breast cancer undergoing high-dose chemotherapy and stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation*. v.25, n.2, p.185-189, 2000.

ARNOLDA, L.; MCGRATH, B.; COCKS, M. et al. Adriamycin cardiomyopathy in the rabbit: an animal model of low output cardiac failure with activation of vasoconstrictor mechanisms. *Cardiovascular Research*. v.19, n.6, p.378-382, 1985.

BOON, J.A. *Manual of veterinary echocardiography*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1998. 487p.

BOYUN, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood: isolation of mononuclear cells by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1g. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* v.21, supl.97, p.77-89, 1968.

CHEN, M.; FAN, Z.C.; ZHANG, L. et al. Feasibility of stem cells transplantation through aorta in adriamycin-induced heart failure. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*. v.22, n.2, p.280-282, 2005.

CHEN, M.; FAN, Z.C.; LIU, X.J. et al. Effects of autologous stem cell transplantation on ventricular electrophysiology in doxorubicin-induced heart failure. *Cell Biol Int*. v.30, n.7, p.576-582, 2006a.

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. List of journals indexed in Index Medicus. Washington, 1997. 240p.

CHEN, M.; FAN, Z.C.; LIU, X.J. et al. Cell transplantation with a catheter-based approach: an efficient method for the treatment of heart failure with multiple lesions. *Cell Prolif.* v.39, n.6, p.471-477, 2006b.

DAL FARRA.; M.C.T.; CAMACHO, A.A.; SANTANA, A.E. Study of cardiac toxicity in dogs treated with doxorubicin. *Ars Veterinaria*, v.11, n.1, p.6-16, 1995.

DE-ANDRADE, J.N.B.; CAMACHO, A.A.; SANTOS, P.S.P. et al. Plication of the free wall of left ventricle in dogs with doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Am. J. Vet. Res.*, v. 66, n. 2, p. 238-243, 2005.

DIAS, M.A.; SANTANA, A.E.; SOBREIRA, M.R.F. et al. Study of na animal model of blood hypoplasia induced by the antineoplastic agent doxorubicin (Adriblastina). *Ars Veterinaria, Jaboticabal*, v.19, n.3, p.246-253, 2003.

DOHMANN, H.F.R.; PERIN, E.C.; BOROJEVIC, R. et al. Sustained improvement in symptoms and exercise capacity up to six months after autologous transendocardial transplantation of bone marrow mononuclear cells in patients with severe ischemic heart disease. *Arq. Brasil. Cardiol.*, v.84, n.5, p.360-366, 2005.

FERRARIS, S.R. Ecocardiografia. In: BELERENIAN, G.; MUCHA, C.J.; CAMACHO, A.A. et al. *Afecciones cardiovasculares en pequeños animales*. 2.ed. Buenos Aires: Inter-médica, 2007. p.129-177.

FUCHS, S.; KORNOWSKI, R.; WEISZ, G. et al. Safety and feasibility of transendocardial autologous bone marrow transplantation in patients with advanced heart disease. *Am. J. Cardiol.*, v.97, p.823-829, 2006.

GOODWIN, J.K. Eletrocardiografia. In: TILLEY, L.P.; GOODWIN, J.K. *Manual de cardiologia para cães e gatos*. 3.ed., São Paulo: São Paulo, 2002. p.39-65.

GRAPHPAD. InStat guide to choosing and interpreting statistical tests. San Diego: GraphPad Software, 1998. Disponível em <<http://www.graphpad.com>>. Acesso em: 28/set./2003.

GRAUER, G.F.; LANE, I.F. Acute renal failure: ischemic and chemical nephrosis. In: OSBORNE, C.A.; FINCO, D.R. Canine and feline nephrology and urology. Baltimore: Williams & Wilkins, 1995. p.441-459.

HENIK, R.A. Ecocardiografia e ultra-som Doppler. In: TILLEY, L.P.; GOODWIN, J.K. Manual de cardiologia para cães e gatos. 3.ed., São Paulo: São Paulo, 2002. p.67-94.

ISHIDA, M.; TOMITA, S.; NAKATANI, T. et al. Bone marrow mononuclear cell transplantation had beneficial effects on doxorubicin-induced cardiomyopathy. J. Heart Lung Transplant., v.23, n.4, p.436-445, 2004.

KINNAIRD, T.; STABILE, E.; BURNETT, M.S. et al. Marrow-derived stromal cells genes encoding a broad spectrum of arteriogenesis through paracrine mechanism. Circulation Research. v.94, p.678-685. 2004.

KOCHER, A.A.; SCHUSTER, M.D.; SZABOLES, M.J. et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblast prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. Nature Medicine. v.7, p.430-436. 2001.

KORNOWSKI, R. et al. Delivery strategies to achieve therapeutic myocardial angiogenesis. Circulation, v.101, p.454-458, 2000.

LU, C.; ARAI, M.; MISAO, Y. et al. Autologous bone marrow cell transplantation improves left ventricular function in rabbit hearts with cardiomyopathy via myocardial regeneration-unrelated mechanisms. *Heart Vessels*. v.21, n.3, p.180-187, 2006.

LUSHNIKOVA, E.L.; KLINNIKOVA, M.G.; MOLODYKH, O.P. et al. Ultrastructural criteria of cardiomyocyte regeneratory and plastic insufficiency in anthracycline cardiomyopathy. *Bull Exp Biol Med*. v.139, n.4, p.472-476, 2005.

MARCHANDISE, B.; SCHROEDER, E.; BOSLY, A. et al. Early detection of doxorubicin cardiotoxicity: interest of Doppler echocardiographic analysis of left ventricular filling dynamics. *American Heart Journal*. v.118, p.92-98, 1989.

MAUDLIN, G.; FOX, P.; PATNAIK, A. et al. Doxorubicin-induced cardiotoxicosis: clinical features in 32 dogs. *J. Vet. Intern. Med.*, v.6, n.2, p.82-88, 1992.

MUCHA, C.J. Electrocardiografía ambulatoria y de contacto. In: BELERENIAN, G.; MUCHA, C.J.; CAMACHO, A.A. et al. *Afecciones cardiovasculares en pequeños animales*. 2.ed. Buenos Aires: Inter-médica, 2007. p.121-128.

MUCHA, C.J.; CAMACHO, A.A. Determinación de la presión arterial. In: BELERENIAN, G.C.; MUCHA, C.J.; CAMACHO, A.A. *Afecciones cardiovasculares en pequeños animales*, Buenos Aires: Inter-Médica, 2001. p.59-64.

MUCHA, C.J.; CAMACHO, A.A. Determinación de la presión arterial. In: BELERENIAN, G.; MUCHA, C.J.; CAMACHO, A.A. et al. *Afecciones cardiovasculares en pequeños animales*. 2.ed. Buenos Aires: Inter-médica, 2007. p.179-183.

PELLETT A.; TOLAR W.G.; MERWIN, B.S. et al. The Tei index: methodology and disease state values. *Echocardiography*, v.21, n.7, p.669-672, 2004.

PERIN, E.C.; DOHMANN, H.F.R.; BOROJEVIC, R. et al. Improved exercise capacity and ischemia 6 and 12 months after transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic cardiomyopathy. *Circulation*, v.110, suplement. 2, p.213-218, 2004.

SAITO, T.; KUANG, J.Q.; LIN, C.C.H. et al. Transcoronary implantation of bone marrow stromal cells ameliorates cardiac function after myocardial infarction. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, v.126, n.1, p.114-122, 2003.

SELDINGER, S.I. Catheter replacement of the needle in percutaneous arteriography: a new technique. *Acta Radiologica*. v.39, n.5, p.369-376, 1953.

SCHUSTER, M.D.; KOCHER, A.A.; MARTENS, T.P. et al. Myocardial neovascularization by bone marrow angioblasts results in cardiomyocyte regeneration. *American Journal of Physiology Heart Circulation Physiology*. v.287, n.2, p.525-532, 2004.

SILVA, C.E.V.; CAMACHO, A.A. Alterações ecocardiográficas em cães sob tratamento prolongado com doxorubicina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, n.3, p.300-306, 2005.

SILVA, G.V.; LITOVSKY, S.; ASSAD, J.A. et al. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation*. v.111, n.2, p.150-156, 2005.

SIMONS, M.; BONOW, R.O.; CHRONOS, N.A. et al. Clinical trials in coronary angiogenesis issues, problems, consensus: an expert panel summary. *Circulation*. v.102, p.73-86. 2000.

SISSON, D.; O'GRADY, M.R.; CALVERT, C.A. Myocardial diseases in dogs. In: FOX, P.R.; SISSON, D.; MOÏSE, N.S. Textbook of canine and feline cardiology. 2.ed. Philadelphia: Saunders, 1999. p.581-619.

SOUSA, M.G. Ecodopplercardiografia de cães submetidos ao teste de estresse com dobutamina, em diferentes modelos experimentais de cardiomiopatia. 2004, 134f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, Jaboticabal, São Paulo, Brasil, 2004.

SOUSA, M.G.; CAMACHO, A.A. Cardiotoxicidad por doxorubicina en perros. In: BELERENIAN, G.; MUCHA, C.J.; CAMACHO, A.A. et al. Afecciones cardiovasculares en pequeños animales. 2.ed. Buenos Aires: Inter-médica, 2007. p.297-301.

SOUSA, M.G.; CARARETO, R.; DE-NARDI, A.B. et al. Effects of isoflurane on Tei-index of myocardial performance in healthy dogs. Canadian Veterinary Journal. v.48, p.277-283, 2007.

SOUZA, R.C.A. Avaliação neurohumoral e hemodinâmica de cães clinicamente normais submetidos ao tratamento com doxorubicina. 2004, 73f. Tese (Doutorado em Clínica Médica Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, Jaboticabal, São Paulo, 2004.

SOUZA, R.C.A.; CAMACHO, A.A. Neurohormonal, hemodynamic, and electrocardiographic evaluations of healthy dogs receiving long-term administration of doxorubicin. Am. J. Vet. Res., v. 67, n. 8, p.1319-1325, 2006.

STODDARD, M.F.; SEEGER, J.; LIDDELL, N.E. et al. Prolongation of isovolumic relaxation time as assessed by Doppler echocardiography predicts doxorubicin-induced systolic dysfunction in humans. Journal of the American College of Cardiology. v.20, p.62-69, 1992.

SUSANECK, S.J. Doxorubicin therapy in the dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, Schaumburg, v. 182, n. 1, p. 70-72, 1983.

TEI, C. New non-invasive index for combined systolic and diastolic ventricular function. *J. Cardiol.*, v.26, n.2, p.135-136, 1995.

TEI, C.; LING, L.H.; HODGE, D.O. et al. New index of combined systolic and diastolic myocardial performance: a simple and reproducible measure of cardiac function – a study in normals and dilated cardiomyopathy. *J. Cardiol.*, v.26, n.6, p.357-366, 1995.

TILLEY, L.P. *Essentials of canine and feline electrocardiography*. 3. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992. 470p.

TJEERDSMA, G.; MEINARDI, M.T.; VAN DER GRAAF, W.T.A. et al. Early detection of anthracycline induced cardiotoxicity in asymptomatic patients with normal left ventricular systolic function: autonomic versus echocardiographic variables. *Heart*. v.81, n.4, p.419-423, 1999.

TOYODA, Y.; OKADA, M.; KASHEM, M.A. A canine model of dilated cardiomyopathy induced by repetitive intracoronary doxorubicin administration. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. v.115, n.6, p.1367-1373, 1998.

VICARIO, J.; CAMPO, C.; PIVA, J. et al. One-year follow-up of transcatheter administration of autologous bone marrow in patients with chronic refractory angina. *Cardiovascular Revascularization Medicine*. v.6, p.99-107, 2005.

VILAS-BOAS, F.; FEITOSA, G.S.; SOARES, M.B.P. et al. Bone marrow transplantation to the myocardium of a patient with heart failure due to Chagas' disease. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. v.82, n.2, p.185-187, 2004.

VILAS-BOAS, F.; FEITOSA, G.S.; SOARES, M.B.P. et al. Early results of bone marrow cell transplantation to the myocardium of patients with heart failure due to Chagas disease. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. v.87, n.2, p.159-166, 2006.

WANG, J.A.; FAN, Y.Q.; LI, C.L. et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells transplanted into damaged rabbit heart to improve heart function. *J Zhejiang Univ Sci B*. v.6, n.4, p.242-248, 2005.

WOLF, R.; CAMACHO, A.A.; SOUZA, R.C.A. Eletrocardiografia computadorizada em cães. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, Belo Horizonte, v. 52, n. 6, p. 610-615, 2000.

YANCOPOULOS, G.D.; DAVIS, S.; GALE, N.W. et al. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*. v.407, p.242-248. 2000.

YOKOYAMA, S.I.; NOBORU, F.; LI, Y. et al A strategy of retrograde injection of bone marrow mononuclear cells into the myocardium for the treatment of ischemic heart disease. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. v.40, p.24-34. 2006.