

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E PLASMA RICO EM PLAQUETAS EM
CARDIOMIOPATIA DILATADA NÃO ISQUÊMICA INDUZIDA COM
DOXORRUBICINA EM COELHOS NOVA ZELÂNDIA

Priscilla Domingues Mörschbacher

Porto Alegre

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E PLASMA RICO EM PLAQUETAS EM
CARDIOMIOPATIA DILATADA NÃO ISQUÊMICA INDUZIDA COM
DOXORRUBICINA EM COELHOS NOVA ZELÂNDIA

Autora: Priscilla Domingues
Mörschbacher

Dissertação apresentada como requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre
em Ciências Veterinárias na área de
Morfologia, Cirurgia e Patologia Animal

Orientador: Prof. Dr. Emerson Antonio
Contesini

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Elizabeth
Obino Cirne-Lima

Porto Alegre

2012

CIP - Catalogação na Publicação

Mörschbacher, Priscilla Domingues

Células-tronco mesenquimais e plasma rico em plaquetas em cardiomiopatia dilatada não isquêmica induzida com doxorubicina em coelhos Nova Zelândia / Priscilla Domingues Mörschbacher. -- 2012.
114 f.

Orientador: Emerson Antonio Contesini.
Coorientadora: Elizabeth Obino Cirne-Lima.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. cardiologia. 2. terapia celular. 3. troponina I. 4. ecocardiograma. 5. scaffold. I. Contesini, Emerson Antonio, orient. II. Cirne-Lima, Elizabeth Obino, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Priscilla Domingues Mörschbacher

CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E PLASMA RICO EM PLAQUETAS EM
CARDIOMIOPATIA DILATADA NÃO ISQUÊMICA INDUZIDA COM
DOXORRUBICINA EM COELHOS NOVA ZELÂNDIA

APROVADO POR

Prof. Dr. EMERSON ANTONIO CONTESINI

Orientador e Presidente da Banca

Prof. Dr. ALCEU GASPAR RAISER

Membro da Banca (UFSM)

Profa. Dra. CLÁUDIA CILENE FERNANDES CORREIA LAURINO

Membro da Banca (UFRGS)

Prof. Dr. MARCELO MELLER ALIEVI

Membro da Banca (UFRGS)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente aos meus pais, que sempre fizeram tudo por mim, me incentivando, orientando e apoiando minhas decisões.

Ao meu noivo Thiago por estar comigo em toda a trajetória do meu experimento, sempre me escutando e acalmando minhas angustias. E por em nenhum momento perder a paciência e por sempre me apoiar.

E dedico especialmente aos coelhos, e a todos os animais de laboratório, que doam suas vidas involuntariamente para o avanço da medicina.

AGRADECIMENTOS

À Deus, em primeiro lugar, por ter me dado forças e ter mostrado que o melhor caminho nem sempre é o mais fácil ou o mais bonito, mas é o que vai me levar à felicidade.

Aos meus amados pais, que me fornecem um amor incondicional, que estão sempre ao meu lado, me apoiando e compreendendo meus dias de estresse. Obrigada por se preocuparem com os meus estudos e por me ensinarem as lições mais importantes da vida que carrego.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Emerson Antonio Contesini e Profa. Dra. Elizabeth Obino Cirne-Lima, que me deram a oportunidade de entrar no programa de pós-graduação e me auxiliaram nessa trajetória. Sem vocês eu não estaria realizando mais essa etapa.

Aos meus colegas de pós-graduação, Tuane Garcez, Anelise Bonilla Trindade, Viviam Pignone, Paulo Bertram, Fernanda Loss, Wanessa Beheregaray e Elisa Neuwald, que me auxiliaram durante o experimento, nos procedimentos cirúrgicos e nas realizações do ecocardio e eletrocardiograma, não importando os horários. Sem a ajuda dos amigos eu não conseguiria concluir o mestrado. E à minha colega Lanucha Fidelis da Luz Moura, que apesar de não ter continuado na pós-graduação, colocou-se a disposição para anestésiar os animais.

Ao apoio do Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular, em especial à Ana Helena Paz, Alessandra Magrisso, Paula Terraciano e Helena Flores, que colaboraram no cultivo celular e tiveram a paciência para a preparação de muitos PRPs. Agradeço o companheirismo e amizade fornecidos por vocês.

Aos estagiários Eduardo Santos, Silvana Bellini Vidor, Pâmela Garcia, Brunna Barni e Nicole Louise, agradeço por toda ajuda durante a parte prática do experimento e pelos cuidados com os coelhos, levando cenouras e aliviando o estresse deles.

À equipe da Unidade de Experimentação Animal (UEA) por toda ajuda e apoio durante a fase experimental, em especial à enfermeira Marta e à médica veterinária

Fabíola Schons Meyer, que não pouparam esforços para conseguir os coelhos e por todo carinho e cuidado com os animais.

Agradeço ao Prof. Dr. Carlos Afonso Beck, por se dispor a participar do projeto piloto e por me orientar na etapa da videocirurgia, deixando os materiais do Hospital de Clínicas Veterinária (HCV), necessários nesta fase, a disposição. Agradeço também ao Prof. Dr. Marcelo Meller Alievi, por ceder as gaiolas e espaço do HCV para que eu pudesse fazer a indução da cardiomiopatia nos animais do experimento.

À colega Veronica Rolim, ao Prof. Dr. David Driemeier e demais colegas do Setor da Patologia Animal, pela realização das necropsias e confecções e leitura das lâminas de histopatologia. Sem vocês não conseguiria concluir meu projeto.

Não poderia deixar de mencionar o agradecimento aos meus gatos, Léo e Bebel, que são minhas companhias desde minha vinda a Porto Alegre. Sempre me deram muito amor e me distraíram com suas sapequices. E, finalmente, ao meu noivo Thiago, que mesmo distante está sempre presente em minha vida, participando de tudo e me ouvindo diariamente.

RESUMO

A insuficiência cardíaca é a doença crônica com maior impacto na sobrevida e qualidade de vida dos pacientes. Apesar do constante desenvolvimento de novas estratégias de tratamento, esta doença continua atingindo altos índices de mortalidade. O coração adulto tem capacidade de regeneração limitada e há grande evidência experimental de que os transplantes de células-tronco poderiam ser uma abordagem eficiente na recuperação do miocárdio lesado. Contudo, a maioria dos estudos são realizados em cardiomiopatias isquêmicas, existindo poucos estudos na cardiomiopatia dilatada (CMD). Em função disto, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a regeneração do miocárdio em coelhos com CMD induzida pela doxorrubicina, por meio do uso de células-tronco mesenquimais (MSC) obtidas de tecido adiposo, associadas ou não com plasma rico em plaquetas (PRP). Foram utilizadas 40 coelhas, Nova Zelândia, e um coelho macho doador das MSCs derivadas do tecido adiposo. As coelhas foram divididas em dois grupos: CMD induzida pela doxorrubicina e o grupo saudável. Cada grupo foi subdividido conforme o tratamento recebido: solução fisiológica, MSCs, PRP e MSCs associadas ao PRP. Os subgrupos receberam o tratamento por injeção diretamente no miocárdio no ventrículo esquerdo mediante toracoscopia vídeo assistida. Os coelhos foram avaliados por exames de ecocardiograma, eletrocardiograma, troponina I, no dia da chegada, após a indução da CMD e 15 dias após o recebimento das terapias. Nesta última avaliação, foi realizada a eutanásia e coletado o coração para análise histológica. Foi observado que após a indução, a troponina I se elevou, o segmento QRS visto no eletrocardiograma, aumentou e, no ecocardiograma, as frações de ejeção (FE) e encurtamento (FS) diminuíram e o diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo (VEs) aumentou, em todos os animais avaliados. Após os tratamentos, o subgrupo MSCs obtiveram os melhores resultados em todas as análises citadas. Houve menor elevação da troponina I, o segmento QRS diminuiu, as FS e FE aumentaram e o VEs diminuiu. No exame histopatológico, analisado pela coloração de hematoxilina-eosina, constatou-se que o subgrupo MSCs apresentou menos lesões, e nos subgrupos MSCs associadas com PRP, solução fisiológica e PRP as lesões aumentaram gradualmente, respectivamente. Os resultados sugerem que o uso das MSCs melhoraram a função cardíaca em coelhos com cardiomiopatia dilatada e que há necessidade de mais estudos no uso de PRP no miocárdio.

Palavras-chave: cardiologia, terapia celular, troponina I, ecocardiograma, eletrocardiograma, *scaffold*

ABSTRACT

Heart failure is a chronic disease with major impact on survival and quality of patient's life. Despite the constant development of new treatment strategies, this disease still affects high mortality rates. The adult heart has limited ability to regenerate and there is experimental evidence that large transplants of stem cells could be an effective approach in the recovery of injured myocardium. However, most studies are performed in ischemic cardiomyopathy, there are few studies in dilated cardiomyopathy. Because of this, this study aimed at evaluating the regeneration of the myocardium in rabbits with dilated cardiomyopathy induced by doxorubicin through the use of mesenchymal stem cell (MSC) derived from adipose tissue, associated or not with platelet-rich plasma (PRP). 40 New Zealand rabbits were utilized and a male rabbit donor MSCs derived from adipose tissue. The rabbits were divided into two groups: dilated cardiomyopathy doxorubicin-induced and the healthy group. Each group was divided according to treatment received: saline, MSCs, PRP and MSCs associated with PRP. The subgroups receiving treatment through an injection directly into the myocardium of the left ventricle through video-assisted thoracoscopy. The rabbits were evaluated by echocardiogram, electrocardiogram, troponin I, on the day of arrival, after induction of dilated cardiomyopathy and 15 days after receipt of therapies. This last evaluation, euthanasia was performed and the hearts collected for histological analysis. It was observed that after induction the troponin I increased, the QRS segment, seen on the electrocardiogram, increased, and, in echocardiography, the ejection and shortening fractions decreased, and left ventricular systolic diameter increased in all animals evaluated. After treatments, the subgroup MSCs have the best results in all tests cited. There was a lower elevation of troponin I, decreased QRS segment, the ejection and shortening fractions increased and left ventricular systolic diameter decreased. On examination histologic, analyzed by hematoxylin-eosin staining, the subgroup found that MSCs had fewer injuries, and in the subgroups MSCs associated with PRP, PRP and saline lesions gradually increased, respectively. The results suggest that the use of MSCs improved cardiac function in rabbits with dilated cardiomyopathy and that there is need for more studies on the use of PRP in the myocardium.

Keywords: *cardiology, cell therapy, troponin I, echocardiography, electrocardiogram, scaffold*

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Desenho ilustrativo dos diferentes sítios para obtenção de células-tronco (Fonte: SEONG et al., 2010).....	29
FIGURA 2	Representação esquemática de protocolo de dupla centrifugação (Fonte: MESSORA et al., 2009)	35
FIGURA 3	Biotérios onde ficaram alojados os coelhos do experimento. (A) Biotério da Faculdade de Medicina Veterinária da UFRGS; (B) Biotério da UEA-HCPA.....	45
FIGURA 4	Coleta do tecido adiposo em coelho Nova Zelândia para obtenção das MSCs. (A) Incisão de pele até exposição do tecido subcutâneo na região cervical; (B) coleta do tecido adiposo.....	46
FIGURA 5	MSCs derivadas do tecido adiposo de coelho Nova Zelândia coradas com Hematoxilina-Eosina e em aumento de 20X.....	48
FIGURA 6	Caracterização das MSCs isoladas do tecido adiposo. (A) Diferenciação condrogênica detectada pela coloração Alcian Blue em aumento de 10X; (B) diferenciação adipogênica detectada pela coloração Oil Red em aumento de 20X.	49
FIGURA 7	Realização dos exames de eletrocardiograma e ecocardiograma nos coelhos Nova Zelândia. (A) Traçado do eletrocardiograma; (B) coelho em decúbito lateral esquerdo com eletrodos do eletrocardiograma; (C) realização do ecocardiograma com equipamento bi-dimensional modelo Mylab 30; (C) posicionamento do transdutor durante exame de ecocardiograma.	50
FIGURA 8	Coelho Nova Zelândia acondicionado em caixa de polipropileno durante aplicação de doxorrubicina pela via intravenosa para indução de cardiomiopatia dilatada.	52
FIGURA 9	Sequência da preparação do PRP. (A) Transferência do sangue do tubo com citrato para um tubo Falcon de 15; (B) primeira centrifugação; (C) tubo Falcon após a primeira centrifugação; (D) separação do plasma em dois	

	tubos; (E) tubos A e B após a segunda centrifugação; (F) transferência das alíquotas do tubo A e B para formação do tubo C.....	54
FIGURA 10	Posicionamento dos equipamentos na sala cirúrgica.	55
FIGURA 11	Sequência do procedimento cirúrgico. (A) Posicionamento do coelho na mesa; (B) divulsão da musculatura no sexto espaço intercostal; (C) perfuração da pleura com um trocar de 5mm; (D) introdução do endoscópio rígido na cavidade torácica; (E) introdução da agulha hipodérmica 13x4mm no quarto espaço intercostal; (F) visualização endoscópica da introdução da agulha no miocárdio do ventrículo esquerdo; (G) aspecto final da sutura de pele; (H) aspecto final do tamanho da ferida cirúrgica.....	57
FIGURA 12	Coelhos em incubadoras durante a recuperação anestésica do pós-operatório imediato.	59
FIGURA 13	Perfis médios dos pesos e respectivos erros padrões segundo grupos e tratamentos.	63
FIGURA 14	Perfis médios do VEs e respectivos erros padrões segundo grupos e tratamentos	66
FIGURA 15	Perfis médios da FE e respectivos erros padrões segundo grupos e tratamentos.	67
FIGURA 16	Perfis médios da FS e respectivos erros padrões segundo grupos e tratamentos.	68
FIGURA 17	Perfis médios do QRS e respectivos erros padrões segundo grupos e tratamentos	70
FIGURA 18	Perfis médios da troponina I e respectivos erros padrões segundo tratamentos.	71

FIGURA 19 Análise histológica dos corações dos coelhos Nova Zelândia coradas com Hematoxilina-Eosina e em aumento de 40X. (A) Lesão miocárdica leve; (B) lesão miocárdica moderada; (C) lesão miocárdica grave. A seta mostra vacuolização do sarcoplasma em cardiomiócito..
..... 72

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Representação dos grupos de acordo com cada implante recebido. ...	58
TABELA 2	Resultado das comparações dos pesos entre os grupos e momentos. .	64
TABELA 3	Resultado das comparações do VEs entre os fatores que apresentaram diferenças estatisticamente significativas.	67
TABELA 4	Resultado das comparações da FE entre os fatores que apresentaram diferenças estatisticamente significativas.	68
TABELA 5	Resultado das comparações da FS entre os fatores que apresentaram diferenças estatisticamente significativas..	69
TABELA 6	Resultado das comparações do QRS entre os momentos.....	70
TABELA 7	Resultado das comparações da troponina I entre os momentos nos coelhos com cardiomiopatia dilatada induzida.....	71
TABELA 8	Descrição da histologia segundo os tratamentos no grupo doente e resultado do teste comparativo.....	73
TABELA 9	Resultado da comparação dos graus histológicos entre os grupos dois a dois.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina difosfato
AE	Diâmetro do átrio esquerdo
AO	Diâmetro da aorta
ATP	Adenosina trifosfato
BID	Duas vezes ao dia
CFU-F	Unidades formadoras de colônias de fibroblastos
CM	Cardiomiopatia
cm	Centímetro
CMD	Cardiomiopatia dilatada
CPE	Centro de Pesquisa Experimental
CTGF	Fator de crescimento de tecido conjuntivo
CTVA	Cirurgia toracoscópica vídeo-assistida
DAVE	Assistência ao ventrículo esquerdo
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
ECG	Eletrocardiograma
EGF	Fator de crescimento epidermal
ES	Células-tronco embrionárias
FAVET	Faculdade de Veterinária
FE	Fração de ejeção
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
FS	Fração de encurtamento

°C	Graus Celsius
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HCV	Hospital de Clínicas Veterinárias
HE	Hematoxilina-Eosina
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
IC	Insuficiência cardíaca
ICC	Insuficiência cardíaca congestiva
CFU-F	Unidades formadoras de colônias de fibroblastos
IGF-I	Fator semelhante à insulina I
IM	Intramuscular
IV	Intravenoso
kg	Quilograma
MSCs	<i>Mesenchymal stem cells</i>
µg	Micrograma
µL	Microlitros
mL	Mililitros
ng	Nanograma
PBS	Solução salina tamponada
PDGF	Fator de crescimento derivado da plaqueta
PL	Diâmetro da parede livre do ventrículo esquerdo em diástole
PRP	Plasma rico em plaquetas
PS	Penicilina-Streptomina
SC	Subcutâneo

SFB	Soro fetal bovino
SID	Uma vez ao dia
SIV	Diâmetro do septo interventricular em diástole
SUS	Sistema Único de Saúde
TGF- β	Fator de crescimento de transformação beta
TGF- α	Fator de crescimento de transformação alfa
UEA	Unidade de experimentação animal
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
VD	Diâmetro do ventrículo direito
VE _d	Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VE _s	Diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	OBJETIVOS	22
2.1	Geral	22
2.2	Específicos	22
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
3.1	Cardiomiopatia Dilatada	23
3.2	Doxorrubicina	24
3.2.1	Descrição	24
3.2.2	Mecanismo de Ação	25
3.2.3	Cardiotoxicidade	26
3.3	Modelo Experimental	27
3.3.1	Indução da Cardiomiopatia	27
3.4	Células-tronco	28
3.5	Scaffolds	31
3.5.1	Plasma Rico em Plaquetas	32
3.6	Terapia Celular nas Cardiomiopatias	36
3.6.1	Rotas de Aplicação	38
3.6.1.1	Infusão Arterial Intracoronária	39
3.6.1.2	Injeção Direta na Parede Ventricular	40
3.7	Cirurgia Toracoscópica Video-Assistida	40
3.8	Troponina	41
4	MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1	Animais Experimentais	44
4.1.1	Biotério	44
4.1.2	Pesagem	45
4.2	Obtenção das Células-Tronco de Tecido Adiposo	45
4.2.1	Coleta do Tecido Adiposo	45
4.2.2	Isolamento das MSCs de Tecido Adiposo	47
4.2.3	Congelamento/Descongelamento das MSCs	47
4.2.4	Caracterização das MSCs Isoladas de Tecido Adiposo	48

4.3	Indução da Cardiomiopatia Dilatada pela Doxorrubicina	49
4.3.1	Avaliações Ecocardiográficas e Eletrocardiográficas	49
4.3.2	Avaliação Troponina I.....	51
4.3.3	Aplicação de Doxorrubicina	51
4.4	Procedimento Anestésico	52
4.5	Preparação do PRP	53
4.6	Procedimento Cirúrgico	55
4.6.1	Procedimentos Pré-Operatórios	55
4.6.2	Toracoscopia Video-Assistida	56
4.7	Procedimentos Terapêuticos	57
4.7.1	Grupos	57
4.8	Procedimentos Pós-Operatórios	58
4.9	Avaliação Cardiológica Pós-Transplante	59
4.9.1	Avaliações Ecocardiográficas e Eletrocardiográficas	59
4.9.2	Avaliação Troponina I.....	60
4.10	Eutanásia	60
4.11	Avaliação Macroscópica	60
4.12	Avaliação Microscópica	60
4.13	Análise Estatística	61
5	RESULTADOS	62
5.1	Mortalidade	62
5.2	Coleta de Tecido Adiposo para Obtenção das MSCs	62
5.3	Indução da Cardiomiopatia Dilatada pela Doxorrubicina	62
5.4	Peso dos Animais	62
5.5	Procedimento Anestésico	64
5.6	Plasma Rico em Plaquetas	64
5.7	Procedimento Cirúrgico	65

5.8	Procedimentos Terapêuticos	65
5.9	Resultados Estatísticos Ecocardiográficos.....	66
5.10	Resultados Estatísticos Eletrocardiográficos.....	69
5.11	Resultados Estatísticos Troponina I.....	70
5.12	Avaliação Macroscópica	72
5.13	Avaliação Microscópica	72
6	DISCUSSÃO	74
7	CONCLUSÕES	85
8	REFERÊNCIAS	86
	ANEXO 1 – Carta de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais	101
	APÊNDICE A – Resultados da troponina I nos diferentes grupos.....	102
	APÊNDICE B – Resultados dos pesos nos diferentes grupos	104
	APÊNDICE C – Resultados do eletrocardiograma nos diferentes grupos	106
	APÊNDICE D – Resultados do ecocardiograma nos diferentes grupos.....	109
	APÊNDICE E – Resultados da análise histopatológica nos diferentes grupos	112

1 INTRODUÇÃO

A insuficiência cardíaca é a doença crônica com maior impacto na sobrevida e qualidade de vida dos pacientes. Apesar do constante desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas, condutas eletrofisiológicas com modernos equipamentos e alternativas cirúrgicas cada vez mais sofisticadas, a insuficiência cardíaca continua atingindo altos índices de mortalidade.

O coração adulto tem capacidade de regeneração limitada e, portanto, qualquer perda significativa de células não possui auto-reparação de forma eficiente, podendo levar ao desenvolvimento de insuficiência cardíaca.

As células-tronco representam uma das grandes promessas de tratamento de diferentes doenças consideradas sem opção terapêutica. Seu principal papel seria a regeneração de órgãos incapacitados funcionalmente, por processos de diferentes etiologias: inflamatórios, traumáticos e degenerativos. Na reparação das células do músculo cardíaco, a terapia celular tem demonstrado que variados tipos de células-tronco podem se diferenciar em células miocárdicas e outros tecidos necessários para a regeneração do coração lesado.

Há grande evidência experimental de que os transplantes de células-tronco poderiam ser uma abordagem nova e eficiente na recuperação de miocárdio lesado. Contudo, a maioria dos estudos sobre terapia celular foi feito em cardiomiopatias isquêmicas. Conseqüentemente, existem poucos dados pré-clínicos sobre os efeitos do transplante de células no quadro de cardiomiopatia dilatada não isquêmica.

Geralmente as células-tronco são aplicadas em solução aquosa de meio de cultura, podendo ser facilmente lavadas, especialmente nos casos onde atingem diretamente o sistema circulatório. Assim, células-tronco têm sido aplicadas no local da lesão associadas à *scaffolds* e têm demonstrado interatividade com biomateriais, tornando-as ideal para reconstrução tecidual, pois há otimização da patência das células enxertadas. O plasma rico em plaquetas serve como biomaterial para infusão das células-tronco, favorecendo a sobrevida dessas células e a angiogênese, além de liberar fatores de crescimento em uma tentativa de realizar o início da cura em lesões crônicas.

O objetivo desse trabalho é avaliar a regeneração do miocárdio em coelhos com cardiomiopatia dilatada induzida com doxorrubicina, com o uso de células-tronco mesenquimais obtidas de tecido adiposo, associadas ou não com plasma rico em plaquetas como *scaffold*, sendo implantadas diretamente no miocárdio do ventrículo esquerdo.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a regeneração do miocárdio com cardiomiopatia dilatada induzida com doxorubicina em coelhos Nova Zelândia que receberam células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo, associadas ou não com plasma rico em plaquetas.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar a indução da cardiomiopatia dilatada pela doxorubicina por meio de ecocardiograma, eletrocardiograma, troponina I sérica e histopatológico.
- Avaliar a influência do plasma rico em plaquetas como *scaffold* das células-tronco mesenquimais sob a regeneração tecidual em cardiomiopatia dilatada induzida por doxorubicina.
- Comparar a regeneração do miocárdio na cardiomiopatia dilatada tratada com células-tronco mesenquimais, plasma rico em plaquetas ou ambos associados, através de ecocardiograma, eletrocardiograma, troponina I sérica e histopatológico.
- Verificar se a injeção celular diretamente no miocárdio é efetiva para manter as células-tronco mesenquimais.
- Verificar se a cirurgia toracoscópica vídeo-assistida fornece uma boa visibilização e acesso ao coração para infusão celular.
- Testar se a troponina I é um eficiente marcador de lesão miocárdica em coelhos Nova Zelândia com cardiomiopatia dilatada induzida com doxorubicina.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Cardiomiopatia Dilatada

Cardiomiopatia dilatada (CMD) descreve toda doença miocárdica primária que seja caracterizada por dilatação da câmara cardíaca (em geral as quatro câmaras em algum grau, mas, às vezes, predominantemente ventricular esquerda ou, em casos mais raros, predominantemente ventricular direita) e por disfunção ventricular sistólica causada pela contratilidade miocárdica prejudicada. São doenças nas quais as alterações patológicas no músculo cardíaco não podem ser explicadas pelos efeitos de doenças congênitas ou adquiridas das válvulas cardíacas, dos vasos coronários, do pericárdio ou de órgãos cuja função alterada acomete a saúde miocárdica (ETTINGER & FELDMAN, 2005). A CMD de natureza idiopática refere-se às doenças originadas no miocárdio, cuja etiologia ainda permanece desconhecida e com prognóstico variando de reservado a grave (ATKINS & SNYDER, 1991; KRAMER et al., 1995).

O coração adulto tem capacidade de regeneração limitada e, portanto, qualquer perda significativa de células, causada por doenças agudas ou crônicas, não tem auto-reparação de forma eficiente, podendo levar ao comprometimento progressivo da função ventricular e, por fim, ao desenvolvimento de insuficiência cardíaca (IC) (SANZ & JIMÉNEZ-QUEVEDO, 2007).

O processo miopático pode ser resultado final de muitos distúrbios que afetam a função miocárdica, incluindo a deficiência de substratos metabólicos, fatores essenciais (taurina em gatos, cães de raças pequenas e Cocker Spaniels, L-carnitina em alguns cães) ou lesão tóxica aos miócitos (administração de doxorubicina). A condição ocorre mais frequentemente em cães e é vista esporadicamente em gatos, cavalos, bovinos e ferrets. (DARKE et al., 2000).

Os sinais clínicos de CMD, independentemente da espécie afetada, são muito similares. Em contraste com as doenças valvulares crônicas, cães afetados pela cardiomiopatia dilatada são relativamente jovens, com muitos casos entre dois e cinco anos de idade, embora a variação seja muito grande. Cães machos são mais afetados que fêmeas (DARKE et al., 2000), principalmente de raças grandes e gigantes, particularmente o Doberman, Boxer, Dog Alemão, Irish Wolfhound e São Bernardo

(ATKINS & SNYDER,1991; BUCHANAN, 1992; LOBO & PEREIRA, 2002), apresentando como manifestações clínicas mais consistentes: astenia, anorexia, letargia, dispnéia, intolerância ao exercício, perda de peso, ascite e síncope (SISSON et al., 2004). A sua evolução, relativamente benigna, com um longo período assintomático é um dos pontos irrefutáveis que caracterizam a CM, em sua forma dilatada (KITTLESON, 1998, LOBO & PEREIRA, 2002).

Em humanos, a IC representa um grave problema de saúde pública, que atinge mais de cinco milhões de norte-americanos. Nos Estados Unidos, a insuficiência cardíaca terminal, com taxas de mortalidade em dois anos de 70% a 80%, atinge mais de 60 mil pacientes a cada ano. Apesar de a causa mais significativa de IC ser a cardiopatia isquêmica, na prática clínica a CMD é responsável por quase metade dos novos casos de IC. Aspectos histológicos comuns a todos os tipos de CMD são a perda de cardiomiócitos, hipertrofia das células do miocárdio e uma quantidade variável de fibrose intersticial (SANZ & JIMÉNEZ-QUEVEDO, 2007).

No Brasil, morrem em média 300 mil pessoas por ano devido às doenças cardíacas, segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia. Os números de transplantes realizados no ano de 2005 chegaram a 110. Especificamente para a IC, há 240 mil novos casos ao ano, sendo a terceira causa de internamento pelo SUS, e, para o grupo de pacientes mais graves, o tratamento disponível atualmente é apenas o transplante cardíaco (REGISTRO BRASILEIRO DE TRANSPLANTES, 2005).

3.2 Doxorrubicina

3.2.1 Descrição

A doxorrubicina (ou adriamicina) encontra-se entre os mais importantes agentes antitumorais, sendo utilizada desde a década de 60 na prática oncológica humana (NASCIMENTO & MARTINS, 2005). Este fármaco vem desempenhando importante papel no tratamento de neoplasias humanas e veterinárias (NASCIMENTO & MARTINS, 2005; SILVA & CAMACHO, 2005).

Clinicamente, a doxorrubicina tem atividade significativa contra considerável número de tumores. Em cães, há bons resultados em linfomas e osteossarcomas (SILVA

& CAMACHO, 2005) e, em humanos, é utilizada com êxito na regressão de carcinomas mamários, ovarianos, pulmonares e de bexiga, além de sarcomas, leucemia linfoblástica aguda, entre outros (SANTOS et al., 2009).

Esta substância é um antibiótico antracíclico isolado da cultura do fungo *Streptomyces peucetius var. caesius*, podendo ainda ser sintetizada quimicamente a partir da daunorrubicina. A molécula da doxorubicina contém um aminossacarídeo, a daunosamina, ligado por meio de uma ponte glicosídica ao núcleo da droga denominado adriamicinona. Todos os agentes citotóxicos da classe das antraciclinas possuem moléculas quinona e hidroquinona nos anéis adjacentes, que lhes permitem funcionar como doadores e receptores de elétrons (TALLARICO et al., 2003).

A farmacocinética da doxorubicina caracteriza-se por substancial ligação da droga a proteínas e aos tecidos, sendo as concentrações teciduais muito maiores que os níveis plasmáticos. A maior parte do fármaco nos tecidos localiza-se no núcleo das células e, em menor quantidade, nas mitocôndrias celulares (TALLARICO et al., 2003).

3.2.2 Mecanismo de Ação

O mecanismo de ação da doxorubicina envolve a inibição da enzima topoisomerase II (responsável pela abertura do DNA) e RNA polimerases, relacionadas com a síntese de DNA e proliferação celular. A doxorubicina se liga aos ácidos nucleicos pela intercalação específica do núcleo planar da antraciclina com a dupla hélice do DNA, ocorrendo quebras uni ou bifilamentares, bem como trocas entre cromátides irmãs (KALYANARAMAN et al., 2002).

A presença da doxorubicina e dos radicais livres formados são responsáveis pela quebra do DNA originando distúrbios sérios na estrutura terciária do DNA. E esta droga é ativada durante todo o ciclo celular, incluindo na interfase. Sua toxicidade máxima ocorre durante a fase S do ciclo celular e as células morrem na fase G2 (NASCIMENTO & MARTINS, 2005).

Além disso, apresenta atividade sobre a membrana lipídica celular, permitindo que a molécula se ligue à membrana celular bem como às proteínas plasmáticas, podendo alterar suas funções. Com isto desempenha um papel importante nas ações

tumorais, contudo também é responsável pela cardiotoxicidade do fármaco (QUILES et al., 2002).

3.2.3 Cardiotoxicidade

A patogênese da CM associada à doxorubicina está relacionada a vários mecanismos, como a peroxidação lipídica, interação da doxorubicina no DNA mitocondrial, alteração do cálcio celular e formação de radicais livres de oxigênio (SANTOS et al., 2009), sendo três as formas de cardiotoxicidade que podem se desenvolver: aguda, crônica e tardia (NASCIMENTO & MARTINS, 2005).

Em sua forma aguda, os efeitos desenvolvem-se dentro de minutos a horas após a administração intravenosa da doxorubicina e caracterizam-se por hipotensão, taquicardia e diversas arritmias, podendo-se observar disfunção ventricular e aumento significativo dos níveis séricos de desidrogenase lática e creatina quinase, que são indicadores de danos miocárdicos. Entre os efeitos precoces da cardiotoxicidade estão: a distensão do retículo sarcoplasmático e dos túbulos T, edema de mitocôndria e dilatação perinuclear. Muitos sinais de intoxicação aguda são mais significativos nas primeiras horas após sua administração e desaparecem em duas ou três semanas. Seus efeitos agudos como mielossupressão, náusea, vômitos e arritmias são reversíveis ou passíveis de serem tratados clinicamente (NASCIMENTO & MARTINS, 2005).

Os efeitos crônicos geralmente se desenvolvem após semanas a meses de terapia e, algumas vezes, após o término do tratamento. A CM frequentemente culmina com ICC, grave hipotensão, taquicardia, dilatação cardíaca e insuficiência ventricular associada à depressão de contratilidade (NASCIMENTO & MARTINS, 2005). A lesão miocárdica crônica induzida pela doxorubicina é caracterizada, histologicamente, por degeneração vacuolar sarcoplasmática, miocitólise, atrofia de miócitos e fibrose. Essas alterações seriam responsáveis pelo *déficit* de contratilidade, pelas arritmias e anormalidades eletrocardiográficas (SILVA & CAMACHO, 2005).

Em sua forma tardia, a cardiotoxicidade ocorre em pacientes assintomáticos nos quais pode-se observar disfunção ventricular, IC e arritmias, após anos a décadas do término do tratamento. Estas anormalidades parecem ser progressivas e refletem em

descompensação clínica futura cuja probabilidade aumenta de acordo com doses cumulativas maiores (NASCIMENTO & MARTINS, 2005; SANTOS et al., 2009).

3.3 Modelo Experimental

Na linha de pesquisa cardiovascular, modelos animais experimentais têm permitido estudar doenças cardiovasculares em estágios precoces, bem como investigar mecanismos patogênicos das mesmas e o efeito de intervenção medicamentosa. A necessidade de estudos sobre a cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina levou ao desenvolvimento de modelos experimentais utilizando animais, considerando a possibilidade de haver variações importantes entre as espécies relacionadas à suscetibilidade cardiotoxica (NASCIMENTO & MARTINS, 2005).

A CMD em animais pode ser induzida de várias formas e, em sua maioria, os modelos foram realizados em animais pequenos (SANZ & JIMÉNEZ-QUEVEDO, 2007). A maioria das pesquisas concentra-se em três espécies de animais: o coelho, o rato e o camundongo (COSTA et al., 2004; NASCIMENTO & MARTINS, 2005).

Os coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) pertencem à Ordem Lagomorfa, da Família Leporidae e representam o modelo descrito mais completo de CM crônica. Com a utilização de uma variedade de protocolos de tratamento, numerosos laboratórios têm relatado o desenvolvimento de lesões cardíacas idênticas às descritas no homem incluindo vacuolização citoplasmática, edema intersticial e ruptura miofibrilar (DOROSHOW et al., 1979). O miocárdio dos coelhos apresenta similaridades bastante interessantes com o do humano como, por exemplo, a contribuição em 70% da eliminação do cálcio pelo retículo sarcoplasmático e de 30% pela permuta pelo sódio (HASENFUSS, 1998).

3.3.1 Indução da Cardiomiopatia

Existem vários protocolos para indução de CMD em coelhos. Segundo Sanz & Jiménez-Quevedo (2007), após um mês de administração de doxorubicina já há indução da dilatação da câmara ventricular e IC.

Arnolda et al. (1985) realizaram administração de 1mg.kg^{-1} pela via intravenosa (IV) de doxorubicina duas vezes por semana durante 8 semanas em coelhos e obteve o resultado em CM similar ao que ocorre em pacientes com cardiotoxicidade por doxorubicina. Os coelhos apresentaram dilatação cardíaca, efusão pleural e no pericárdio, ascite e congestão hepática.

Existem protocolos que administram 3mg.kg^{-1} IV de doxorubicina uma vez por semana durante seis semanas (AUPPERLE et al., 2007) ou 2mg.kg^{-1} IV de doxorubicina uma vez por semana durante oito semanas (CHEN et al., 2006), obtendo o resultado de degeneração das fibras do miocárdio e fibrose sugestivos de indução da CM.

3.4 Células-Tronco

O termo células-tronco diz respeito a células precursoras, que possuem a capacidade de diferenciação e auto-renovação ilimitadas, podendo dar origem a uma variedade de tipos celulares (ODORICO et al., 2001; GRITTI et al., 2002; SOUZA et al., 2003). É um tipo de célula, capaz de se multiplicar mantendo-se indiferenciada por longos períodos, tanto *in vitro* como *in vivo*, mas que, diante de estímulos específicos, pode diferenciar-se em células maduras e funcionais. Além disso, tem a propriedade fundamental de divisão assimétrica, ou seja, ao mesmo tempo que origina células precursoras, com capacidade de diferenciação restrita a um determinado tecido, produz células indiferenciadas que repõe a população de células-tronco (ZAGO & COVAS, 2006).

As células-tronco estão presentes no embrião, quando são designadas células-tronco embrionárias, mas podem também ser encontradas em tecidos adultos, originando as células-tronco adultas (VOGEL, 2000).

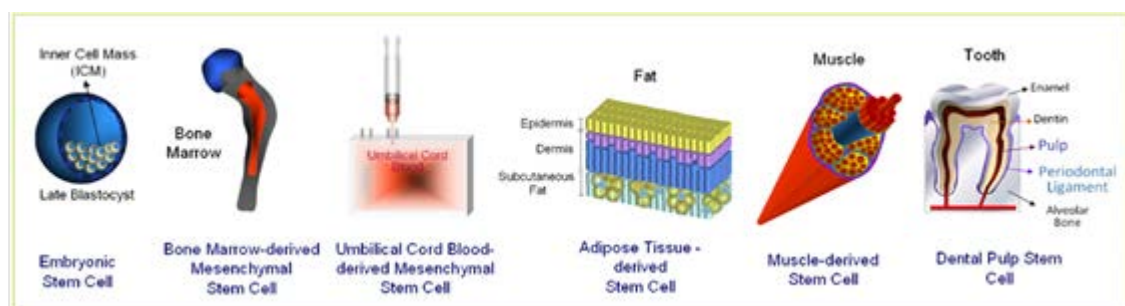
Levando-se em consideração algumas distinções, como o nível de plasticidade que estas células possuem, quantas diferentes vias podem seguir e qual porção de um organismo funcional elas podem constituir, as células-tronco podem classificar-se em toti, pluri ou multipotentes (WAGERS & WEISSMAN, 2004; SCHWINDT et al., 2005; CIRNE-LIMA, 2007).

As células-tronco totipotentes podem originar tanto um organismo totalmente funcional, como qualquer tipo celular do corpo (SOUZA et al., 2003). Correspondem às células do embrião recém-formado, de duas ou quatro células, e têm potencial para originar até mesmo as células do folheto extra-embriônico que formarão a placenta e seus anexos (ROBEY, 2000; CIRNE-LIMA, 2007; FONTANA, 2009).

As pluripotentes, células-tronco embrionárias derivadas de um estágio embrionário mais avançado, são células capazes de originar qualquer tipo de tecido sem, no entanto, originar um organismo completo, visto que não podem gerar a placenta e outros tecidos de apoio ao feto. Formam a massa celular interna do blastocisto, possuindo a capacidade de originar as três camadas germinativas embrionárias (mesoderme, ectoderme e endoderme) e participam da formação de todos os tecidos do organismo (ROBEY, 2000; CIRNE-LIMA, 2007; FONTANA, 2009).

As células-tronco multipotentes estão presentes no indivíduo adulto, com capacidade de originar apenas um limitado número de tipos teciduais. Estas células são designadas de acordo com o órgão de que derivam (GAGE, 2000). Abaixo segue uma figura representativa das possíveis fontes de MSCs (Figura 1).

Figura 1 - Desenho ilustrativo dos diferentes sítios para obtenção de células-tronco (Fonte: SEONG et al., 2010).



Até o momento, as células-tronco adultas melhores estudadas são as células presentes na fração mononuclear da medula óssea, que contém as células-tronco hematopoiéticas e as mesenquimais (MSCs), podendo ser encontradas tanto no sangue periférico como no sangue de cordão umbilical, correspondendo a 0,1 a 1% do total de células (OKAMOTO & SANTOS, 2004; NAKAGE & SANTANA, 2006).

As MSCs são consideradas uma linhagem de células-tronco somáticas e estão presentes em regiões perivasculares de todos os tecidos adultos, em pequenas quantidades, incluindo a medula óssea, tecido adiposo, periósteo, tecido muscular e órgãos parenquimatosos (MEIRELLES et al., 2008; MAMBELLI et al., 2009; ZUCCONI et al., 2010). A propriedade básica que permite o isolamento e cultura dessas células é a sua facilidade de aderir a superfícies como vidro e plástico e possuem a capacidade de se diferenciar *in vitro* e *in vivo* em osteoblastos, adipócitos, condroblastos e mioblastos (ZAGO & COVAS, 2006).

Em condições adequadas de cultivo, as MSCs exibem morfologia fibroblastóide, adesão em substrato plástico, auto renovação e diferenciação em tipos celulares distintos (MONTEIRO et al., 2010). Podem ser expandidas por mais de 40 gerações, mantendo a capacidade multipotente, embora reduzam as taxas de mitose e haja uma grande probabilidade de acúmulo de mutações, tornando desaconselhável seu uso clínico, nestas condições (DEANS & MOSELEY, 2000).

Durante o crescimento inicial *in vitro*, as MSCs fibroblastóides, ou seja, em formato fusiforme, formam colônias denominadas de unidades formadoras de colônias de fibroblastos (CFU-F). Apesar de não serem imortais, as MSCs têm capacidade de se expandir numerosas vezes em cultura, mantendo seu potencial de crescimento e pluripotencialidade. Entretanto, estas células apresentam inibição do crescimento ao atingir a confluência, levando à necessidade de várias passagens sucessivas para se obter quantidades de MSCs altamente enriquecidas, com ausência de outros tipos celulares (BYDLOWSKY et al., 2009).

As MSCs expressam um grande número de moléculas bioativas, como as moléculas de adesão, proteínas de matriz extracelular, citocinas e receptores para fatores de crescimento, permitindo interações com demais células (BOBIS et al., 2006). Essas moléculas atuam modulando a resposta inflamatória, angiogênese e mitose das células envolvidas no processo de reparação tecidual (WAN et al., 2008; CAPLAN, 2009).

Embora as MSCs adultas possuam aptidão de diferenciação mais limitada que as células-tronco embrionárias, apresentam grandes vantagens, considerando a facilidade de isolamento destas células, sua capacidade de propagação em cultura, e de não serem imunogênicas, podendo ser teoricamente empregadas em transplantes alogênicos (BYDLOWSKI et al., 2009).

A gordura de lipoaspirados também apresenta células aderentes com aspecto de célula-tronco mesenquimal (SÁNDOR & SUURONE, 2008), esta população celular, chamada de lipoaspirado processado, pode se diferenciar em células progenitoras osteogênicas, adipogênicas, miogênicas e condrogênicas (PEREIRA et al., 2008). O tecido adiposo consiste em uma fonte alternativa para obtenção de MSCs autólogas adultas, presente em grandes quantidades nestes tecidos, podendo ser coletada com o paciente sob anestesia local, gerando o mínimo de desconforto (ZUK et al., 2002).

O número de pesquisas visando as terapias reparativas com a utilização de células-tronco tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, no Brasil e no mundo. Os resultados já estabelecidos e as possibilidades de sucesso estão gerando grandes expectativas entre a comunidade científica e a população leiga (DEL CARLO et al., 2009). Estudos contemporâneos vêm sendo realizados, descrevendo a utilização alógena e autógena das MSCs para a reparação de diversos tecidos. A grande aplicação na Medicina Veterinária deve-se também à geração de modelos experimentais aplicáveis em paciente humanos (MONTEIRO et al., 2010).

3.5 Scaffolds

Scaffolds são biomateriais sintetizados capazes de mimetizar a matriz extracelular, responsável pelo desenvolvimento, crescimento e diferenciação celular. Como meio apropriado, os *scaffolds* devem possuir unidades moleculares que possibilitem modificações e taxa controlada de biodegradação, não desenvolver toxicidade tópica ou sistêmica, ter propriedades para promover ou inibir interação célula-matriz e célula-célula, apresentar respostas imunes à inflamação, ser material de fácil produção ou aquisição, purificação e possuir compatibilidade com a substância química e com soluções aquosas em condições fisiológicas (OLSSON et al., 2008).

Uma das razões que pode explicar a perda maciça de células durante o transplante é o veículo de administração dessas células. Em geral, as células-tronco são injetadas em solução aquosa de meio de cultura, solução fisiológica salina ou soro fetal, utilizado como fonte de fatores de crescimento para o cultivo das células. Essas soluções permitem que as células possam ser facilmente lavadas, especialmente nos casos onde elas atingem diretamente o sistema circulatório. A utilização de biomateriais

injetáveis, não apenas poderia resolver esse problema, dado que as células permaneceriam retidas, como também, considerando o fato de que essas matrizes representariam uma estrutura pró-angiogênica apta para manter as células transplantadas, otimizaria a patência das células enxertadas (HUANG et al., 2005). Assim, os *scaffolds* são veículos que carregam células para o sucesso na reconstrução de tecidos (OLSSON et al., 2008).

3.5.1 Plasma Rico em Plaquetas

Na atualidade, pesquisas científicas têm proporcionado uma nova perspectiva no entendimento do processo de cicatrização de feridas. No passado, achava-se que as plaquetas agiam exclusivamente nos processos de coagulação. No entanto, as plaquetas também liberam muitas proteínas bioativas responsáveis pela atração de macrófagos, células-tronco mesenquimais e osteoblastos, e não só promovem a remoção de tecidos necróticos, mas também aumentam a regeneração e a cura de tecidos. Com base neste princípio, plaquetas são introduzidas para estimular uma liberação supra-fisiológica de fatores de crescimento em uma tentativa de realizar o início da cura em lesões crônicas (BOER et al., 2006).

O plasma rico em plaquetas (PRP), derivado de sangue autólogo, é definido como um volume de plasma com uma concentração plaquetária acima dos níveis fisiológicos (GANDHI et al., 2006). Ele é considerado um concentrado de plaquetas que contém ainda em sua composição aminoácidos, sais, vitaminas e lipídios (KIERSZENBAUM, 2004).

O PRP é uma fonte de fácil aquisição e de baixo custo, possuindo diversos fatores de crescimento, importantes na reparação tecidual devido às suas ações mitogênica, quimiotática e neovascular. De acordo com a literatura científica, após a ativação por agentes farmacológicos ou fisiológicos, as plaquetas presentes nesses componentes liberam diversos fatores de crescimento presentes nos grânulos alfa (α -grânulos), que apresentam grande potencial terapêutico (MAIA & SOUZA, 2009).

O PRP atua na modulação e aceleração dos processos cicatriciais, sendo esses efeitos decorrentes dos fatores de crescimento contidos nos grânulos plaquetários (DINATO et al., 2001). A aplicação local de fatores de crescimento tem potencial

terapêutico importante no tratamento de feridas crônicas, embora o exato mecanismo de ação sinérgica não esteja completamente elucidado (DEBUS et al., 2000). Esses fatores aceleram a cicatrização de tecidos saudáveis e promovem a reparação de ferimentos, sendo essenciais na regulação dos eventos celulares envolvidos no processo de cicatrização por propiciarem a quimiotaxia para o local da lesão e influenciarem significativamente a deposição da matriz extracelular (MAIA & SOUZA, 2009).

As plaquetas são células anucleadas, com aproximadamente 2 μ m de diâmetro, derivadas de fragmentos citoplasmáticos de megacariócitos, formados na medula óssea (FOSTER et al., 2009). Ocasionalmente, nos equinos e cobaias, as plaquetas são lentiformes, podendo alcançar 20 μ m de diâmetro. Esses fragmentos apresentam importante função no processo de coagulação do sangue e são essenciais no processo inflamatório, na reparação tecidual através da interação célula-célula e na liberação de mediadores solúveis provenientes da ativação destes (FELDMAN et al., 2000).

Estruturalmente, as plaquetas apresentam microtúbulos, microfilamentos de actina e miosina, glicogênio, lisossomo, α -grânulos e grânulos densos, localizados no citoplasma. Os grânulos densos contêm adenosina difosfato (ADP), adenosina trifosfato (ATP), serotonina e cálcio, enquanto os α -grânulos possuem fatores de coagulação e de crescimento, além de outras proteínas (MAIA & SOUZA, 2009).

Normalmente, as plaquetas estão no estado inativo (EVERTS et al., 2006). Sua ativação pode ser realizada por agentes fisiológicos (ex: trombina, tromboxano, colágeno, ADP, fator ativador de plaquetas, serotonina e epinefrina) e farmacológicos (ex: ionóforo de cálcio, cloreto de cálcio e análogos de endoperóxido cíclico) (CARMONA et al., 2007). Acredita-se que todos esses agonistas desencadeiam seus efeitos por meio da interação com receptores localizados na membrana plasmática das plaquetas (MAIA & SOUZA, 2009).

Uma vez ativadas, as plaquetas se modificam morfológicamente e desenvolvem pseudópodos, os quais promovem a agregação plaquetária e, posteriormente, a degranulação dos grânulos plaquetários (EVERTS et al., 2006). Em particular, os α -grânulos são ricos em fatores de crescimento com diversas ações biológicas. Entretanto, é importante ressaltar que a ativação das plaquetas deve ser realizada próximo ao momento da aplicação terapêutica, de forma a assegurar uma adequada concentração dos fatores de crescimento presentes nessas plaquetas (MAIA, 2008). Após estimulação

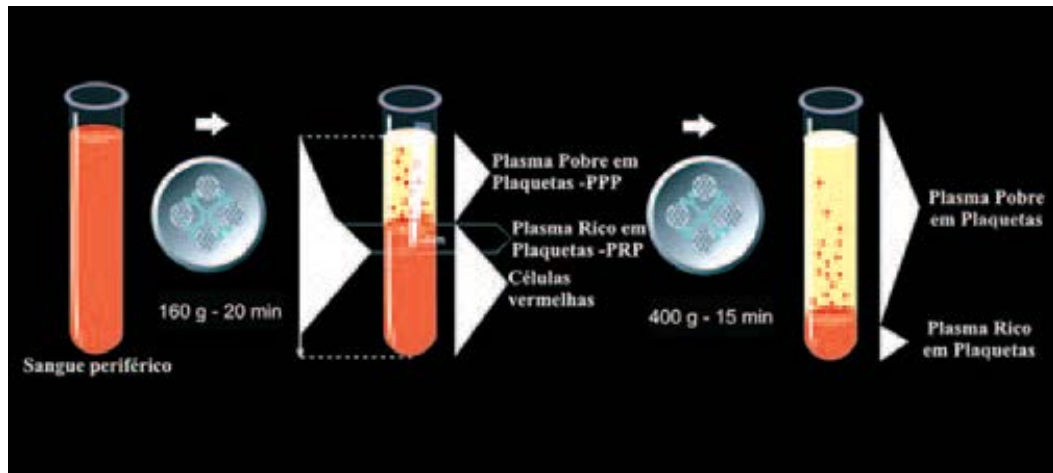
pelo agonista, os α -grânulos plaquetários liberam proteínas por exocitose no local da lesão para iniciar o recrutamento de outras plaquetas, leucócitos e proteínas plasmáticas (MAIA & SOUZA, 2009).

A degranulação plaquetária propicia a liberação das seguintes substâncias: fator de crescimento de transformação beta (TGF- β), fibrinogênio, fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento de transformação alfa (TGF- α), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), tromboplastina plaquetária, cálcio, serotonina e enzimas hidrolíticas (EVERTS et al., 2006). Adicionalmente, outros fatores como de crescimento fibroblástico (FGF), crescimento de tecido conjuntivo (CTGF) (KUBOTA et al., 2004) e fator semelhante à insulina I (IGF-I) (WEIBRIC et al., 2002) também estão presentes nas plaquetas.

Os TGFs ativam os fibroblastos para formação de protocógeno, que resulta na deposição de colágeno e cicatrização da ferida. Os PDGFs, associados ou não com os TGFs, aumentam a vascularização tissular, promovem a proliferação de fibroblastos, aumentam a quantidade de colágeno, estimulam produção de tecido de granulação e melhoram a osteogênese (LIU et al., 2002; MARX, 2004). O VEGF estimula a angiogênese, a mitogênese e a permeabilidade vascular e o EGF induz o crescimento de tecido epitelial e promove, também, a angiogênese. Estas substâncias tornam a cicatrização mais rápida e eficiente, favorecendo a integração de enxertos, sejam eles ósseos, cutâneos, cartilagosos ou de células de gordura (VENDRAMIN et al., 2006).

O PRP é derivado do sangue total, contendo mais plaquetas que os níveis fisiológicos. Esse componente pode ser obtido mediante uma (PAGLIOSA & ALVES, 2007) ou duas centrifugações (PAGLIOSA & ALVES, 2007; BARBOSA et al., 2008; MAIA, 2008) entre 200 a 2000G (Figura 2).

Figura 2 – Representação esquemática de protocolo de dupla centrifugação (Fonte: MESSORA et al., 2009)



Na medicina veterinária, a técnica para obtenção do PRP vem sendo baseada na utilizada para a espécie humana. O PRP pode ser obtido por meio da coleta do sangue total em tubos ou bolsas de sangue contendo o anticoagulante citrato de sódio, após a centrifugação e ativação das plaquetas (BARBOSA et al., 2008). O procedimento para a obtenção desses componentes ricos em plaquetas pode ser realizado utilizando-se centrífugas convencionais ou equipamentos que permitam a separação dos constituintes do sangue total (MAIA & SOUZA, 2009).

O gel de PRP é obtido pela adição de trombina e gluconato de cálcio ao PRP. Estes ativam o sistema de coagulação, pela ativação das plaquetas, resultando na gelação do PRP, o que facilita sua aplicação em procedimentos cirúrgicos (VENDRAMIN et al., 2006).

O PRP ainda possui na sua composição proteínas como a fibrina, fibronectina e vitronectina, que atuam como moléculas de adesão celular, otimizando o processo de reparo tecidual (VENDRAMIN et al., 2006; FOSTER et al., 2009).

A fibrina não induz resposta inflamatória, portanto, não promove a extensão da fibrose cardíaca (RADOSEVICH et al., 1997). Possui efeito positivo sobre a função cardíaca, prevenindo o remodelamento negativo ventricular em ratos submetidos à lesão de isquemia/reperfusão cardíaca (CHRISTMAN et al, 2004).

As plaquetas e a fibrina são conhecidas por serem potentes substratos adesivos para leucócitos, assim, esses fatores hemostáticos podem também facilitar o *homing* de células progenitoras endoteliais para o local da lesão. Além disso, plaquetas ativadas liberam citocinas, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de crescimento de fibroblastos e mediadores lipídicos, conhecido por aumentar a angiogênese e neovascularização. Portanto, o coágulo hemostático pode fornecer fatores locais para a inicial atração, adesão, migração e diferenciação das células progenitoras endoteliais para a reparação da lesão vascular (BOER et al., 2006).

Evidências recentes sugerem que a combinação de células-tronco com biopolímeros injetáveis, que contenham fibrina e colágeno, podem favorecer a sobrevivência dessas células, a angiogênese e melhorar a função cardíaca em modelo animal de infarto agudo do miocárdio. Nesse sentido, o emprego de células-tronco associadas ao uso de biopolímeros é uma promissora proposta para a efetivação da engenharia de tecidos cardíaca, considerando que carreadores biodegradáveis otimizam o implante das células-tronco por possuírem a função de permitir uma melhor adesão, fornecer um microambiente mais adequado, e favorecem a adaptação celular no local de implantação das células (CHRISTMAN et al., 2004; HUANG et al., 2005).

3.6 Terapia Celular nas Cardiomiopatias

A IC é a doença crônica com maior impacto na sobrevivência e na qualidade de vida dos pacientes. A prevalência de IC nos países ocidentais é estimada em 1% do total da população, crescendo a cada ano. A prevalência aumenta com a idade, sendo a principal causa de internação de indivíduos com mais de 65 anos e em aproximadamente 50% da população acima de 85 anos (GRECO et al., 2009).

Hoje, a terapia para IC se restringe ao tratamento de uma moléstia já estabelecida e é, sobretudo, de natureza farmacológica, visando, essencialmente, inibir o eixo neuro-hormonal que resulta em excessiva ativação cardíaca pelas vias angiotensina ou norepinefrina dependentes. Para pacientes com insuficiência cardíaca em fase terminal, as opções de tratamento são muito limitadas. O transplante cardíaco é a terapia mais eficiente, porém, seu uso está comprometido pela limitada obtenção de órgãos

doadores e por graves problemas médicos e socioeconômicos (HOGNESS, 1991; BOCCHI & FERREIRA, 2005; GRECO et al., 2009).

Apesar do constante desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas, condutas eletrofisiológicas com modernos equipamentos e alternativas cirúrgicas cada vez mais sofisticadas, a IC ainda atinge altos índices de mortalidade em todo o mundo (GRECO et al., 2009). Assim, tornou-se imperativo o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para esses pacientes, dentre as quais a terapia celular tem despertado maior interesse (COOKSON, 2005; SANZ & JIMÉNEZ-QUEVEDO, 2007; DEL CARLO et al., 2009).

As células-tronco representam uma das grandes promessas da medicina, com proposta de tratamento de diferentes doenças consideradas sem opção terapêutica. Seu principal papel seria a regeneração de órgãos incapacitados funcionalmente, por processos de diferentes etiologias: inflamatórios, traumáticos, degenerativos. Com base nos recentes estudos, este potencial proporcionará tratamentos de doenças neurológicas, cardiovasculares e dos tecidos músculos esquelético (GRECO et al., 2009).

O potencial reparo realizado pelas células-tronco implantadas ou de células mobilizadas endogenamente é de extrema importância para doenças do coração, pois pode contribuir para a reversibilidade da falência cardíaca, devido à diminuta capacidade de proliferação celular dos cardiomiócitos (HIDEMASA, 2003).

Nas últimas duas décadas houve importantes avanços na terapêutica das doenças cardiovasculares. Recentemente, a observação da existência de processos de regeneração no miocárdio colocou a angiogênese, a terapia gênica e o transplante de células como as mais atuais e potenciais formas de tratamento das doenças cardiovasculares (BOCCHI & FERREIRA, 2005; SOARES, 2005).

A partir da década de 90, vários estudos *in vitro* e *in vivo* sugeriram que as células mononucleares da medula óssea pudessem se diferenciar em cardiomiócitos e vasos. O implante de MSCs e de células mononucleares da medula óssea foram capazes de melhorar a contração e a perfusão miocárdica em modelos animais de infarto miocárdico, isquemia crônica e CM chagásica e dilatada (CARVALHO et al., 2009).

A capacidade das células-tronco da medula óssea de se diferenciarem em cardiomiócitos tem sido demonstrada principalmente em modelos experimentais de

infarto do miocárdio (VILAS-BOAS et al., 2004), havendo poucos relatos de terapia celular em modelos animais de CMD. Em geral, os modelos animais utilizam uma linhagem de cobaias com CMD (*syrian hamster cardiomyopathy*) ou indução de CMD em ratos ou camundongos pela doxorubicina (CARVALHO et al., 2009).

Ao longo da década passada, houve crescente evidência experimental de que os transplantes de células poderiam ser abordagem nova e eficiente para a recuperação de miocárdio lesado. Contudo, os estudos pré-clínicos e clínicos sobre terapia celular, em sua maioria, foram feitos em cardiomiopatias isquêmicas. Assim, existem poucos dados pré-clínicos sobre os efeitos do transplante de células no quadro de CMD não isquêmica. Sob esse aspecto, na CMD não isquêmica, o fluxo coronário epicárdico não fica danificado de forma significativa, e as células enxertadas parecem sobreviver melhor no miocárdio hospedeiro. Dessa forma, ao restaurar a função cardíaca comprometida, o transplante de células poderia trazer novas esperanças para os portadores dessa doença (SANZ & JIMÉNEZ-QUEVEDO, 2007).

No presente, a terapia com células-tronco é sugerida como regenerativa do tecido cardíaco lesado. Embora alguns estudos não tenham obtido resultados positivos quanto à pluripotencialidade das células-tronco, diversos trabalhos experimentais e ensaios clínicos recentes em pacientes com CM ou infarto do miocárdio têm resultados animadores quanto à confirmação da eficácia desse novo método. Os mecanismos pelos quais as células-tronco melhoram a função cardíaca permanecem obscuros. No entanto, os estudos realizados não tiveram observações de longo prazo, a mortalidade não foi avaliada como objetivo principal, a maior parte dos estudos não foi randomizada e os resultados ainda são limitados quanto ao grau de benefício frente à expectativa. Muito embora a manutenção da prevenção e do tratamento já estabelecidos permaneça crucial para a abordagem das cardiopatias, as perspectivas da terapia com células-tronco são estimulantes (BOCCHI & FERREIRA, 2005).

3.6.1 Rotas de Aplicação

Uma variedade de vias de administração de células tem sido testada para o transplante de células-tronco, incluindo a intramiocárdica (HODGSON et al., 2004; LIU et al., 2004), sistêmica (CHIN et al., 2003) e intracoronariana (ASSMUS et al., 2002).

O objetivo de qualquer estratégia de fornecimento celular é transplantar número suficiente de células para a região miocárdica de interesse conseguindo o máximo de retenção destas células na devida área. Células- progenitoras para reparo cardíaco têm sido fornecidas por duas vias principais: abordagem transvascular ou injeção direta na parede ventricular (BOCCHI & FERREIRA, 2005).

3.6.1.1 Infusão Arterial Intracoronária

A via intracoronária aumenta a oferta de células-tronco ao tecido cardíaco, facilitando a fixação, já que a primeira passagem se fará necessariamente nos capilares coronarianos. Esse método é, sobretudo, interessante em pacientes com insuficiência aguda do miocárdio, onde será injetado um concentrado enriquecido de células-tronco próximo ao local da injúria. As células são fornecidas através de um cateter balão durante uma insuflação transitória do balão, para otimizar o tempo de contato celular com a microcirculação da artéria relacionada com o infarto (WOLLERT & DREXLER, 2005).

3.6.1.2 Injeção Direta na Parede Ventricular

A injeção intramiocárdica é o método mais popular de infusão de células no coração (SUZUKI et al., 2001), não sendo observadas complicações relacionadas à fase aguda (pós-cirúrgico) ou a sequelas a longo termo (TSE et al., 2003). É a via preferida em casos de obstrução coronariana (miocardiopatia isquêmica) ou quando os sinais de mobilização são fracos (presença de tecido cicatricial) (BOCCHI & FERREIRA, 2005).

Essa via tem grande importância em casos de cardiopatia isquêmica devido à habilidade de entregar as células seletivamente dentro do tecido miocárdico, tanto em áreas normais quanto infartadas (SUZUKI et al., 2001). No entanto, a injeção direta de células dentro do miocárdio isquêmico ou cicatricial cria ilhotas de células com suprimento sanguíneo limitado, o que pode comprometer a sobrevivência dessas células (BOCCHI & FERREIRA, 2005).

3.7 Cirurgia Toracoscópica Video-Assistida

Com a constante evolução da cirurgia cardíaca, novas técnicas e tecnologias vêm sendo aplicadas com o objetivo de tornar os procedimentos cirúrgicos mais seguros e menos invasivos. A introdução da cirurgia cardíaca minimamente invasiva vídeo-assistida torna possível a abordagem cirúrgica de diversas doenças cardíacas por meio de incisões cada vez menores, diminuindo a agressão ao organismo. Isto se reflete em menor trauma operatório, culminando com melhor evolução do paciente (RICHTER et al., 2007; POFFO et al., 2009).

A cirurgia endoscópica é caracterizada como um acesso cirúrgico minimamente invasivo, no qual a visualização é realizada através de um endoscópio. É também denominada de cirurgia laparoscópica, celioscópica ou pelvioscópica, quando o procedimento envolve o acesso abdominal, e toracoscópica vídeo-assistida (CTVA), quando o procedimento envolve o acesso torácico (FREEMAN, 1998).

A toracoscopia foi originalmente introduzida por Jacobeus, em 1910, quando o pesquisador usou um cistoscópio modificado, sem magnificação de imagens, para realizar diagnósticos de tuberculose. Na última década, o acesso toracoscópico tem registrado uma expansão importante, quer nas possibilidades diagnósticas, quer nas terapêuticas (JAKLITSCH, 1996). A partir do início da década de 90, a técnica foi utilizada em maior escala, sendo empregada com êxito na identificação de efusão pleural, de fístulas bronco-pleurais, de lesões esofágicas, anormalidades pericárdicas, doenças pulmonares intersticiais difusas e nódulos pulmonares (CARRILO et al., 1997). Da mesma maneira, o acesso passou a ser utilizado com objetivos terapêuticos, como na ressecção de nódulos pulmonares (NAKAJIMA et al., 2000), excisão e drenagem pericárdica, pleurodesis e biópsias pulmonares (MACK et al., 1992) e drenagem de abscesso mediastinal (CHUNG & RITCHIE, 2000).

Em relação à cirurgia cardíaca, também em meados da década de 90, surgem na literatura médica mundial vários relatos a respeito de técnicas menos invasivas. Os objetivos são uma melhor recuperação do paciente com menor dor e complicações pós-operatórias, culminando com a diminuição da permanência hospitalar e consequente redução de custos. Outro ponto é o aspecto estético e a satisfação do paciente decorrente da redução do trauma cirúrgico (cicatriz) (POFFO et al., 2009).

Na Medicina Veterinária, a toracoscopia também vem aumentando seu uso, sendo utilizada experimentalmente nas biópsias pulmonares, lobectomias (GARCÍA et al., 1998), pericardiectomias (WALSH et al., 1999), redução de hérnias diafragmáticas (BECK et al., 2004) e biópsias do miocárdio (MARTINS et al., 2009) em cães. Walton (2001) acrescentou que a toracoscopia é instrumento importante para determinação de estágios tumorais, visualização de biópsias, avaliação e tratamento de pneumotórax persistente, tratamento de efusão pericárdica e pleural e na avaliação e reparo do trauma intratorácico em pequenos animais.

Em relação ao uso da CTVA e terapia celular em cardiopatia, Kalil et al. (2008) relatam a CTVA como uma abordagem ideal de aplicação de células-tronco no miocárdio em pacientes com CMD, pois envolve um método minimamente invasivo que é capaz de injetar, de modo seguro, as células no miocárdio alcançando uma maior concentração de células e locais no coração, com menores efeitos sistêmicos.

3.8 Troponina

Quando os miócitos necrosam e sofrem dano celular importante, perdem a integridade da membrana e permitem a passagem de macromoléculas ao tecido intersticial, onde são absorvidos pelos capilares e pelo sistema linfático, alcançando a circulação sistêmica. Essas macromoléculas liberadas pelos miócitos recebem o nome de marcadores biológicos de dano miocárdico e têm adquirido grande relevância na prática clínica (LÓPEZ-SENDÓN, 2003).

Algumas proteínas cardíacas, especialmente a troponina I, troponina T e, em menor grau, as isoformas miocárdicas da creatinoquinase (CK-MB), representam uma sequência de aminoácidos exclusiva dos miócitos e podem ser identificadas por anticorpos monoclonais, sendo, portanto, mais específicas e sensíveis ao dano miocárdico (LÓPEZ-SENDÓN, 2003). Porém, a sensibilidade da CK-MB não é suficiente alta para detectar dano miocárdico leve, face à impressão analítica das medidas de atividade e à ampla faixa de normalidade. Além disso, tem uma evolução lenta nas primeiras horas do dano miocárdico possuindo um aparecimento retardado desse marcador no sangue (LEAL et al., 1999).

Recentemente, as troponinas têm recebido crescente atenção como marcadores altamente específicos de injúria celular miocárdica, os quais são amplamente utilizados para a estratificação de risco nas síndromes coronárias agudas (GODOY et al., 1998; DEL CARLO et al., 2009). As troponinas formam um complexo que regula a interação cálcio-dependente da miosina com a actina. São constituídas de três diferentes proteínas (troponina I, C e T), existentes tanto no músculo esquelético quanto cardíaco e codificadas por diferentes genes. A troponina C é idêntica tanto no músculo esquelético como cardíaco, mas os genes codificadores das troponinas I e T, cardíaca e esquelética, são diferentes, o que permitiu que anticorpos monoclonais de reatividade cruzada extremamente baixa pudessem ser desenvolvidos facilitando o diagnóstico do infarto agudo do miocárdio. Em pacientes neste quadro, a elevação da atividade da creatinofosfoquinase acima dos valores normais é raramente encontrada de quatro a seis horas após o início da dor, fazendo com que o diagnóstico precoce tenha que depender fortemente de alterações eletrocardiográficas típicas. Isto se torna um problema pelo fato de que o eletrocardiograma (ECG) é inconclusivo em até 40% dos pacientes (ANTMAN et al., 1996).

Ambas as concentrações séricas de troponinas T e I foram amplamente reconhecidas como marcadores altamente específicos e sensíveis para o diagnóstico de lesão miocárdica. A principal vantagem das troponinas em relação a outros marcadores tradicionais é que elas são mais específicas para a lesão do miocárdio. O aumento da troponina parece correlacionar-se com a extensão da lesão do miocárdio, e as concentrações circulantes de troponina cardíaca permanecem detectáveis por um longo período de tempo comparado com outros marcadores tradicionais (DE FRANCESCO et al., 2002).

Estas características citadas acima sugerem que as concentrações de troponina no soro pode ser um marcador útil de lesão miocárdica secundária à quimioterapia com doxorubicina (O'BRIEN, 2008). Adicionalmente, seu uso como biomarcador na clínica de doença cardíaca foi ampliado substancialmente para incluir uma ampla gama de patologias caracterizadas por: ferimentos cardíacos, angina, infarto do miocárdio, hipertrofia ventricular esquerda, insuficiência cardíaca congestiva, trauma pulmonar, embolia, sepse, doença renal, *diabetes mellitus* e cardiotoxicidade associada à drogas neoplásicas e simpaticomiméticas (BABUIN & JAFFE, 2005; KORFF et al., 2006; GUPTA & DE LEMOS, 2007).

A troponina I cardíaca não se expressa no músculo esquelético humano durante o desenvolvimento fetal, após trauma do músculo esquelético ou durante a regeneração desse tipo de músculo. Ao contrário da CK-MB, a troponina I cardíaca é altamente específica para o tecido miocárdico, não é detectável no sangue de pessoas saudáveis e mostra um aumento proporcionalmente maior acima dos valores limite nos casos de infarto do miocárdio, podendo permanecer elevada por 7 a 10 dias após o episódio agudo (GODOY et al., 1998).

A detecção das troponinas nos pacientes com IC avançada tem atraído o interesse dos médicos com o propósito de avaliação prognóstica. Muitos indicadores prognósticos têm sido descritos nos pacientes com IC compensada e descompensada, e vários estudos têm focado a relação entre a elevação das troponinas e o prognóstico na IC, os quais mostraram associação com piores resultados clínicos (YOU et al., 2007).

Vários estudos avaliaram o papel dos níveis séricos das troponinas cardíacas na IC e tentaram correlacionar com o prognóstico da doença, demonstrando que níveis séricos desses marcadores estavam elevados em percentagem alta de pacientes com IC descompensada e poderiam se constituir como preditores de morbimortalidade desta síndrome (OLIVEIRA et al., 2010). Assim, a utilização das troponinas para estratificação de risco na IC descompensada pode melhorar os cuidados do paciente pela identificação daqueles com pior prognóstico (DEL CARLO et al., 2009).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais Experimentais

Foram utilizados 49 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) da ordem Lagomorfa, da raça Nova Zelândia albinos, sendo um doador macho e o restante fêmeas, com idade variando entre três e quatro meses, com peso corporal de 2 a 3,5 kg, provenientes de cabanhas cadastradas na Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (UEA-HCPA).

Todos os animais foram mantidos e manipulados segundo normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA). O projeto referente a esta dissertação foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), onde está cadastrado sob o protocolo 11-0279.

4.1.1 Biotério

Os animais foram primeiramente encaminhados ao Biotério da Faculdade de Medicina Veterinária da UFRGS, em dia e horário previamente acordados. Todos os coelhos passaram por um período de adaptação, que variou de três a cinco dias, antes do início dos procedimentos referentes ao projeto. No dia em que chegaram, os animais foram pesados e receberam uma dose de ivermectina 1%¹ pela via subcutânea (SC), na dosagem de 0,3mg.kg⁻¹.

Após cinco semanas referentes ao período de adaptação e indução da cardiomiopatia com doxorubicina², os animais eram transportados para a UEA-HCPA, permanecendo por mais cinco dias para aclimação antes dos procedimentos cirúrgicos.

Em ambos os biotérios os coelhos permaneceram em gaiolas individuais sob temperatura controlada de 18⁰C e umidade de ar média de 68%, com alimentação à base

¹ Ivermectina Cherry, Laboratórios Cherry do Brasil LTDA, Bagé – RS, Brasil.

² Doxorubicina 50mg, Biosintetica, São Paulo – SP, Brasil.

de ração comercial peletizada específica para a espécie, eventualmente verduras, legumes e água *ad libitum* (Figura 3).

Figura 3 – Biotérios onde ficaram alojados os coelhos do experimento. (A) Biotério da Faculdade de Medicina Veterinária da UFRGS; (B) Biotério da UEA-HCPA.



4.1.2 Pesagem

Os coelhos foram pesados semanalmente durante o período de indução da cardiomiopatia com doxorubicina e em um intervalo de 15 dias, correspondendo o período entre o dia da cirurgia e o dia da eutanásia.

4.2 Obtenção das Células-Tronco de Tecido Adiposo

4.2.1 Coleta do Tecido Adiposo

Para realizar a coleta do tecido adiposo, foi utilizado um único doador da mesma espécie, macho, de três meses de idade, pesando 2,9kg. O animal foi pré-medicado com cloridrato de tramadol³ (5mg.kg⁻¹), midazolam⁴ (1mg.kg⁻¹) e quetamina⁵ (20mg.kg⁻¹) por via intramuscular (IM) e, posteriormente, foi realizada tricotomia na região

³ Cloridrato de Tramadol, União Química, São Paulo – SP, Brasil.

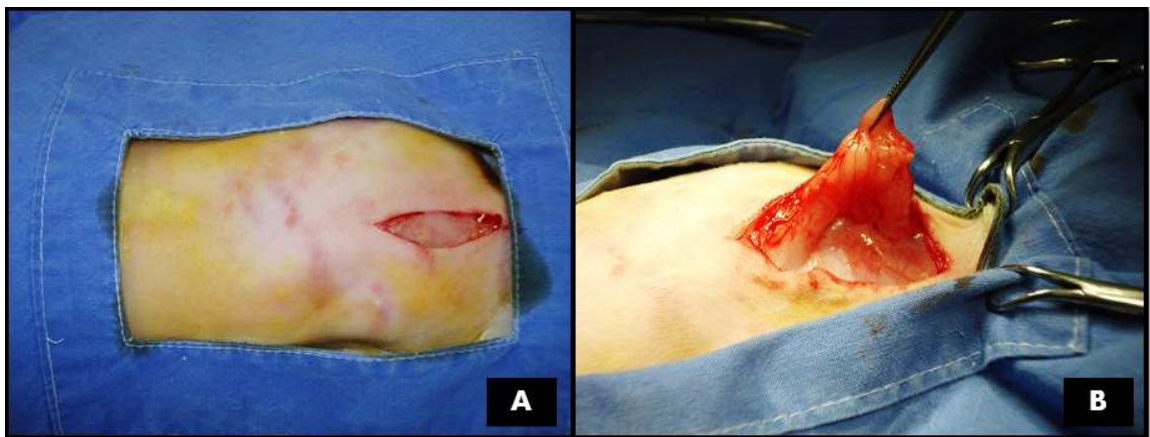
⁴ Dormonid, Roche, São Paulo – SP, Brasil.

⁵ Cetamin 10%, Syntec do Brasil, Cotia – SP, Brasil.

interescapular e cervical. Após, o animal foi induzido com isoflurano⁶ para a realização da intubação orotraqueal e sua manutenção foi realizada com isoflurano e oxigênio 100%, sendo mantido sob plano anestésico cirúrgico.

O animal foi posicionado em decúbito esternal e realizou-se a antissepsia com álcool, iodo e álcool. Incidiu-se a pele até o subcutâneo na região cervical, caudal ao occipital, até a região interescapular. Nesta região realizou-se a coleta de 12cm² de tecido adiposo que foi colocado em um tubo plástico, estéril, fundo cônico, de 15mL contendo PBS com penicilina e estreptomicina⁷ (PS) e encaminhado para o Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular localizado ao lado da UEA no Centro de Pesquisa Experimental (CPE) do HCPA (Figura 4). Para a redução do espaço morto utilizou-se fio poliglactina 910⁸ de diâmetro 4-0, utilizando-se padrão contínuo simples. A pele foi suturada em padrão intradérmico com fio mononáilon⁹ de diâmetro 3-0.

Figura 4 – Coleta do tecido adiposo em coelho Nova Zelândia para obtenção das MSCs. (A) Incisão de pele até exposição do tecido subcutâneo na região cervical; (B) coleta do tecido adiposo.



⁶ Isoforine, Cristália, Itapira – SP, Brasil.

⁷ PS, Gibco – NM, USA.

⁸ Poliglactina 910, Shalon, Goiânia – GO, Brasil.

⁹ Nylon, Shalon, Goiânia – GO, Brasil.

No período do pós-operatório, o coelho recebeu cloridrato de tramadol (3mg.kg^{-1}) SC a cada 12 horas (BID), enrofloxacin¹⁰ (10mg.kg^{-1}) SC, BID e cetoprofeno¹¹ (2mg.kg^{-1}) SC, a cada 24 horas (SID) durante 3 dias. No décimo dia foi realizada a retirada dos pontos.

4.2.2 Isolamento das MSCs de Tecido Adiposo

Após a coleta, a fração de tecido adiposo foi processada em capela de fluxo laminar. Em seguida, o tecido foi colocado em solução de colagenase tipo I, 1mg.mL^{-1} em *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM)¹² 9mM HEPES, por um período de uma hora a 37°C para promover a digestão do tecido. Após a digestão, a enzima colagenase foi inativada pela adição de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB)¹³.

Realizado o isolamento, as células foram cultivadas em DMEM contendo baixa concentração de glicose suplementado com HEPES 9mM, 20% de SFB e solução antibiótica de 100units.mL^{-1} de penicilina e 100mg.mL^{-1} de estreptomicina, a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 e 100% de umidade. Transcorridas 24 horas de cultivo, o meio de cultura foi aspirado e meio fresco foi adicionado. Quando a cultura celular apresentou confluência de 80%, as células aderentes foram removidas com solução de tripsina-EDTA 0,05%¹⁴ para posterior subcultivo em DMEM suplementado com 10% SFB (meio completo).

4.2.3 Congelamento/Descongelamento das MSCs

As células-tronco mesenquimais, em segunda passagem, foram congeladas em SFB suplementado com 5% de dimetilsulfóxido e armazenadas em freezer -80°C .

¹⁰ Zelotril 10%, Agener União, Brasília – DF, Brasil.

¹¹ Ketofen 1%, Merial, Campinas – SP, Brasil.

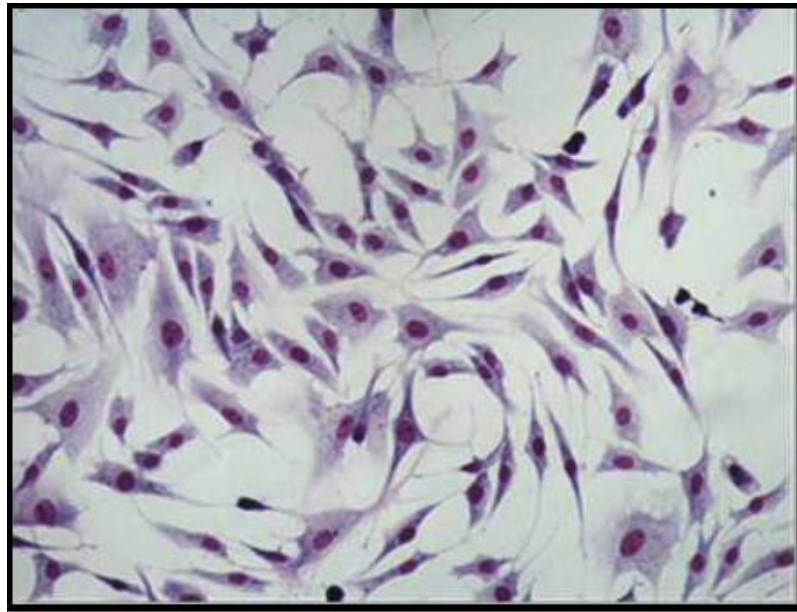
¹² Dulbecco's modified Eagle's medium, Invitrogen – CA, USA.

¹³ Soro Fetal Bovino, Invitrogen – CA, USA.

¹⁴ Tripsina, Gibco – NM, USA.

Cerca de uma semana antes do transplante, as células foram descongeladas e expandidas. Foram transplantadas células entre a terceira e a quarta passagem (Figura 5).

Figura 5 – MSCs derivadas do tecido adiposo de coelho Nova Zelândia coradas com Hematoxilina-Eosina e em aumento de 20X.



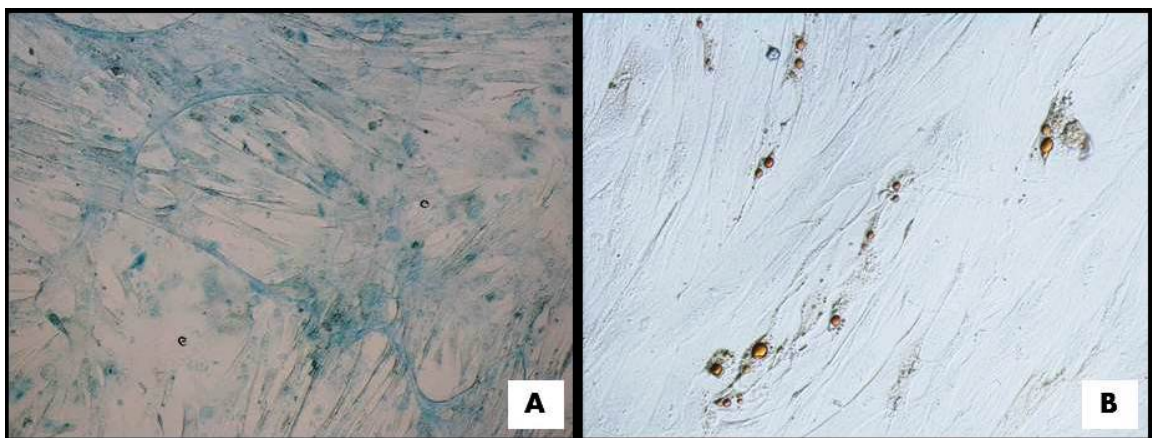
4.2.4 Caracterização das MSCs Isoladas de Tecido Adiposo

As MSCs foram caracterizadas por morfologia e diferenciações *in vitro*. Para tanto, foram realizados dois diferentes experimentos para a indução da diferenciação das MSCs em linhagens: condrogênicas e adipogênicas. Para a diferenciação condrogênica, foi utilizado meio DMEM suplementado com HEPES 9mM, 6,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de insulina, 10ng.mL⁻¹ de TGF beta1 e 50mM de ácido ascórbico 2-fosfato¹⁵ por 21 dias. A detecção da diferenciação foi realizada por coloração com Alcian Blue, que possui afinidade pelos grupos aniônicos, presentes nos glicosaminoglicanos da matriz extracelular.

¹⁵ Ácido Ascórbico 2-Fosfato, Sigma – MO, USA.

Para a diferenciação adipogênica, as MSCs foram cultivadas em DMEM suplementado com HEPES 9mM, 10^{-8} mol.L⁻¹ de dexametasona¹⁶, 5µg.mL⁻¹ de insulina e 50µg.mL⁻¹ de indometacina¹⁷. A diferenciação adipogênica foi detectada 21 dias após o início do ensaio de diferenciação por coloração com Oil Red¹⁸, que cora os depósitos de gordura em vacúolos.

Figura 6 – Caracterização das MSCs isoladas do tecido adiposo. (A) Diferenciação condrogênica detectada pela coloração Alcian Blue em aumento de 10X; (B) diferenciação adipogênica detectada pela coloração Oil Red em aumento de 20X.



4.3 Indução da Cardiomiopatia Dilatada pela Doxorrubicina

4.3.1 Avaliações Ecocardiográficas e Eletrocardiográficas

Para a obtenção da situação basal dos corações dos coelhos no estágio inicial do experimento, foram realizados os exames de ecocardiograma e eletrocardiograma no Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS (HCV-UFRGS).

Os animais foram analisados antes e depois da aplicação da doxorrubicina, com o equipamento de ecocardiograma bi-dimensional modelo Mylab 30 Vet e equipamento de eletrocardiograma modelo TEB PC Vet.

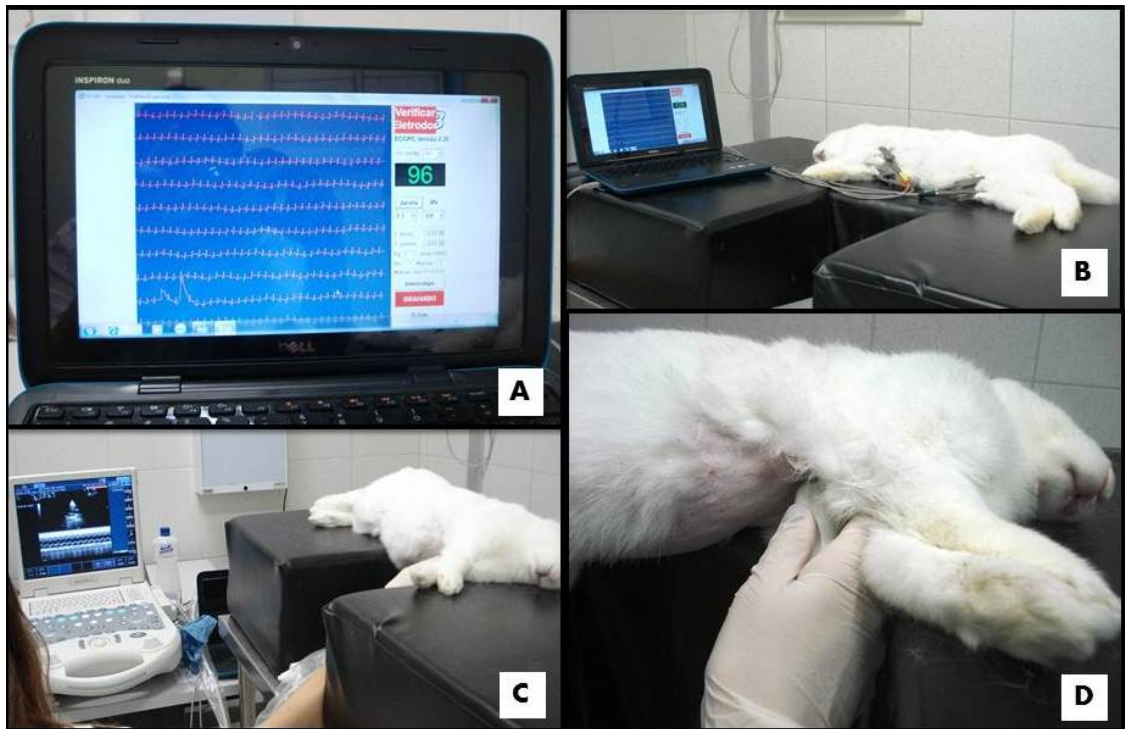
¹⁶ Dexametasona, Sigma – MO, USA.

¹⁷ Indometacina, Sigma – MO, USA.

¹⁸ Oil Red, Sigma – MO, USA.

Todos os coelhos foram submetidos a uma sedação prévia com midazolam ($2\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) e quetamina ($10\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) IM antes dos exames, sendo realizada tricotomia em região pré-cordial (Figura 7).

Figura 7 – Realização dos exames de eletrocardiograma e ecocardiograma nos coelhos Nova Zelândia. (A) Traçado do eletrocardiograma; (B) coelho em decúbito lateral esquerdo com eletrodos do eletrocardiograma; (C) realização do ecocardiograma com equipamento bi-dimensional modelo Mylab 30; (D) posicionamento do transdutor durante exame de ecocardiograma.



O examinador foi “cego” para os grupos randomizados.

Foram realizadas medidas no ecocardiograma com o objetivo de determinar os seguintes diâmetros: aorta medido pelo modo M (AoM) e pelo modo bidimensional (AoB), átrio esquerdo medido pelo modo M (AEM) e bidimensional (AEB), ventrículo direito (VD), septo interventricular em diástole (SIV), parede livre do ventrículo esquerdo em diástole (PL), diastólico do ventrículo esquerdo (VE_d), sistólico do ventrículo esquerdo (VE_s), fração de ejeção (FE) e fração de encurtamento (FS) que foi calculada seguindo a seguinte fórmula: $\text{VE}_d - \text{VE}_s / \text{VE}_d$.

No eletrocardiograma foram realizadas avaliações na derivação DII, sendo observada a frequência cardíaca (FC), o ritmo (R), duração (seg) e amplitude (mV) da onda P, polaridade da onda T, eixo elétrico, onda R e segmentos PR, QRS e QT.

Todas as medidas, tanto do eletrocardiograma como no ecocardiograma, foram obtidas através de uma média de três medidas de cada parâmetro mencionado acima.

4.3.2 Avaliação Troponina I

Antes da aplicação da doxorrubicina e após o protocolo de indução da cardiomiopatia dilatada, foi coletado 1mL de sangue dos coelhos na artéria central da orelha. Este material foi avaliado no Setor de Patologia Clínica do HCPA, onde foi utilizado o soro e analisado pela técnica de enzimaímmunoensaio fluorimétrica com o *kit Opus Plus* da Boehringer Diagnóstica.

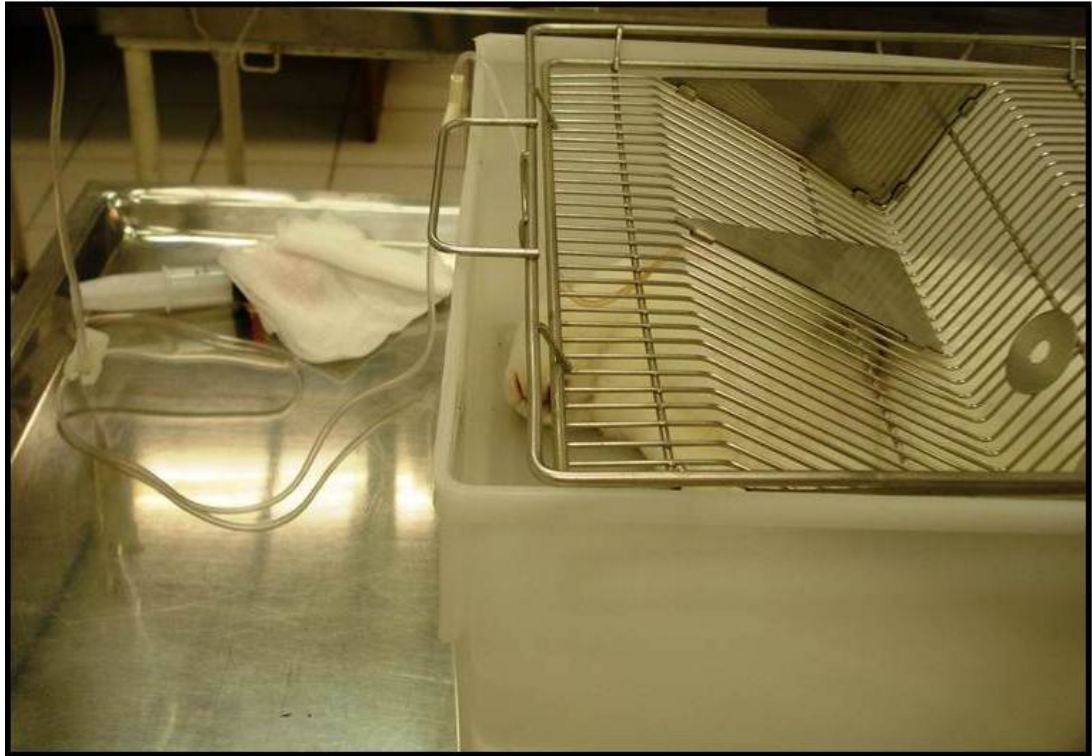
4.3.3 Aplicação de Doxorrubicina

Para a indução da cardiomiopatia dilatada não isquêmica, foi utilizado o cloridrato de doxorrubicina. Os animais receberam, semanalmente, uma dose de $2\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ nas primeiras duas semanas e $3\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ nas últimas duas semanas, obtendo uma dose acumulativa de $10\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Os coelhos foram sedados com midazolam ($2\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) e quetamina ($10\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) pela via IM e, após, foi realizada venóclise na veia marginal da orelha, onde foi acoplado um equipo macrogotas ao frasco de solução de cloreto de sódio 0,9%¹⁹. Os coelhos foram acondicionados em caixas de polipropileno medindo 49x34x16cm (Figura 8).

¹⁹ Cloreto de Sódio a 0,9%, Indústria Farmacêutica Basa Ltda, Caxias do Sul – RS, Brasil.

Figura 8 – Coelho Nova Zelândia acondicionado em caixa de polipropileno durante aplicação de doxorrubicina, pela via intravenosa, para indução de cardiomiopatia dilatada.



A doxorrubicina foi diluída em 25mL de solução de cloreto de sódio 0,9% em capela, obtendo a concentração de 2%. Após o cálculo da dose para cada coelho, a doxorrubicina foi diluída novamente em 15mL de solução de cloreto de sódio 0,9%, na própria seringa, obtendo um volume final de 20mL. Este volume foi administrado pela via intravenosa (IV), onde aplicou-se 5mL a cada cinco minutos.

Este procedimento foi realizado no Setor de Oncologia do HCV-UFRGS, sendo utilizadas as medidas especiais relacionadas à biossegurança, como gorro, máscara e luvas, além do material ter sido devidamente descartado.

4.4 Procedimento Anestésico

Para realizar o procedimento cirúrgico, os coelhos foram escolhidos aleatoriamente e receberam como medicação pré-anestésica a associação de cloridrato

de petidina ($3\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)²⁰, midazolam ($0,7\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) e quetamina ($14\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) IM. Decorridos 10 minutos, realizou-se a tricotomia na região torácica esquerda e, após procedeu-se a indução anestésica com isoflurano na máscara. Antes de realizar a intubação, foi instilado 0,2ml de lidocaína 2% sem vasoconstritor²¹, na entrada da glote e seguiu-se com o anestésico volátil até atingir o relaxamento suficiente para permitir a intubação orotraqueal, sendo geralmente utilizado o tubo de número 2,5 ou 3,0 sem balonete.

O método de intubação realizado manteve o animal suspenso com o pescoço em sentido vertical, onde o tubo foi introduzido no momento da expiração. O tubo traqueal foi fixado com atilho que passava atrás das orelhas. Logo após a intubação orotraqueal, foram coletados 11mL de sangue de cada coelho na artéria central da orelha, sendo 10mL para o preparo do PRP e 1ml para avaliação da troponina I. Em seguida, o animal foi colocado em decúbito lateral direito para realização da antisepsia com solução de clorexidine 0,5%.

Todos os animais foram acompanhados com auxílio de um monitor multiparamétrico, que registrou a frequência cardíaca e respiratória, capnometria e oximetria durante o trans-operatório. Em quatro animais foram realizadas monitorações com eletrocardiograma.

4.5 Preparação do PRP

Após a coleta de 11mL de sangue da artéria central da orelha, 10mL deste sangue foi destinado à preparação do PRP, sendo colocado em dois frascos contendo citrato de sódio. O sangue foi encaminhado para Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular do HCPA, onde foi transferido para um tubo tubo plástico, estéril, fundo cônico, de 15mL em capela de fluxo laminar para, em seguida, ser centrifugado a 300G durante 10 minutos. Esta primeira centrifugação promoveu a separação das células vermelhas que, por terem um peso específico maior, depositam-se na parte inferior do tubo. Na parte superior permanece o plasma com as plaquetas e

²⁰ Cloridrato de Petidina, União Química, São Paulo – SP, Brasil.

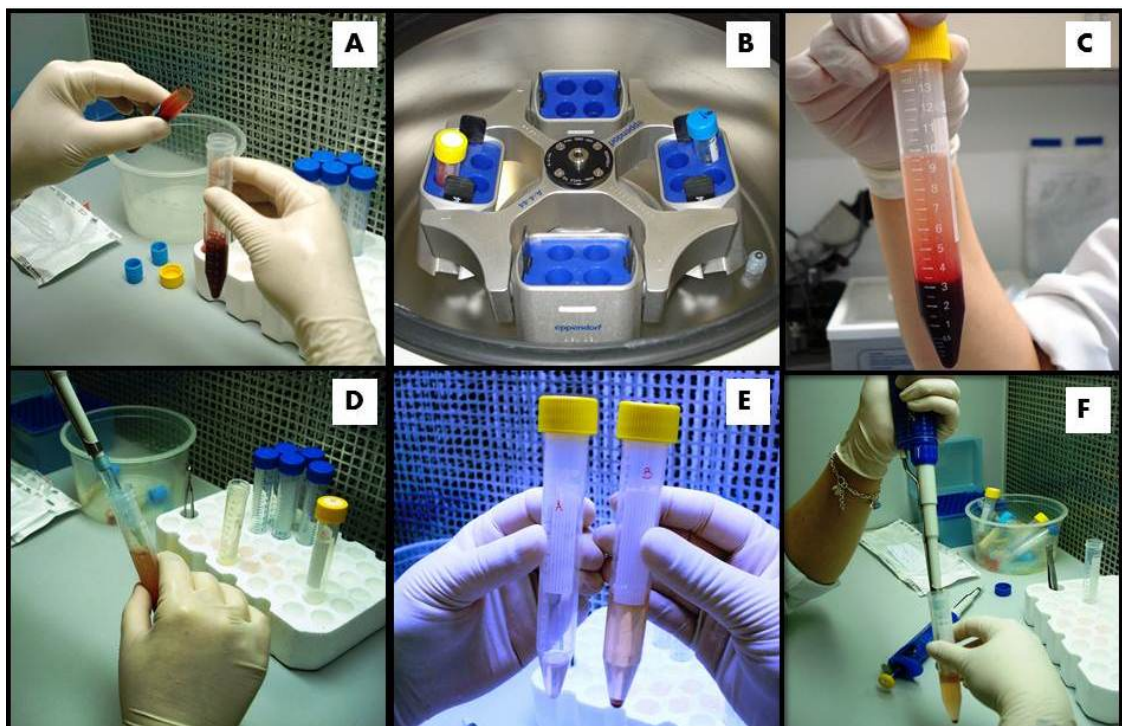
²¹ Lidocaína 2% sem vasoconstritor, Ariston Indústrias Químicas e Farmacêuticas, São Paulo – SP, Brasil.

trombina e, entre estas duas camadas, fica outra camada fina e esbranquiçada, denominada de zona de névoa, que contém os leucócitos e as plaquetas maiores.

Com uma pipeta graduada foram colhidos 500 μ L da camada superior do plasma e colocados em um tubo plástico, estéril, com fundo cônico de 15mL denominado de tubo A, sendo adicionado 150 μ L de gliconato de cálcio. Esta parte foi usada para fornecer a trombina autógena. Em outro tubo plástico, estéril, com fundo cônico de 15mL, denominado B, foi colocado o restante do plasma da camada superior e a zona intermediária (zona de névoa). Ambos os tubos foram centrifugados à 640G durante 10 minutos.

Após a centrifugação, descartou-se metade do conteúdo do tubo B, homogeneizando-se o volume restante. Em um outro tubo plástico, estéril, com fundo cônico de 15mL, denominando C, coletou-se com uma pipeta 2mL do volume do tubo B e 1mL do tubo A, formando uma proporção 2:1 (2mL de PRP: 1mL de trombina) (Figura 9).

Figura 9 – Sequência da preparação do PRP. (A) Transferência do sangue do tubo com citrato para um tubo plástico, estéril, com fundo cônico de 15mL; (B) primeira centrifugação; (C) tubo plástico, estéril, com fundo cônico de 15mL após a primeira centrifugação; (D) separação do plasma em dois tubos; (E) tubos A e B após a segunda centrifugação; (F) transferência das alíquotas do tubo A e B para formação do tubo C.



Em um microtubo colocou-se 1mL do volume do tubo C. Nesta etapa, o PRP, acrescido ou não das MSCs, foi encaminhado de volta à UEA para sua utilização no miocárdio.

O protocolo do PRP foi baseado em DeRossi et al. (2009) e foi utilizada a centrífuga da marca Eppendorf modelo Centrifuge 5804R.

4.6 Procedimento Cirúrgico

4.6.1 Procedimentos Pré-Operatórios

Antes do início dos procedimentos cirúrgicos, os equipamentos utilizados para toracoscopia foram esterilizados por submersão em solução de glutaraldeído 2%²² pelo tempo mínimo de 30 minutos, sendo, após este período, lavados com solução salina estéril de cloreto de sódio a 0,9%. O monitor endoscópico foi colocado no lado da cabeça do coelho e à esquerda, em relação ao cirurgião (Figura 10).

Figura 10 – Posicionamento dos equipamentos na sala cirúrgica.



²² Glutaron, Indústria Farmacêutica Rioquímica, São Paulo – SP, Brasil.

Os equipamentos e instrumentais de vídeo cirurgia utilizados neste experimento são pertencentes à UEA e constaram de: uma fonte de luz xênon de 300W²³, um cabo de iluminação²⁴, uma microcâmera com processador²⁵, um monitor de vídeo²⁶, um endoscópio rígido²⁷ de 4mm e ângulo de visão de 30° e um trocarte²⁸ de 5mm.

4.6.2 Toracosopia Video-Assistida

Após o posicionamento do animal, antissepsia e colocação do campo plástico estéril, o acesso da cavidade torácica foi efetuado com uma incisão de pele e tecido subcutâneo de aproximadamente 0,5cm no sexto espaço intercostal esquerdo, 5cm ventral à região costovertebral. Realizou-se uma divulsão roma da musculatura e com um trocarte de 5mm, efetuou-se a perfuração da pleura introduzindo-se, na sequência, o endoscópio rígido.

Após a introdução do endoscópio, a cavidade foi inicialmente inspecionada e, em seguida, posicionada a ótica para a visualização do ventrículo esquerdo e seu ápice. No quarto espaço intercostal, entre a junção costochondral e esternal, introduziu-se uma agulha hipodérmica 13x4mm acoplada á uma seringa de 1mL contendo a terapia de acordo com cada grupo. Foi escolhida a área da parede do ventrículo esquerdo menos vascularizada, entre os ramos coronarianos descendentes principais, para única aplicação da terapia no miocárdio.

A incisão foi suturada com ponto Sultan e fio mononáilon 3-0 e com ponto isolado simples na pele com o mesmo fio (Figura 11). A pressão negativa intratorácica foi restabelecida utilizando-se um cateter 22G acoplado em uma torneira de três vias e uma seringa de 20mL.

²³ Fonte de luz xênon, Nova 175, 20131520, Karl Storz-endoskope.

²⁴ Cabo de luz, Karl Storz-endoskope.

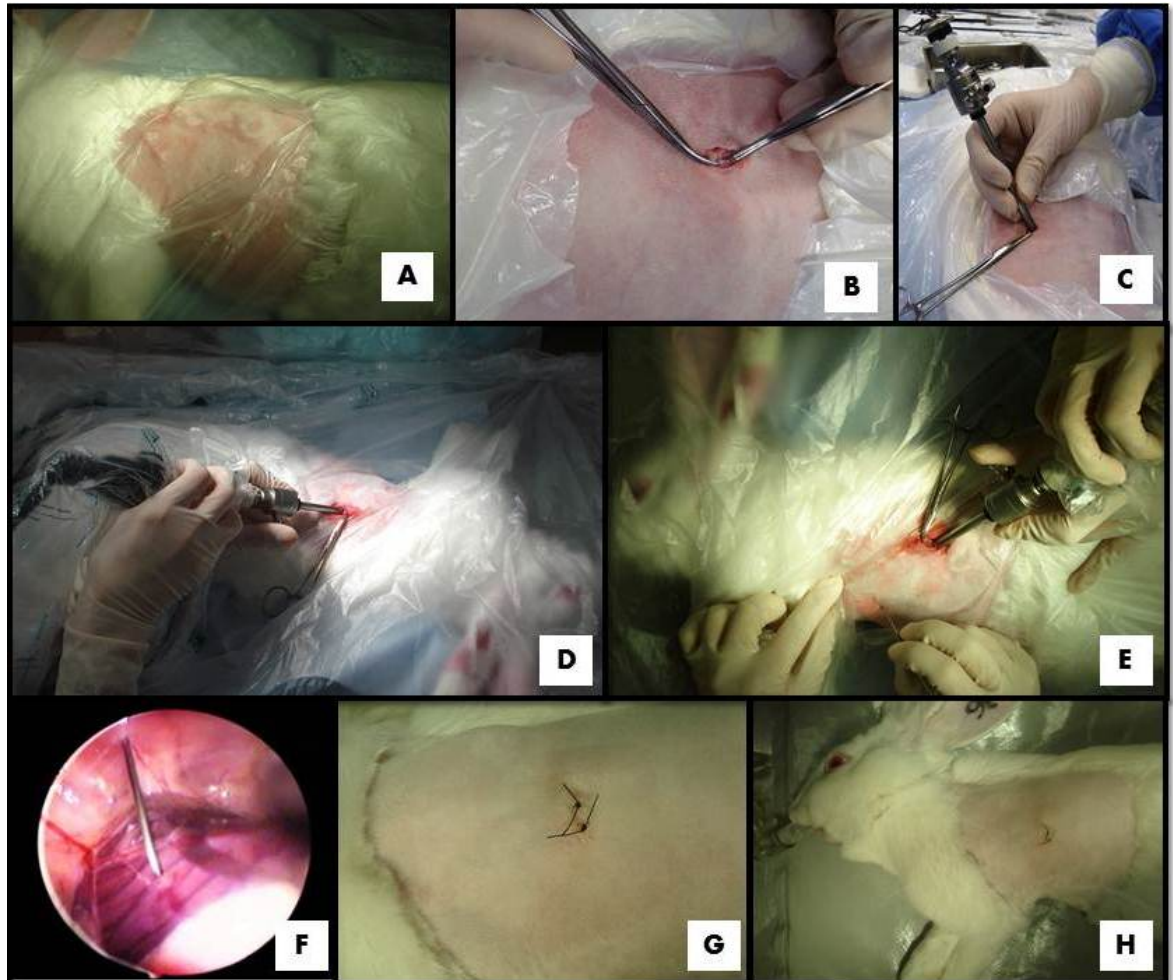
²⁵ Microcâmera XL 20280020, Karl Storz-endoskope.

²⁶ Monitor Philips.

²⁷ Endoscópio rígido, Karl Storz-endoskope.

²⁸ Cânula EndoTIP, Karl Storz-endoskope.

Figura 11 – Sequência do procedimento cirúrgico. (A) Posicionamento do coelho na mesa; (B) divulsão da musculatura no sexto espaço intercostal; (C) perfuração da pleura com um trocar de 5mm; (D) introdução do endoscópio rígido na cavidade torácica; (E) introdução da agulha hipodérmica 13x4mm no quarto espaço intercostal; (F) visualização endoscópica da introdução da agulha no miocárdio do ventrículo esquerdo; (G) aspecto final da sutura de pele; (H) aspecto final do tamanho da ferida cirúrgica.



4.7 Procedimentos Terapêuticos

4.7.1 Grupos

Os coelhos foram distribuídos em dois grupos: tratado com doxorrubicina e o não tratado com doxorrubicina (controle). Cada grupo foi subdividido em quatro subgrupos contendo cinco coelhos cada, totalizando 40 coelhos. Os tratamentos dos subgrupos foram realizados com células-tronco mesenquimais ressuspensas em PRP, somente PRP, células-tronco mesenquimais ressuspensas em meio de cultura e solução salina estéril de cloreto de sódio a 0,9% (Tabela 1).

Tabela 1 - Representação dos grupos de acordo com cada implante recebido.

Grupo tratado com doxorrubicina	Grupo não tratado com doxorrubicina
MSCs+PRP	MSCs+PRP
PRP	PRP
MSCs	MSCs
Solução fisiológica	Solução fisiológica

Os animais dos subgrupos MSCs associado com PRP receberam as células ressuspendidas em 1mL de PRP, e o número de MSCs utilizado foi na ordem de 10^6 céls./animal. Os subgrupos PRP receberam somente 1mL deste.

Os animais do subgrupo MSCs, receberam estas células ressuspendidas em 1mL de meio de cultura. E os subgrupos da solução fisiológica (SF), receberam 1mL de solução salina estéril de cloreto de sódio a 0,9%.

As MSCs e o PRP foram preparados no Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular do HCPA, e suas alíquotas foram transportadas em um microtubo. Estas alíquotas foram imediatamente transferidas para uma seringa de 1mL acoplada em uma agulha hipodérmica 13x4mm e em seguida implantadas no miocárdio do ventrículo esquerdo.

4.8 Procedimentos Pós-Operatórios

No pós-operatório imediato todos os animais foram monitorados e aquecidos até extubação e medicados com cloridrato de tramadol (3mg.kg^{-1}) via SC e enrofloxacina (10 mg.kg^{-1}) via IM. Após a extubação, os animais foram colocados em incubadoras aquecidas e oxigenadas até sua completa recuperação, sendo, colocados de volta em suas gaiolas (Figura 12).

Figura 12 – Coelhos em incubadoras durante a recuperação anestésica do pós-operatório imediato.



A aplicação de cloridrato de tramadol foi mantida em intervalos de 12 horas e a enrofloxacina a cada 24 horas, ambos durante 72 horas. Os animais foram observados diariamente para avaliar se presença de dor e o padrão respiratório, além da ferida cirúrgica.

4.9 Avaliação Cardiológica Pós-Transplante

4.9.1 Avaliações Ecocardiográficas e Eletrocardiográficas

Quinze dias após o transplante da terapia celular, conforme cada grupo, foram realizados novos exames ecocardiográficos e de eletrocardiograma nos coelhos. Estes foram sedados com midazolam ($2\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) e quetamina ($10\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) IM antes dos exames, sendo realizada tricotomia em região pré-cordial, quando necessário.

4.9.2 Avaliação Troponina I

Após quinze dias do transplante celular, foi coletado 1ml de sangue dos coelhos na artéria central da orelha. Este material foi avaliado no Setor de Patologia Clínica do HCPA, onde foi utilizado o soro e analisado pela técnica de enzimaímunoenensaio fluorimétrica com o *kit Opus Plus* da Boehringer Diagnóstica.

4.10 Eutanásia

Ao término dos quinze dias do período de avaliação, todos os coelhos foram eutanasiados. Os animais foram sedados previamente com cloridrato de quetamina (15mg.kg^{-1}) e midazolam (3mg.kg^{-1}) IM e, após 10 minutos, realizou-se a venóclise na veia marginal da orelha com cateter tamanho 24, para aplicação intravenosa do propofol até a parada respiratória, seguida da administração do cloreto de potássio, pela mesma via, até a parada cardíaca.

Tal procedimento foi realizado seguindo as normas para morte dos animais estipuladas pela CEUA. Após o procedimento de eutanásia, os coelhos foram levados ao Setor de Patologia Animal da FAVET da UFRGS, onde foram realizadas as necropsias.

4.11 Avaliação Macroscópica

Os animais foram submetidos a exame de necropsia pelo Setor de Patologia Animal da FAVET/UFRGS. Coração e fragmentos de todos os órgãos foram coletados e fixados em formalina tamponada a 10%.

4.12 Avaliação Microscópica

Os fragmentos dos órgãos coletados foram fixados em formalina tamponada a 10% por 24 horas e, após, foram processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina e corados pelas técnicas Hematoxilina-Eosina. O material foi examinado em microscópio óptico.

Os corações foram analisados levando-se em consideração a vacuolização do sarcoplasma dos cardiomiócitos, necrose das miofibras e presença de fibrose, sendo realizada, através dessas lesões, uma análise histológica quantitativa.

4.13 Análise Estatística

Para responder aos objetivos do estudo, as medidas de eletrocardiograma, ecocardiograma e peso foram descritos segundo grupos e tratamentos ao longo dos momentos de avaliação e comparados entre os fatores de interesse com uso de análises de variâncias (ANOVA) com três fatores e medidas repetidas supondo matriz de correlações componente simétrica entre os momentos. A troponina foi comparada entre tratamentos e momentos com uso de ANOVA com dois fatores e medidas repetidas supondo estrutura de correlação componente simétrica entre os momentos. As análises estatisticamente significativas foram seguidas de comparações múltiplas de Tukey para verificar entre quais fatores dois a dois ocorrem as diferenças.

O resultado da histologia foi descrito segundo tratamentos nos coelhos doentes e comparados entre os tratamentos com uso de teste Kruskal-Wallis seguido de comparações múltiplas não paramétricas para comparar os tratamentos dois a dois.

Os resultados foram descritos com uso de gráficos de perfis médios com os respectivos erros padrões e os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Mortalidade

Durante o experimento foram perdidos oito animais. Três coelhos foram á óbito durante a fase de indução da cardiomiopatia com o uso da doxorubicina e levados para o Setor de Patologia Animal da FAVET/UFRGS, para a realização das necropsias. Foi constatado que estes animais continham áreas de hemorragia em alguns órgãos, como timo e útero e, também, apresentaram hipoplasia de medula óssea.

Outros cinco coelhos foram á óbito durante o procedimento cirúrgico. Um destes animais apresentou choque hipovolêmico devido à hemorragia por lesão iatrogênica de um ramo da coronária descendente. Os demais quatro coelhos apresentaram parada respiratória seguida de parada cardíaca no período de recuperação anestésica.

5.2 Coleta de Tecido Adiposo para Obtenção das MSCs

A coleta do tecido adiposo de coelho foi realizada facilmente a partir de uma incisão de pele até o subcutâneo na região cervical dorsal. Esta região possui fácil acesso e grande quantidade de tecido adiposo.

5.3 Indução da Cardiomiopatia Dilatada pela Doxorubicina

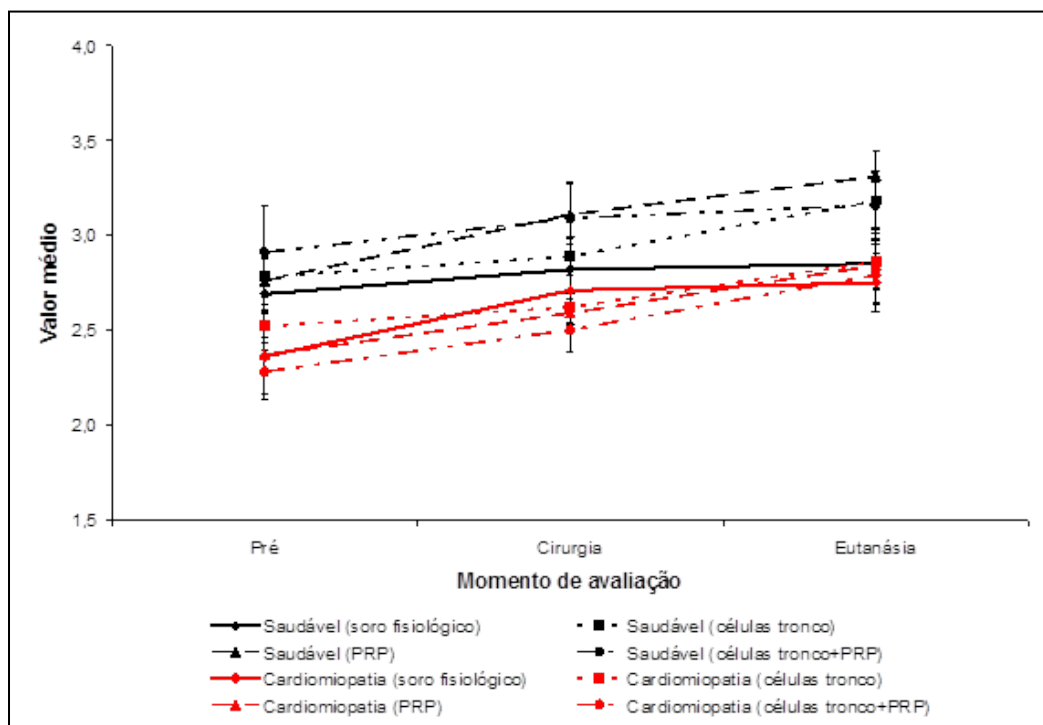
A indução da cardiomiopatia pela doxorubicina foi confirmada pelo aumento da troponina sérica e pelas análises histopatológicas dos animais que foram á óbito durante o experimento, pois apresentavam alterações cardíacas relativas ao uso da doxorubicina.

5.4 Peso dos Animais

A análise estatística sugere que houve aumento dos pesos dos coelhos ao longo das avaliações. Este foi menor nos animais com doença induzida quando comparado aos

coelhos saudáveis em todos os momentos. Não houve diferença estatística em relação aos tratamentos do grupo doente, entretanto, nota-se que os coelhos que receberam MSCs possuíram os pesos maiores no final do experimento, seguidos dos subgrupos MSCs associadas ao PRP, somente PRP e, por último, solução fisiológica (Figura 13).

Figura 13 - Perfis médios dos pesos e respectivos erros padrões segundo grupos e tratamentos.



A Tabela 2 demonstra que o peso médio dos coelhos com cardiomiopatia foi estatisticamente menor que nos coelhos saudáveis em 363g ($p < 0,001$) independente do tratamento ou do momento de avaliação. O peso médio dos coelhos diminuiu estatisticamente a cada momento avaliado ($p < 0,05$) em todos os grupos ou tratamentos.

Tabela 2 - Resultado das comparações dos pesos entre os grupos e momentos.

Grupo/Momento	Diferença média estimada	Erro padrão	gl	Valor t	P
Saudável – CMD	0,363	0,084	32	4,34	<0,001
Pré – Cirurgia	-0,208	0,037	64	-5,66	<0,001
Pré – Eutanásia	-0,384	0,037	64	-10,47	<0,001
Cirurgia – Eutanásia	-0,176	0,037	64	-4,81	<0,001

5.5 Procedimento Anestésico

O protocolo anestésico empregado nos animais mostrou-se adequado para o procedimento cirúrgico, haja visto a morte de apenas quatro animais, representando 8,16% dos óbitos. A recuperação pós-operatória dos coelhos foi excelente e rápida após a suspensão do anestésico volátil, assim como a analgesia, podendo-se constatar regresso às suas atividades logo que retornavam para seu alojamento.

A utilização do método para intubação também foi eficiente e de fácil realização, isso devido à prática do anestesista.

5.6 Plasma Rico em Plaquetas

No início do experimento observou-se uma dificuldade para coletar um grande volume de sangue dos coelhos, o que foi amenizado subsequentemente. A artéria da orelha demonstrou ser um local propício para a coleta. Para realização desse procedimento, o coelho ficou sedado para uma melhor manipulação e facilitar a coleta.

O protocolo utilizado para obtenção do PRP foi baseado em Derossi et al. (2009), que utiliza o PRP ativado em forma de gel. Como o interesse neste experimento foi utilizar o PRP ativado em forma líquida, o procedimento do preparo do PRP e sua aplicação tiveram que ser mais rápida, para evitar a gelificação do PRP.

Em sete animais foram analisadas as plaquetas no plasma e no PRP, obtendo-se uma média de incremento de 3,3 vezes.

5.7 Procedimento Cirúrgico

Neste tópico, a escolha do modelo experimental se demonstrou mais propício para a manipulação cirúrgica minimamente invasiva vídeo-assistida para o acesso cardíaco, por ser um animal de porte maior quando comparado ao rato e camundongo.

A escolha do sexto espaço intercostal esquerdo, 5cm ventral à região costochondral, para a introdução do endoscópio, permitiu uma boa visualização do lado esquerdo do coração e suas coronárias. Havendo somente um óbito no trans-operatório devido à passagem da agulha hipodérmica em uma coronária.

Pode-se observar que após o procedimento cirúrgico, os coelhos obtiveram uma rápida recuperação e retorno das suas atividades, não apresentando dor no local do procedimento, devido à analgesia e ao tamanho pequeno da ferida cirúrgica. Esta ferida proporcionou uma rápida cicatrização com menores cuidados no pós-operatório, também devido à sua pequena extensão.

5.8 Procedimentos Terapêuticos

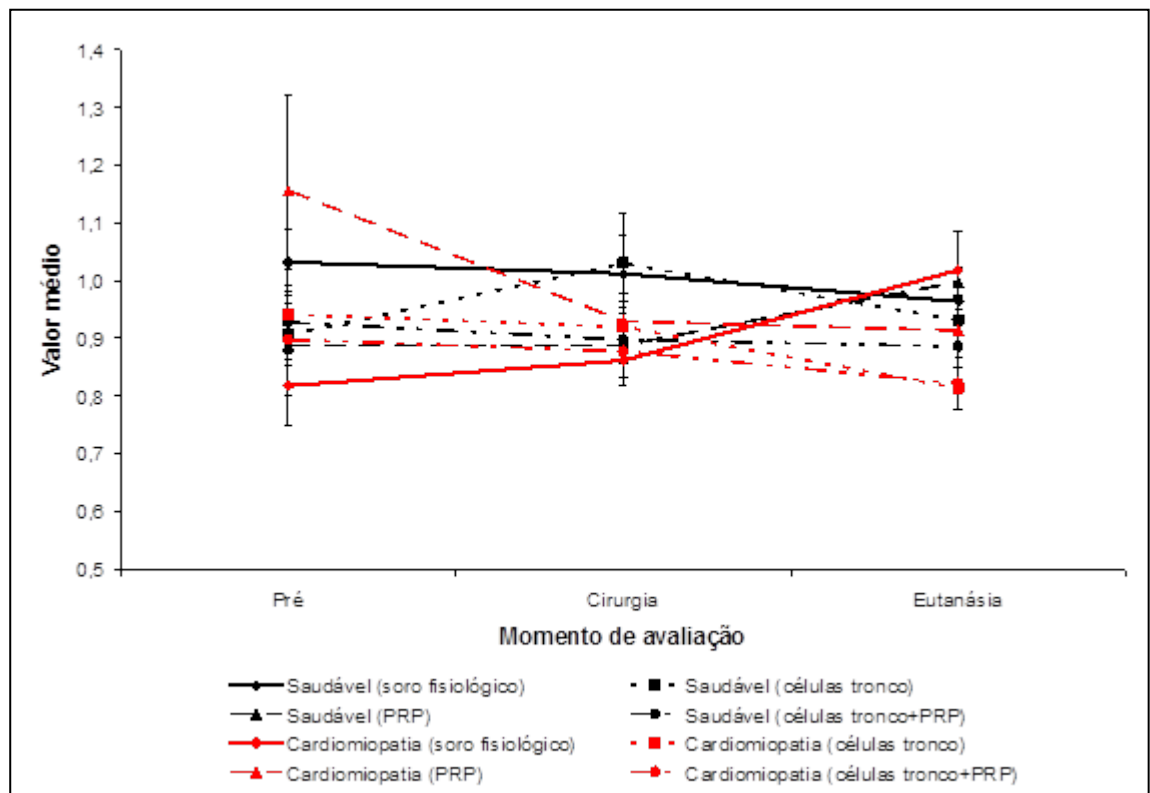
Com relação à aplicação dos diferentes tratamentos pode-se concluir que todas as administrações utilizando uma seringa de 1mL e agulha 13x4mm foram eficientes. As soluções terapêuticas, no mesmo instante em que chegaram do Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular do HCPA para a sala cirúrgica da UEA, foram imediatamente aplicadas no coração para que não ocorresse morte celular, tanto no PRP como nas MSCs. Porém, devido à consistência viscosa do PRP e PRP com MSCs, aumentou-se a cautela no momento de suas aplicações para não gelificar o PRP.

Outro cuidado que se observou referente à aplicação, foi evitar o sangramento em demasia para não ocorrer perda do material, escolhendo, para isso, a área menos vascularizada do coração.

5.9 Resultados Estatísticos Ecocardiográficos

A Figura 14 sugere que, conforme o grupo e tratamento, o resultado do VEs varia ao longo dos momentos avaliados. Nota-se que o subgrupo solução fisiológica do grupo doente obteve um aumento do VEs no dia da eutanásia e, nos demais subgrupos, o VEs diminuiu.

Figura 14 - Perfis médios do VEs e respectivos erros padrões segundo grupos e tratamentos.



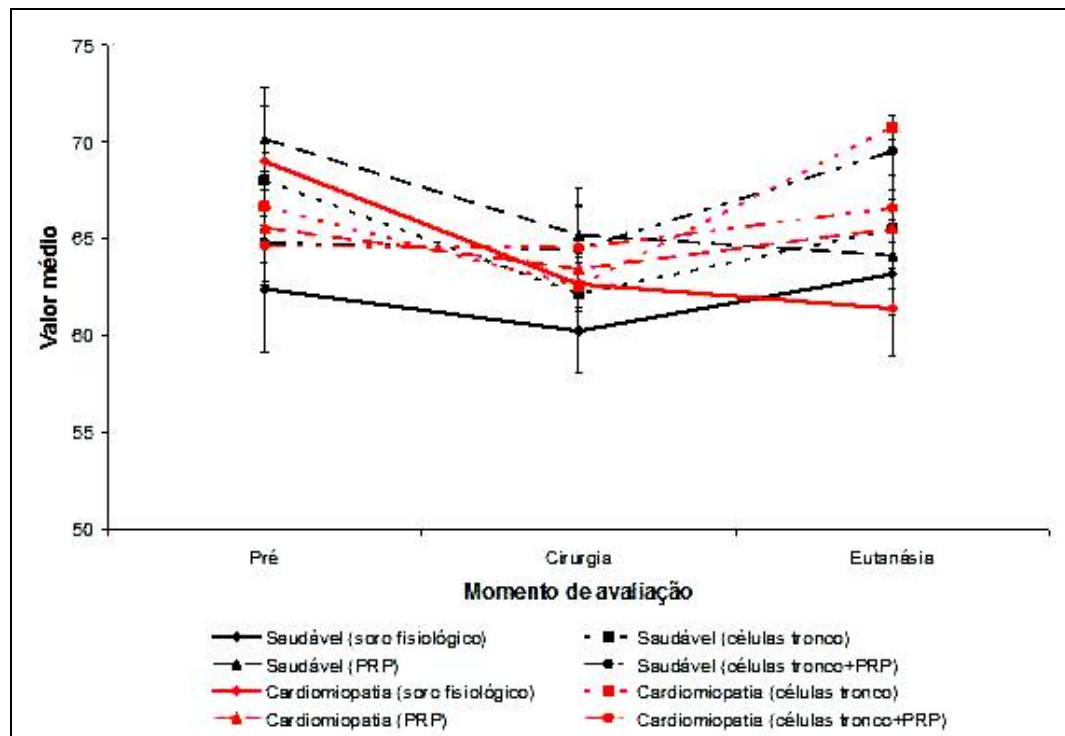
Observa-se na Tabela 3 que o valor médio de VEs é estatisticamente maior no momento da pré-indução nos coelhos doentes, em que foi aplicado PRP, em comparação aos coelhos em que foi aplicada solução salina isotônica ($p=0,016$). Já as demais diferenças médias encontradas foram entre grupos diferentes em tratamentos diferentes e momentos diferentes. Nas demais combinações entre grupos, tratamentos e momentos, o valor médio de VEs é estatisticamente igual ($p>0,05$).

Tabela 3 - Resultado das comparações do VEs entre os fatores que apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

Grupo/Tratamento/Momento	Diferença média estimada	Erro padrão	GI	Valor t	P
CMD SF (Pré)-CMD PRP (Pré)	-0,338	0,081	64	-4,18	0,016
CMD MSCs (Eutan.)-CMD PRP (Pré)	-0,342	0,081	64	-4,23	0,014
CMD PRP (Pré)-CMD MSCs+PRP (Eutan.)	0,334	0,081	64	4,13	0,019

Em relação à fração de ejeção no grupo doente, notou-se no subgrupo MSCs associadas ao PRP uma diminuição dessa variável no decorrer dos momentos. Nos demais subgrupos, houve primeiro uma leve diminuição seguido de um aumento, sendo maior no subgrupo MSCs (Figura 15).

Figura 15 - Perfis médios da FE e respectivos erros padrões segundo grupos e tratamentos.



A Tabela 4 mostra que, coelhos tratados com MSCs, no momento da eutanásia apresentaram, em média, maior FE que na cirurgia ($p=0,026$). As demais diferenças

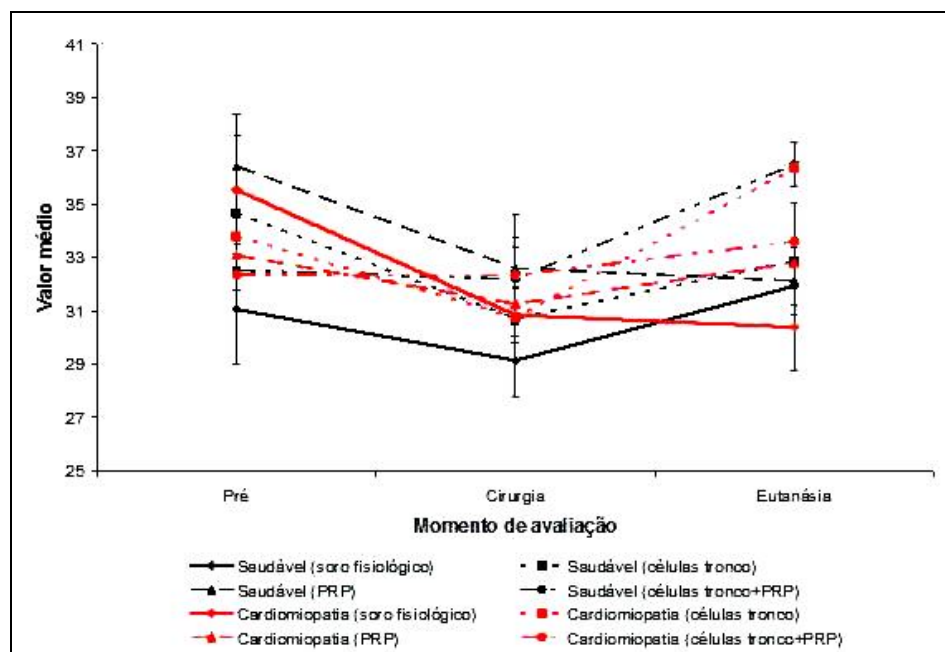
encontradas são entre grupos, tratamentos e momentos diferentes ($p < 0,05$). Nas demais combinações entre grupos, tratamentos e momentos, não há diferença média no valor de FE ($p > 0,05$).

Tabela 4 - Resultado das comparações da FE entre os fatores que apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

Tratamento/Momento	Diferença média estimada	Erro padrão	GI	Valor t	P
SF (Cirurgia)–MSCs (Eutanásia)	-6,69	1,85	64	-3,61	0,028
SF (Cirurgia)-PRP (Pré)	-6,40	1,85	64	-3,45	0,042
SF (Cirurgia)-MSCs+PRP (Eutan.)	-6,61	1,85	64	-3,56	0,031
MSCs (Cirurgia)-MSCs (Eutanásia)	-5,78	1,60	64	-3,62	0,026

Na Figura 16 observa-se que a fração FS diminuiu após a indução da cardiomiopatia com doxorrubicina e aumentou nos subgrupos MSCs, MSCs associadas ao PRP e somente PRP. Os coelhos que receberam solução fisiológica obtiveram um decréscimo da FS nos três momentos do estudo.

Figura 16 - Perfis médios da FS e respectivos erros padrões segundo grupos e tratamentos.



De acordo com a Tabela 5, tem-se que as diferenças médias estatisticamente significativas encontradas nos valores de FS são entre grupos, tratamentos ou momentos diferentes, tendo, como exemplo, o valor médio de FS nos coelhos saudáveis tratados com solução fisiológica no momento da cirurgia é estatisticamente menor que nos coelhos saudáveis tratados com PRP na pré-indução ($p=0,025$). Na comparação das demais combinações entre os diferentes grupos, tratamentos e momentos, o valor médio de FS é estatisticamente igual ($p>0,05$).

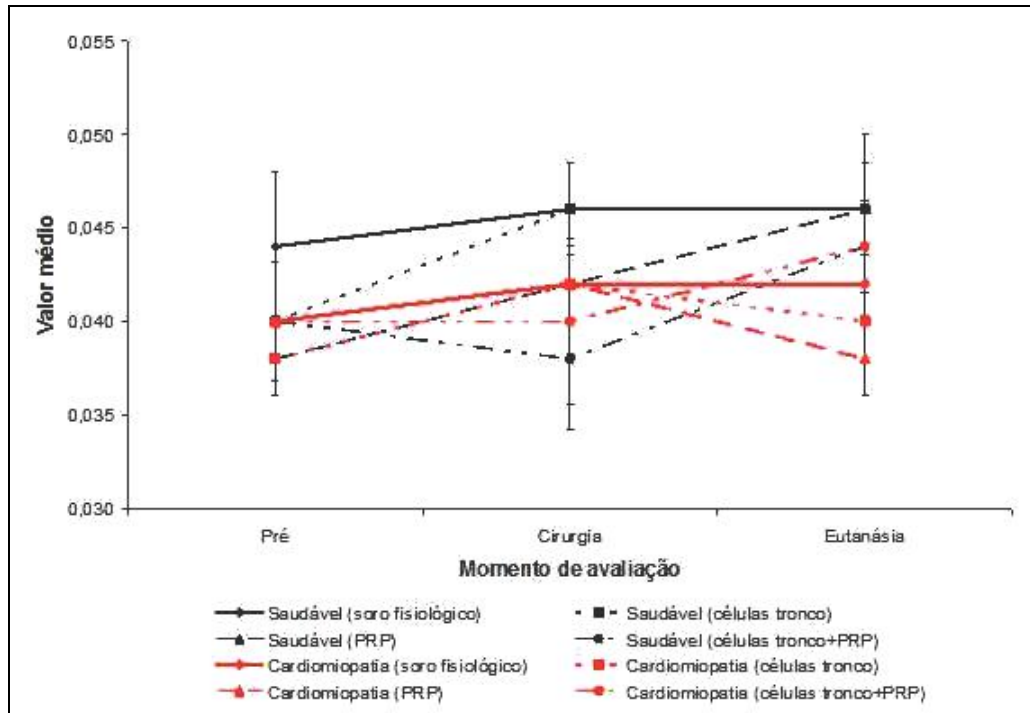
Tabela 5 - Resultado das comparações da FS entre os fatores que apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

Grupo/Tratamento/Momento	Diferença média estimada	Erro padrão	GI	Valor t	P
Saudável SF (Cirurgia)–Saudável PRP (Pré)	-7,282	1,803	64	-4,04	0,025
Saudável SF (Cirurgia)-Saudável MSCs +PRP (Eutan.)	-7,344	1,803	64	-4,07	0,023
Saudável SF (Cirurgia)-CMD MSCs (Eutan.)	-7,212	1,803	64	-4,00	0,028

5.10 Resultados Estatísticos Eletrocardiográficos

Não houve diferença estatística do segmento QRS entre os grupos saudável e doente, mas houve diferença significativa entre os momentos avaliados ($p<0,001$) nos diferentes tratamentos (Figura 17). Nota-se que houve um aumento desse segmento em todos os momentos dos subgrupos solução fisiológica e MSCs associadas ao PRP do grupo doente. Nos demais subgrupos desse grupo, houve primeiro um aumento, seguido de uma diminuição.

Figura 17 - Perfis médios do QRS e respectivos erros padrões segundo grupos e tratamentos.



A Tabela 6 mostra que o QRS médio aumenta do momento pré-indução para os demais momentos avaliados ($p < 0,05$) independente do grupo ou tratamento.

Tabela 6 - Resultado das comparações do QRS entre os momentos.

Momento	Diferença média estimada	Erro padrão	GI	Valor t	P
Pré - Cirurgia	-0,0023	0,0008	64	-2,85	0,016
Pré - Eutanásia	-0,0033	0,0008	64	-4,11	<0,001
Cirurgia - Eutanásia	-0,0010	0,0008	64	-1,26	0,420

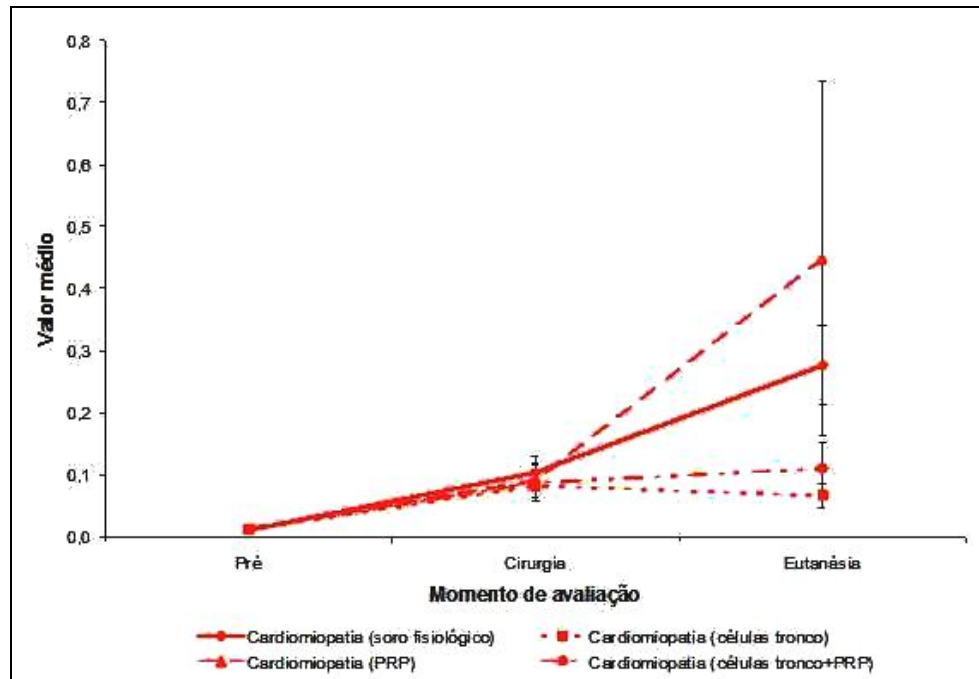
5.11 Resultados Estatísticos da Troponina I

Para avaliar a presença de lesão cardíaca, foram considerados os valores acima de $0,04 \text{ ng.mL}^{-1}$ da troponina I.

Houve aumento da troponina I em todos os momentos do grupo doente. Esse aumento foi observado em maior grau no subgrupo que recebeu somente PRP seguido do subgrupo solução fisiológica, MSCs associadas ao PRP e, por último, MSCs (Figura

18). Entretanto, essas variações não possuem significância estatística. No grupo saudável não houve variações significativas nos valores da troponina I em todos os momentos.

Figura 18 - Perfis médios da troponina I e respectivos erros padrões segundo tratamentos.



A Tabela 7 demonstra que a troponina I aumenta estatisticamente na eutanásia em comparação aos demais momentos avaliados nos coelhos doentes ($p < 0,05$).

Tabela 7 - Resultado das comparações da troponina I entre os momentos nos coelhos com cardiomiopatia dilatada induzida.

Momento	Diferença média estimada	Erro padrão	GI	Valor t	P
Pré – Cirurgia	-0,079	0,052	32	-1,51	0,302
Pré - Eutanásia	-0,213	0,052	32	-4,07	<0,001
Cirurgia - Eutanásia	-0,134	0,052	32	-2,57	0,039

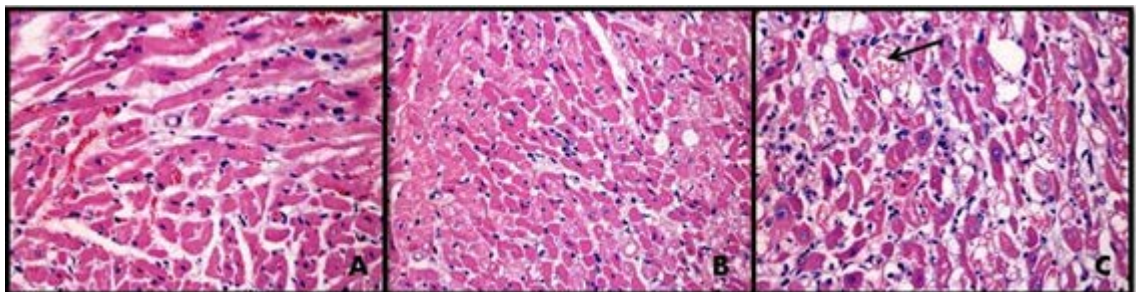
5.12 Avaliação Macroscópica

Na avaliação macroscópica, após 15 dias do procedimento cirúrgico, não foi observado qualquer alteração nos diferentes grupos experimentais.

5.13 Avaliação Microscópica

Na análise histológica, observou-se vacuolização extensa do sarcoplasma de cardiomiócitos com necrose isolada de miofibras e fibrose difusa no miocárdio do grupo doente (Figura 19). Além disso, em muitos corações do grupo doente e saudável, observou-se miocárdio com áreas de fibrose localmente extensa que foi atribuída ao trauma causado pela injeção intracárdica. Não houve lesões significativas nos miocárdios do grupo saudável, não havendo diferenças entre seus subgrupos.

Figura 19 – Análise histológica dos corações dos coelhos Nova Zelândia coradas com Hematoxilina-Eosina e em aumento de 40X. (A) Lesão miocárdica leve; (B) lesão miocárdica moderada; (C) lesão miocárdica grave. A seta mostra vacuolização do sarcoplasma em cardiomiócito.



Conforme a avaliação estatística do grupo doente, notou-se que o subgrupo tratado com PRP obteve um maior grau de lesões comparado ao subgrupo que recebeu solução fisiológica. O subgrupo que apresentou melhores resultados histológicos, foi o tratado com MSCs.

A Tabela 8 mostra que há alta diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos nos graus histológicos ($p=0,010$).

Tabela 8 - Descrição da histologia segundo os tratamentos no grupo doente e resultado do teste comparativo. O grau de lesão miocárdica está representada por cruzes, onde uma cruz representa lesão leve do miocárdio, duas cruzes lesão moderada e três cruzes lesão grave.

Histopatologia	Tratamento								Total	p	
	Soro fisiológico		Células tronco		PRP		Células tronco + PRP				
	n	%	n	%	n	%	n	%			
+	0	0,0	2	40,0	0	0,0	2	40,0	4	20,0	0,010
++	5	100,0	3	60,0	1	20,0	3	60,0	12	60,0	
+++	0	0,0	0	0,0	4	80,0	0	0,0	4	20,0	
Total	5	100	5	100	5	100	5	100	20	100	

Pela Tabela 9, tem-se que as alterações histológicas encontradas nos miocárdios dos coelhos doentes tratados com PRP é estatisticamente maior que coelhos tratados com MSCs ($p=0,007$) e coelhos tratados com MSCs associadas ao PRP ($p=0,007$).

Tabela 9 - Resultado da comparação dos graus histológicos entre os grupos dois a dois.

Comparação	Valor Z	p
SF vs MSCs	0,90	0,369
SF vs PRP	-1,80	0,072
SF vs MSCs+PRP	0,90	0,369
MSCs vs PRP	-2,70	0,007
MSCs vs MSCs+PRP	0,00	1,000
PRP vs MSCs+PRP	2,70	0,007

6 DISCUSSÃO

A escolha do modelo animal para o experimento foi uma das primeiras preocupações dos pesquisadores. A maioria das pesquisas concentra-se em três espécies de animais: coelho, rato e camundongo (COSTA et al., 2004; NASCIMENTO & MARTINS, 2005). Geralmente, ratos e camundongos são os modelos mais usados para demonstrar a cardiotoxicidade aguda e crônica da doxorrubicina (TERAOKA et al., 2000). As principais vantagens deste modelo são a simplicidade da técnica não invasiva, o baixo custo e a possibilidade de obtenção de grandes amostras em um curto período de tempo devido ao curto período gestacional (FAGUNDES & TAHA, 2004).

A decisão pelo uso do coelho foi feita devido seu maior tamanho em relação ao rato e camundongo para a realização do procedimento cirúrgico videotoracoscópico, e também por representar o modelo mais completo de cardiomiopatia crônica (NASCIMENTO & MARTINS, 2005). Utilizando uma variedade de protocolos de tratamento, numerosos laboratórios têm relatado o desenvolvimento de lesões idênticas às descritas no homem, incluindo vacuolização citoplasmática, edema intersticial e ruptura miofibrilar (HASENFUSS, 1998, O'BRIEN, 2008). No presente estudo, tais características puderam ser fielmente observadas, e o emprego do coelho como modelo para cardiomiopatia dilatada induzida pela doxorrubicina foi bem sucedido.

No entanto, o custo é um fator limitante, pois comparado a outras espécies como, por exemplo, o rato, trata-se de um modelo mais oneroso em termos de obtenção, abrigo e alimentação. Além, disso, devido ao seu tamanho, as quantidades de fármacos utilizadas são maiores (NASCIMENTO & MARTINS, 2005). Outro fator é por ser uma espécie que na natureza é presa, os animais por serem assustados, tiveram que ser sedados a cada aplicação da doxorrubicina.

A dose de indução da cardiomiopatia pela doxorrubicina foi baseada em dois artigos, Aupperle et al. (2007) e Chen et al. (2006). Os primeiros autores utilizaram uma dose de $3\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ uma vez por semana durante seis semanas e o segundo artigo utilizou a dosagem de $2\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ durante oito semanas. Como houve uma quantidade significativa de óbitos em ambos os experimentos citados nos artigos, a dose e o tempo de indução

foram adaptados para atenuar os óbitos durante este experimento. Esse objetivo foi alcançado, pois foram somente três animais a óbito durante a indução.

A indução da cardiomiopatia foi verificada através dos exames de troponina I acompanhada durante o experimento e análise de histologia nos coelhos que foram a óbito, provavelmente devido à intoxicação aguda pela doxorrubicina. Nesses coelhos, a histologia mostrou lesões no miocárdio caracterizada por degeneração vacuolar sarcoplasmática e fibrose. Silva e Camacho (2005), também citam a presença de miocitólise e atrofia de miócitos sendo características da lesão cardíaca induzida pela doxorrubicina. Outro sinal que demonstrou a intoxicação aguda nesses coelhos, foi presença de mielossupressão (SINGAL et al., 2000; SÁ et al., 2009) e, conseqüentemente, o aparecimento de hemorragias observadas em alguns órgãos, como timo e útero.

Outro fator que demonstrou a diferença entre os grupos de animais sadios e doentes foi o acompanhamento de seus pesos. Como eram animais jovens em fase de crescimento com alimentação *ad libitum*, todos apresentaram um aumento de peso. Entretanto, os animais saudáveis apresentaram um aumento maior em todos os momentos do experimento. Também foi observado um menor consumo de ração no grupo doente no decorrer da aplicação da doxorrubicina. Esse dado também é importante para avaliação da indução da CMD, pois a perda de peso, inapetência e anorexia são manifestações clínicas da CMD, assim como também, tosse, depressão, dispnéia, respiração ofegante, fadiga, síncope (DARKE et al., 2000; SISSON et al., 2004).

A escolha do tecido adiposo para a obtenção das MSCs foi realizada devido a sua alta taxa de proliferação no cultivo, realizado no Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular do HCPA e a fácil coleta. O tecido adiposo é derivado do mesênquima embrionário e contém um estroma que é isolado facilmente. Alguns estudos têm demonstrado que há um compartimento potencial de células-tronco no estroma adiposo. Esta população celular, chamada de lipoaspirado processado pode se diferenciar em células progenitores osteogênicas, adipogênicas, miogênicas e condrogênicas (PEREIRA et al., 2008; MIZUNO, 2009).

Adicionalmente, a obtenção das MSCs para posterior diferenciação em cardiomiócitos a partir do tecido adiposo foi observada por Rangappa e colaboradores

(2003). Estes autores realizaram a diferenciação das células-tronco derivadas de tecido adiposo em cardiomiócitos utilizando 5-azacitidina. As MSCs foram isoladas do tecido adiposo de coelhos da raça Nova Zelândia e cultivadas em meio com diferentes concentrações de 5-azacitidina e em diferentes intervalos de tempo. As células transformadas foram submetidas à imunocoloração para miosina, actina e troponina I. Esses pesquisadores obtiveram o resultado positivo para a diferenciação em cardiomiócito. Em menos de três semanas, essas células começaram a “bater” espontaneamente em cultura. Essas observações confirmam que MSCs isoladas de tecido adiposo podem ser quimicamente transformadas em cardiomiócitos.

A maior parte dos trabalhos conduzidos com células-tronco adultas tem seu interesse voltado para as células-tronco mesenquimais extraídas da medula óssea (PEREIRA et al., 2008). Entretanto, o tecido adiposo apresenta uma fonte acessível e abundante de células-tronco adultas. Para a colheita, o tecido adiposo requer um procedimento de lipoaspiração que é menos invasivo do que a aspiração da medula óssea (FRASER et al., 2006; WAN et al., 2008).

O local onde foi realizada a coleta do tecido adiposo, na região cervical, entre occipital e escápula, é a região onde possui o maior acúmulo de tecido adiposo no coelho, segundo Pereira et al. (2008). Esses autores também realizaram uma lipectomia em bloco na região citada.

O PRP é uma concentração autóloga de plaquetas em um pequeno volume de plasma, com a conseqüente presença de fatores de crescimento liberados por estas plaquetas, e proteínas, como a fibrina, fibronectina e vitronectina (HENDERSON et al., 2003; CROVETTI et al., 2004; MARX, 2004). É um produto que promove um forte estímulo para a cicatrização por meio de seus fatores de crescimento (MAZZUCCO et al., 2004).

Diversos autores passaram a propor a utilização do PRP, principalmente em associação com enxertos ósseos, embora ele venha sendo utilizado, também, com o objetivo de melhorar o reparo de tecidos moles (PETRUNGARO, 2001). Há poucos trabalhos relacionados ao uso de PRP em músculo, principalmente cardíaco. Sampson e colaboradores (2008) utilizaram PRP em lesões musculares e obtiveram resultados positivos. Boer et al. (2006), testaram a fibrina e plaquetas ativadas para atrair células-tronco derivadas da medula óssea para lesões vasculares, também obtendo resultados

positivos. Eles obtiveram evidências de que fatores hemostáticos, oriundos das plaquetas ativadas e fibrina, associados com lesão vascular, fornecem um microambiente propício para a re-endozelização mediada pelas células-tronco aplicadas na circulação. Adicionalmente, Nakamuta (2008) comparou o uso de células-tronco associado ou não com fibrina autóloga, e observou que o acúmulo de células-tronco transplantadas 24 horas após a isquemia foi significativamente melhorado através da utilização de polímero de fibrina como veículo das células durante a injeção via intramiocárdica. Através desses estudos, constatou-se que era possível o uso do PRP no miocárdio, optando-se pelo uso desse *scaffold*. Infelizmente, esses resultados não foram observados nos subgrupos que utilizaram PRP como terapia na CMD.

Com o protocolo utilizado no projeto, foi possível conseguir uma concentração plaquetária média de três vezes superior ao da amostra de sangue. Esta concentração é maior que a observada em outros protocolos como o de Anitua e o de Landesberg, que não conseguiram chegar a um aumento de duas vezes a concentração plaquetária no sangue do paciente, segundo verificado no trabalho de Marx (2004). Mas, foi semelhante às concentrações obtidas pelos métodos automatizados, que variam de um a quatro vezes superiores à do sangue dos pacientes (KEYV & JACOBSON, 2004). Oliveira-Filho et al. (2008) afirmaram que consideram que a concentração de plaquetas do PRP deve ser pelo menos quatro vezes maior que a concentração de plaquetas basal. Alguns estudos procuraram analisar a efetividade do PRP no sentido de potencializar o reparo, relacionando os resultados obtidos com as várias concentrações de plaquetas empregadas. Resultados tem mostrado que a efetividade do PRP pode seguir padrão concentração-dependente, ou seja, concentrações muito altas teriam efeito prejudicial (WEIBRICH et al., 2004).

Foi averiguado que o método utilizado é de fácil reprodução e aplicação, desde que executado por uma pessoa treinada. Sua preparação demora cerca de 45 minutos, após a coleta do sangue. Vendramim et al. (2006), referem que o treinamento de pessoal é a condição específica para ser possível a aplicação rotineira do método e, passado este momento inicial de aprendizado e ajuste, a expectativa é de melhoria nos resultados obtidos e, possivelmente, aplicabilidade em outras situações.

Em relação ao procedimento cirúrgico, não houve conversão para toracotomia em quaisquer dos casos. O tempo médio de cirurgia variou de 30 minutos inicialmente e

decreceu para 15 minutos posteriormente. Este decréscimo no tempo da cirurgia é decorrente da experiência adquirida pelo cirurgião e sua equipe. Poffo et al. (2009) também relatam a diminuição do tempo cirúrgico conforme a familiaridade e domínio da técnica minimamente invasiva.

Outras vantagens observadas nos animais utilizados neste experimento é o rápido retorno de suas atividades, sem demonstração de dor e a presença de poucos pontos e conseqüente pequena área cicatricial. Vários trabalhos sobre cirurgia cardíaca minimamente invasiva videoassistida têm demonstrado que, quando comparada à toracotomia, é um procedimento seguro e está associado a menor morbidade: menos dor pós-operatória, menor sangramento, tempo de extubação, permanência em UTI e internação hospitalar mais curtos e retorno às atividades mais rapidamente (MODI et al., 2008; POFFO et al., 2009). Outros pontos positivos são a menor incidência de infecção (FORTUNATO JÚNIOR et al., 2008), a diminuição das complicações das feridas cirúrgicas (VENTURA et al., 2009) e conseqüentemente o aspecto estético e a satisfação do paciente decorrente da redução do trauma cirúrgico (DUHAYLONGSOD, 2000).

Em relação à neuroalgia da toracoscopia, CHAN e colaboradores (2001) observaram que as taxas de incidência de neuroalgia pós-operatória são baixas em relação à toracotomia convencional, pois o trauma de acesso é minimizado pela abordagem, já que os pontos de incisão são muito pequenos, o tempo de internação dos pacientes é menor, portanto mais econômico.

Em relação à função respiratória, os coelhos apresentavam normopneia após recuperação completa da anestesia. Isto está de acordo com os achados de Kaseda et al. (2000), que consideraram o prognóstico da função pulmonar depois da videotoracoscopia muito mais favorável em comparação com a toracotomia.

Esta técnica demonstrou ser efetiva à abordagem cardíaca desejada para a aplicação das células mesenquimais. Conseguiu-se uma boa visualização do ventrículo esquerdo fornecendo segurança na introdução da agulha no miocárdio. Diversos procedimentos cirúrgicos têm sido propostos como alternativas ao transplante cardíaco para fornecer tratamento para pacientes com cardiomiopatia dilatada (FERNANDES et al., 2010).

KALIL et al. (2008) também descrevem uma técnica de toracotomia minimamente invasiva para acesso ao coração em pacientes com cardiomiopatia dilatada. Relatam que o transplante de células mononucleares de medula óssea no miocárdio através de sua técnica foi segura, bem tolerada e associada à inicial melhora clínica, expressada pela de melhor capacidade funcional ventricular no período do pós-operatório imediato. Também referem vantagens neste método de transplante celular como: aplicação no miocárdio sob visão direta, que permite a injeção precisa e segura; baixa complexidade e baixo custo, tornando-o disponível para quase todos os centros de cirurgia cardíaca; e dispersão mínima de solução celular.

A escolha pela injeção intramiocárdica se deve ao método mais popular de infusão de células dentro do coração. Ela tem grande importância em casos de cardiopatia devido à habilidade de entregar as células seletivamente dentro do tecido miocárdico, tanto em áreas normais quanto em infartadas. Esta via é passível de se infundir células e possui eficiência na distribuição das mesmas corroborando as afirmações de Suzuki et al. (2001).

Adicionalmente, Nakamuta (2008) avaliou o transplante de células-tronco em ratos que foram induzidos infarto do miocárdio através de quatro vias de administração: intravenosa, intracavitária, intracoronariana e intramiocárdica. Foi observado que os animais que receberam células-tronco diretamente no miocárdio mostraram maior retenção cardíaca dessas células.

Pouco se tem estudado com relação à falência global do coração, mais especificamente com a cardiomiopatia dilatada não isquêmica. Ainda pouco se sabe sobre o efeito do transplante de tipos celulares com potencial regenerativo neste tipo de doença (YOO et al., 2000). Por este motivo buscou-se avaliar a ação das MSCs enxertadas no miocárdio.

No presente experimento, pode-se comprovar que o efeito das MSCs no coração com CMD induzida com doxorruibina foi positivo. Foi observado que o subgrupo que recebeu MSCs obteve os melhores resultados quando comparado aos demais subgrupos. Esse resultado também foi observado por Zhang e colaboradores (2005). Esses autores avaliaram o transplante autólogo de MSCs na cardiomiopatia dilatada induzida pela doxorubicina, em 32 coelhos, sendo que em 18 foram transplantadas células mesenquimais, em outros 18 feita injeção de meio e em outros seis coelhos foram

apenas realizada a toracotomia, sem a indução de cardiomiopatia. Os 32 coelhos que receberam a doxorubicina foram por injeção intravenosa, na dose de 1mg.kg^{-1} duas vezes por semana durante oito semanas. O transplante ocorreu três semanas após a última injeção, sendo o número total de células transplantadas na ordem de 10^6 . Os resultados funcionais ecocardiográficos para o grupo transplantado demonstraram ser benéficos para este grupo, sendo significativo para a fração de ejeção e para a pressão sistólica do ventrículo esquerdo, quando comparados ao grupo controle.

Vários mecanismos de perda celular podem influenciar na permanência dessas células no órgão-alvo, incluindo problemas técnicos associados com a via de administração, o fluxo passivo através do sistema vascular coronariano e linfático e a morte celular (MÜLLER-EHMSEN et al., 2002; DOW et al., 2005; YASUDA et al., 2005). Por meio desses argumentos, buscou-se estratégias que objetivassem a melhorar a retenção e sobrevivência das células transplantadas. Com isso, testou-se neste experimento o uso de PRP associada às MSCs, para promover uma ação de *scaffold* do PRP em relação às MSCs transplantadas. Entretanto, os resultados obtidos referentes ao reparo tecidual nesta pesquisa, não foram promissores com essa associação no miocárdio com CMD.

O PRP utilizado foi o ativado e associado ao plasma pobre em plaquetas (PPP), para conter trombina e plaquetas ativadas em sua composição. O objetivo da utilização da trombina era a de ativar a formação da fibrina endógena. Além do PRP também já conter a fibrina, sendo uma das proteínas constituintes. Mas não se obteve os mesmos resultados obtidos no experimento de Nakamuta (2008) que demonstrou que o polímero de fibrina aumentou mais que duas vezes a quantidade de células transplantadas que permaneceram após a injeção via intramiocárdica. Esses dados foram confirmados mediante avaliação histológica. Em adição, verificou-se a permanência das células transplantadas 30 dias após o implante, indicando que a matriz não comprometeu ou prejudicou a sobrevivência das células nem dos animais. O polímero de fibrina é uma matriz estrutural biodegradável importante para a cicatrização de tecidos lesados e tem sido demonstrado que ele melhora a sobrevivência das células-tronco transplantadas, induz a angiogênese, reduz a extensão da área de infarto e preserva a função cardíaca após o infarto do miocárdio (CHRISTMAN et al., 2004; HUANG et al., 2005).

Porém, para a confirmação da retenção celular nesse experimento, as MSCs deveriam ter sido marcadas para averiguar se houve uma maior retenção celular no órgão alvo no subgrupo PRP associado à MSCs ou somente MSCs. Apenas foi confirmada uma melhor função cardíaca nos exames de ecocardiograma e troponina I, e uma menor presença de lesões no grupo MSCs em 15 dias de avaliação, podendo obter dados diferentes em avaliações em um prazo maior. A marcação das células-tronco poderia permitir o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na regeneração tecidual e é um método auxiliar na avaliação das técnicas de implante celular (AZEVEDO et al., 2006).

Contudo, para obter melhores resultados, haveria que ter avaliações referentes à presença e diferenciação das células-tronco enxertadas e se as plaquetas ativadas realmente permaneceram ativadas no coração para agirem por meio dos seus fatores de crescimento. Messora et al. (2009) referem que é preciso considerar que as forças mecânicas demasiadamente elevadas para o preparo do PRP podem, também, ativar precocemente as plaquetas, levando à liberação dos fatores de crescimento e conseqüentemente à perda deles no plasma sobrenadante durante o processo de centrifugação,

O ecocardiograma é um método de diagnóstico por imagem de grande importância na prática clínica cardiológica (GUIMARÃES et al., 2002; CAMPOS FILHO et al., 2004; ÂNGELO et al., 2007). Buscou-se aferir somente os parâmetros referentes às alterações observadas na CMD. Conforme Lobo & Pereira (2002), esse exame pode definir a magnitude de distensão das câmaras cardíacas em sístole e em diástole, bem como a diminuição da contratilidade cardíaca. Estes dois parâmetros são indicativos de CMD. Além disto, pode-se observar um aumento do diâmetro ventricular no fim da diástole e da sístole e hipocinese do ventrículo esquerdo, estando as paredes ventriculares em diástole aparentemente finas devido à dilatação das câmaras.

As frações de encurtamento e de ejeção estão diminuídas em relação com a severidade da disfunção sistólica (LOBO & PEREIRA, 2002; GUIMARÃES et al., 2002). Observou-se que houve uma leve diminuição dessas medidas durante a indução da CMD, mas não obtiveram significância estatística quando comparado seus valores ao momento da pré-indução, não caracterizando ainda uma CMD nos coelhos. Mas foi observado um aumento da FE nos subgrupos solução fisiológica, PRP e principalmente

no subgrupo MSCs, que apresentou diferença na estatística no momento após indução e após o tratamento. Na FS, seus valores aumentaram no momento após tratamento nos grupos MSCs, PRP e MSCs associado ao PRP, mas também não houve significância estatística na comparação desses momentos.

O exame eletrocardiográfico é utilizado para identificar a atividade elétrica e ritmo que está presente (GUIMARÃES et al., 2002; PÓVOA & SOUZA, 2008). Na CMD, podem aparecer alterações indicativas de dilatação atrial ou ventricular, sendo demonstradas no aumento de amplitude e duração da onda P e do QRS (LOBO & PEREIRA, 2002). Neste experimento, não houve diferença estatística do segmento QRS entre os grupos saudável e doente. Mas pode-se notar que houve um aumento desse segmento em todos os momentos dos subgrupos que receberam solução salina a 0,9% e MSCs associado ao PRP do grupo doente, o que leva a pensar em uma piora da função ventricular.

É importante ressaltar que o eletrocardiograma é inconclusivo em até 40% dos pacientes (ANTMAN et al., 1996). Por isso, torna-se necessária a utilização concomitante de outros métodos de avaliação cardíaca. Nicolau e Furtado (2011) mencionam que o surgimento de novos marcadores, basicamente troponinas e CKMB massa (“biomarcadores de necrose miocárdica”), fornecem novas evidências ao diagnóstico de patologias cardíacas. Por exemplo, muitos pacientes que seriam catalogados como portadores de angina instável passaram a receber o diagnóstico de infarto agudo do miocárdio sem supradesnível do segmento ST, já que estes biomarcadores são mais sensíveis do que as enzimas previamente utilizadas. Esta informação corrobora com os dados encontrados, pois as alterações da troponina I foram maiores que as encontradas no eletrocardiograma.

A escolha da troponina I foi feita porque esta funciona como um marcador mais sensível e mais específico de lesão cardíaca do que a troponina T (GODOY et al., 1998; SELTING et al., 2004; DE FRANCESCO et al., 2002).

Os valores de troponina I não se alteraram significativamente no grupo saudável, entretanto, houve bastante variação no grupo doente. Pode-se observar que esse biomarcador se elevou no momento da indução da cardiomiopatia com doxorubicina, caracterizando-se por ser um bom marcador para lesões miocárdicas decorrentes de quimioterápicos, conforme constado por Gupta & De Lemos (2007) e O'Brien (2008).

As variações nos resultados da troponina I, mostram que o subgrupo que recebeu somente PRP obteve os valores mais altos desse marcador após o tratamento, seguido do subgrupo solução fisiológica. Já os subgrupos tratados com MSCs associado ao PRP e MSCs obtiveram uma elevação mais baixa dos seus valores, mostrando que nesses subgrupos a lesão miocárdica presente foi menor devido à ação dessas terapias. É importante destacar que a troponina I não é usada somente para a identificação de lesão miocárdica, mas, para estratificação de risco, a elevação da troponina correlaciona-se com a gravidade da doença e a expectativa de vida (O'BRIEN, 2008; OLIVEIRA et al., 2010).

Entretanto, os resultados mencionados acima não obtiveram significância estatística. Mas outros estudos não possuíram significância estatística na mensuração da troponina, permanecendo seus dados relevantes. Como é o caso de Oliveira e colaboradores (2010) que analisaram 79 pacientes humanos internados com IC descompensada durante oito meses. Eles detectaram troponina T elevada em 37 pacientes (46,84%). A mortalidade global foi de 35,4%. Nos grupos com troponina T elevada e troponina T baixa ocorreram, respectivamente: 19 *versus* 9 óbitos, 5 *versus* 4 transplantes cardíacos, 11 pacientes *versus* 7 necessitaram inotrópicos intravenosos e 14 *versus* 10 foram rehospitalizados. A concentração média da troponina T foi significantivamente mais elevada naqueles que morreram. Eles observaram uma tendência à maior mortalidade para os pacientes com troponina elevada comparada àqueles com troponina baixa. Concluíram que a dosagem única de troponina T à admissão hospitalar em pacientes com IC descompensada prediz desfechos adversos e deverá ser considerada na estratificação precoce de morbimortalidade a longo prazo.

Outro fator importante que mostra que os valores de troponina I foram significativos é a sua relação com os dados da microscopia. Os subgrupos que possuíram os valores mais elevados de troponina I, obtiveram maiores lesões no miocárdio na análise histológica. Já há décadas, sabe-se que existe boa correlação entre os níveis de determinadas enzimas, como a troponina, e o tamanho da lesão do miocárdio avaliado por necropsia (NICOLAU & FURTADO, 2011).

As lesões observadas nas lâminas de microscopia foram características da CMD, que se caracterizam por: vacuolização do sarcoplasma de cardiomiócitos, necrose

isolada de miofibras e fibrose difusa no miocárdio, corroborando com Nascimento & Martins (2005) e Silva & Camacho (2005).

Com auxílio de todas as análises realizadas nesta pesquisa, o subgrupo MSCs obteve resultados promissores para a diminuição da lesão cardíaca. Há muitas pesquisas buscando a diminuição dos efeitos maléficos da doxorrubina no miocárdio, com a utilização da terapia celular (AGBULUT et al., 2003; NAKAMUTA, 2008; KALIL et al., 2008), uso de potentes anti-oxidantes como probucol, carotenos e tocoferol (COSTA et al., 2004), exames cada vez mais específicos para o diagnóstico precoce da CMD, como a troponina (SELTING et al., 2004; O'BRIEN, 2008; SÁ et al., 2009; NICOLAU & FURTADO, 2011), tratamento sintomático com associações de fármacos (GUIMARÃES et al., 2002), uso de L-carnitina (ZANONI et al., 2011), entre outros. Mas ainda são necessárias mais pesquisas para encontrar a cura definitiva para a CMD, os estudos atuais apenas demonstraram melhora na doença.

7 CONCLUSÕES

Pela análise dos dados obtidos conclui-se que, para coelhos:

O protocolo realizado para indução da cardiomiopatia dilatada com aplicação de doxorubicina foi efetivo.

Os exames de troponina I sanguínea, histopatologia do miocárdio e avaliação dos pesos dos coelhos demonstraram a indução da cardiomiopatia dilatada pelo uso da doxorubicina.

O PRP não se caracterizou como um *scaffold* apropriado para veiculação de células-tronco mesenquimais na implantação intramiocárdica.

A aplicação das MSCs ressuspendidas em meio de cultura no miocárdio demonstrou uma melhora significativa no coração com CMD quando comparada aos demais grupos estudados. E o subgrupo PRP obteve os piores resultados.

A injeção intramiocárdica para implante celular mostrou-se segura, quando guiada por videotoracoscopia, porém determinou lesão fibrosa que não interfere com a atividade elétrica ou a função ventricular.

O procedimento cirúrgico minimamente invasivo demonstrou ser uma abordagem ideal de aplicação de células-tronco no miocárdio em coelhos com CMD. A toracoscopia videoassistida, além de ter permitido uma boa visualização do coração e inspeção da cavidade torácica, capacitou a injeção intramiocárdica de modo seguro das células-tronco.

A troponina I demonstrou ser um marcador efetivo de lesão cardíaca nos coelhos. Seus níveis basais de normalidade se assemelharam com os níveis humanos, onde valores acima de $0,04\text{ng.mL}^{-1}$ significa lesão miocárdica.

É necessário estudo complementar por período mais prolongado e com marcação das MSCs para confirmação efetiva da tendência observada.

8 REFERÊNCIAS

AGBULUT, O. et al. Temporal patterns of bone marrow cell differentiation following transplantation in doxorubicin-induced cardiomyopathy. **Cardiovascular Research**, v.58, p.451-459, 2003.

ÂNGELO, L.C.S. et al. Valores de referência de medidas ecocardiográficas em amostra da população brasileira adulta assintomática. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.89, n.3, p.184-190, 2007.

ANTMAN, E.M. et al. Cardiac specific troponin I levels to predict the risk of mortality in patients with acute coronary syndromes. **New England Journal of Medicine**, v.335, p.1342-9, 1996.

ARNOLDA, L. 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.

ASSMUS, B. et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). **Circulation**, v. 106, p.3009-3017, 2002.

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

AUPPERLE, H. et al. Effects of autologous stem cells on immunohistochemical patterns and gene expression of metalloproteinases and their tissue inhibitors in doxorubicin cardiomyopathy in a rabbit model. **Veterinary Pathology**, v.44, p.494-503, 2007.

AZEVEDO, J.C. et al. Avaliação in vivo da distribuição das células autólogas mononucleares da medula óssea no tecido miocárdico infartado através da marcação com ^{99m}Tc-HMPA. **Revista da SOCERJ**, v.19, n.3, p.201-207, 2006.

BABUIN, L.; JAFFE, A.S. Troponin: the biomarker of choice for the detection of cardiac injury. **Canadian Medical Association Journal**, v.173, p.1191-1202, 2005.

BARBOSA, A.L.T et al. Plasma rico em plaquetas para a reparação de falhas ósseas em cães. **Ciência Rural**, v.38, n.5, p.1335-1340, 2008.

BECK, C.A.C. et al. Toracosopia nas hérnias diafragmáticas: estudo experimental em cães. **Ciência Rural**, v.34, p.1857-1863, 2004.

BOBIS, S.; JAROCHA, D.; MAJKA, M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v.44, p.215-230, 2006.

BOCCHI, E.A.; FERREIRA, S.M.A. Células-tronco no tratamento das doenças cardiovasculares. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul**, v.14, n.4, p.1-9, 2005.

BOER, H.C. et al. Fibrin and activated platelets cooperatively guide stem cells to a vascular injury and promote differentiation towards an endothelial cell phenotype. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v.26, p.1653-1659, 2006.

BUCHANAN, J.W. Causes and prevalence of cardiovascular disease. In: KIRK, R.W.; BONAGURA, J.D. (Ed). **Current veterinary therapy XI**. Philadelphia: Saunders, p.647- 655, 1992.

BYDLOWSKI, S.P. et al. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n.1, p. 25-35, 2009.

CAMPOS-FILHO, O. et al. Diretriz para indicações e utilização da ecocardiografia na prática clínica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.82 (Supl II), p.11-34, 2004.

CAPLAN, A.I. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. **Journal of Pathology**, v.217, p.318-324, 2009.

CARMONA, J.U. et al. Autologous platelet concentrates as a treatment of horses with osteoarthritis: a preliminary pilot clinical study. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.27, n.4, p.167-170, 2007.

CARRILLO, E.H.; HENIFORD, B.T.; ETOCH, S.W. Video-assisted thoracic surgery in trauma patients. **Journal of the American College of Surgeons**, v.184, p.316-323, 1997.

CARVALHO, A.C.C. et al. Bases da terapia celular em cardiologia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.31, p.75-81, 2009.

CHAN, P. et al. Efficacy study of video-assisted thoracoscopic surgery pleurodesis for spontaneous pneumothorax. **The Annals of Thoracic Surgery**, v.71, p.452-454, 2001.

CHEN, M. et al. Effects of autologous stem cell transplantation on ventricular electrophysiology in doxorubicin-induced heart failure. **Cell Biology International**, v.30, p.576-582, 2006.

CHIN, B.B. et al. In-oxine labeled mesenchymal stem cell SPECT after intravenous administration in myocardial infarction. **Nuclear Medicine Communication**, v.11, n.24, p.1149-1154, 2003.

CHRISTMAN, K.L. et al. Injectable fibrin scaffold improves cell transplant survival, reduces infarct expansion, and induces neovasculature formation in ischemic myocardium. **Journal American Collegy Cardiology**, v.44, p.654-660, 2004.

CHUNG, D.A.; RITCHIE, A.J. Videothoroscopic drainage of mediastinal abscess: an alternative to thoracoscopy. **The Annals of Thoracic Surgery**, v.69, p.1573-1574, 2000.

CIRNE-LIMA, E.O. Stem Cells. **Revista HCPA**, v.27, n.3, p.66-73, 2007.

COOKSON, C. Mãe de todas as células. **Scientific American Brasil**, n.39, 2005.

COSTA, L.A.L.; TEIXEIRA, V.N.; SCHNEIDER, A. Estudo comparativo do possível efeito protetor da vitamina E na injúria pulmonar obtida por administração de doxorubicina em ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias**, v.31, n.4, p.253-256, 2004.

CROVETTI, G. et al. Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds. **Transfusion and Apheresis Science**, v.30, n.2, p.145-51, 2004.

DARKE, P.G.G.; BONAGURA, J.D.; KELLY, D.F. **Atlas ilustrado de cardiologia veterinária**. Manole: São Paulo, SP, p.98-104, 2000.

DEANS, R.J.; MOSELEY, A.B. Mesenchymal stem cells: biology and potencial clinical uses. **Experimental Hematology**, v.28, p.875-884, 2000.

DEBUS, E.S. et al. The role of growth factors in wound healing. **Zentralblatt für Chirurgie**, v.125, n.1, p.49-55, 2000.

DEFRANCESCO, T.C. et al. Prospective clinical evaluation of serum cardiac troponin T in dogs admitted to a Veterinary Teaching Hospital. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.16, p.553-557, 2002.

DEL CARLO, C.H. et al. Troponina cardíaca T para estratificação de risco na insuficiência cardíaca crônica descompensada. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.92, n.5, p.404-412, 2009.

DEL CARLO, R.J. et al. Integração de aloenxertos ósseos corticais associados ou não a células-tronco da medula óssea, proteína óssea morfogenética (BMP) e autoenxerto esponjoso em cães. **Veterinária e Zootecnia**, v.14, p.204-215, 2007.

DEROSSI, R. et al. Effects of platelet-rich plasma gel on skin healing in surgical wound in horses. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.24, n.4, p.276-281, 2009.

DINATO, C.J. et al. Plasma rico em plaquetas. In: DINATO C.J.; POLIDO D.W. **Implantes osseointegrados: cirurgia e prótese**. São Paulo: Artes Médicas, 2001. p.315-342.

DOROSHOW, J.H.; LOCKER, G.Y.; MYERS, C.E. Experimental animal models of adriamycin cardiotoxicity. **Cancer Treatment Reports**, v.63, n.5, p.855-60, 1979.

DOW, J. et al. Washout of transplanted cells from the heart: a potential new hurdle for cell transplantation therapy. **Cardiovascular Research**, v.67, p.301-307, 2005.

DUHAYLONGSOD, F.G. Minimally invasive cardiac surgery defined. **Archives of Surgery**, v.135, p.296-301, 2000.

ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 925-939, 2005.

EVERTS, P.A.M. et al. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. **Journal of ExtraCorporeal Technology**, v.38, n.2 p.174-187, 2006.

FAGUNDES, D.J.; TAHA, M.O. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.19, n.1, p.59-65, 2004.

FELDMAN, B.F. et al. **Schalm's veterinary hematology**. 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p.1344, 2000.

FERNANDES, P.M.P et al. Bloqueio Simpático Esquerdo por Videotoracoscopia no Tratamento da Cardiomiopatia Dilatada. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.95, p.685-690, 2010.

FONTANA, V. **Análise da expressão gênica em células-tronco mesenquimais de medula óssea humana durante o comprometimento com a linhagem osteogênica**. 128f. (Dissertação de Mestrado) Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

FORTUNATO JUNIOR, J.A. et al. Padronização da técnica para cirurgia cardíaca videoassistida: experiência inicial. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v.23, p.183-189, 2008.

FOSTER, T.E. et al. Platelet rich plasma: from basic science to clinical applications. **American Journal of Sports Medicine**, v.37, n.11, p.2259-2272, 2009.

FRASER, J.K. et al. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. **Trends in Biotechnol**, v.24, p.150-154, 2006.

FREEMAN, L.J. Introduction. In: FREEMAN, L.J. **Veterinary endosurgery**. St Louis: Mosby, 1998. p.xx-xvii.

GAGE, F.H. Mammalian neural stem cells. **Science**, v.287, p.1433-1438, 2000.

GANDHI, A. et al. The effects of local platelet rich plasma delivery on diabetic fracture healing. **Bone**, v.38, p.540-546, 2006.

GARCÍA, F. et al. Examination of the thoracic cavity and lung lobectomy by means of thoracoscopy in dogs. **Canadian Veterinary Journal**, v.39, p.285-291, 1998.

GODOY, M.F.; BRAILE, D.M.; PURINI, NETO J. A troponina como marcador de injúria celular miocárdica. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v.71, n.4, p.629-633, 1998.

GRECO, O.T. et al. Ressincronização cardíaca e terapia celular. Existe terapia associativa? **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.31, p.93-98, 2009.

GRITTI, A.; VESCOVI, A.L.; GALLI, R. Adult neural stem cells plasticity and developmental potential. **Journal of Physiology**, v.96, n,1/2, p.81-82, 2002.

GUIMARÃES, E.T. et al. Revisão das II diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia para o diagnóstico e tratamento da insuficiência cardíaca. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.79 (Supl IV), p.1-30, 2002.

GUPTA, S.; DE LEMOS, J.A. Use and misuse of cardiac troponins in clinical practice. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v.50, p.151-165, 2007.

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

HENDERSON, J.L. et al. The effects of autologous platelet gel on wound healing. **Ear, Nose & Throat Journal**, v.82, n.8, p.598-602, 2003.

HIDEMASA, O. et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation and fusion after infarction. **PNAS**, v.100, n.21, p.12313-18, 2003.

HODGSON, D.M. et al. Stable benefit of embryonic stem cell therapy in myocardial infarction. **American Journal Physiology Heart and Circulation Physiology**, v.287, n.2, p.471-479, 2004.

HOGNESS, J. R. **The artificial heart: prototypes, policies and patients**. Washington: National Academy Press, p.251-261, 1991.

HUANG, N.F. et al. Injectable biopolymers enhance angiogenesis after myocardial infarction. **Tissue Engineering**, v.11, p.1860-1866, 2005.

JAKLITSCH, M.T. Video-assited techniques in thoracic surgery. In: LOUGHLIN, K.R.; BROOKS, D.C. **Principles of endosurgery**. Cambridge : Blackwell Science, 1996. p.230-250.

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

KALYANARAMAN, B. et al. Doxorubicin-induced apoptosis: implications in cardiotoxicity. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 234, n.1, p.119-24, 2002.

KASEDA, S. et al. Better pulmonary function and prognosis 187 with videoassisted thoracic surgery than with thoracotomy. **The Annals of Thoracic Surgery**, v.70, p.1644-1646, 2000.

KEYV, S.V.; JACOBSON, M.S. Comparison of methods for point of care preparation of autologous platelet gel. **Journal of ExtraCorporeal Technology**, v.36, n.1, p.28-35, 2004.

KIERSZENBAUM, A.L. **Histologia e Biologia Celular; Uma introdução á patologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

KITLLESON, M.D. Primary myocardial disease leading to chronic myocardial failure - dilated cardiomyopathy and related disease. In: KITLLESON M.D.; KIENLE R.D. **Small animal cardiovascular medicine**. St. Louis : Mosby, p.319-346, 1998.

KORFF, S.; KATUS, H.A.; GIANNITSIS, E. Differential diagnosis of elevated troponins. **Heart**, v.92, p.987-993, 2006.

KRAMER, A.G.; KITLLESON, M.D.; FOX, P.R. Plasma taurine concentrations in normal dogs and in dogs with heart disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.9, n.4, p.253-258, 1995.

KUBOTA, S. et al. Abundant retention and release of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) by platelets. **Journal of Biochemistry**, v.136, n.3, p.279-282, 2004.

LEAL, J.C.F. et al. Avaliação imediata da troponina I cardíaca em pacientes submetidos à revascularização do miocárdio. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v.14, n.3, p.247-53, 1999.

LIU, Y. et al. Bone marrow mononuclear cell transplantation into heart elevates the expression of angiogenic factors. **Microvascular Research**, v.3, n.68, p.156-160, 2004.

LIU, Y. et al. Fibroblast proliferation due to exposure to a platelet concentrate in vitro is pH dependente. **Wound Repair Regeneration**, v.10, n.5, p.336-40, 2002.

LOBO, L.L.; PEREIRA, R. Cardiomiopatia dilatada canina. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.97, n.544, p.153-159, 2002.

LÓPEZ-SENDÓN, J. Troponinas y otros marcadores de daño miocárdico. Mitos y realidades. **Revista Española de Cardiología**, v.56, n.1, p.16-19, 2003.

MACK, M.J. et al. Present role of thoracoscopy in the diagnosis and treatment of diseases of the chest. **The Annals of Thoracic Surgery**, v.54, p.403-409, 1992.

MAIA, L. **Plasma rico em plaquetas no tratamento de tendinite em equinos: avaliação clínica, ultrasonográfica e histopatológica**. 2008. 78f. Dissertação

(Mestrado em Medicina Veterinária) – Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa.

MAIA, L.; SOUZA, M.V. Componentes ricos em plaquetas na reparação de afecções tendo-ligamentosas e osteo-articulares em animais. **Ciência Rural**, v.39, n.4, p.1279-1286, 2009.

MAMBELLI, L.I. et al. Characterization of equine adipose tissue-derived progenitor cells before and after cryopreservation. **Tissue Engineering**, v.15, n.1, p.87-94, 2009.

MARTINS, L.G.A. et al. Biópsia do miocárdio em cães: acesso minimamente invasivo por cirurgia torácica videoassistida. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.6, p.1275-1280, 2009.

MARX, R.E. Platelet-rich plasm: evidence to support its use. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.64, n.4, p.489-96, 2004.

MAZZUCO, L. et al. The use of autologous platelet gel to treat difficult-to-heal wounds: a pilot study. **Transfusion**, v.44, n.7, p.1013-1018, 2004.

MEIRELLES, L.S.; CAPLAN, A.I.; NARDI, N.B. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v.26, p.2287-2299, 2008.

MESSORA, M.R. et al. Análise da eficiência do protocolo de dupla centrifugação para o preparo do plasma rico em plaquetas (PRP) – estudo experimental em coelhos. **Revista Sul-Brasileira de Odontologia**, v.6, n.3, p.291-296, 2009.

MIZUNO, H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. **Journal of Nippon Medical School**, v.76, n.2, p.56-66, 2009.

MODI, P.; HASSAN, A.; CHITWOOD JR, W.R. Minimally invasive mitral valve surgery: a systematic review and meta-analysis. **European Journal of Cardio-Thoracic Surgery**, v.34, p.943-52, 2008.

MONTEIRO, B.S.; ARGOLO NETO, N.M.; DEL CARLO, R.J. Células-tronco mesenquimais. **Ciência Rural**, v.40, n.1, p.238-45, 2010.

MÜLLER-EHMSSEN, J. et al. Survival and development of neonatal rat cardiomyocytes transplanted into adult myocardium. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v.34, n.2, p.107-116, 2002.

NAKAGE, A.P.M.; SANTANA, A.E. Células-tronco hematopoiéticas em cães. **Ciência Rural**, v. 36, n. 1, p. 325-329, 2006.

NAKAJIMA, J. et al. Thoracoscopic resection of the pulmonary aspergilloma. **Chest**, v.118, n.5, p.1490-1495, 2000.

NAKAMUTA, J.S. **Terapia celular para isquemia cardíaca: efeitos da via de administração, do tempo pós-lesão e do uso de biopolímero para a retenção das células e função miocárdica.** (Tese de Doutorado) Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

NASCIMENTO, M.C.M.O.; MARTINS, A.S. Cardiomiopatia induzida pela adriamicina: uma revisão. **Arquivos de Ciências da Saúde**, v.12, n.2, p.111-15, 2005.

NICOLAU, J.C.; FURTADO, R.H.M. Aos pacientes com coronariopatia aguda, apenas a dosagem inicial de troponina é o melhor que temos a oferecer? **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.96, n.6, p.432-433, 2011.

O'BRIEN, P.J. Cardiac troponin is the most effective translational safety biomarker for myocardial injury in cardiotoxicity. **Toxicology**, v.245, p.206-218, 2008.

ODORICO, J.S.; KAUFMAN, D.S.; THOMSON, J.A. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. **Stem Cells**, v.19, p.193-204, 2001.

OKAMOTO, O.K.; SANTOS, A.H. Perspectivas em terapia células: células-tronco. **Einstein**, v.2, n. 4, p. 355-358, 2004.

OLIVEIRA, M.D.C.; ÁLVARES, J.; MOREIRA, M.C.V. Dosagem única de troponina cardíaca T prediz risco adverso na insuficiência cardíaca descompensada. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.94, n.4, p.527-534, 2010.

OLIVEIRA-FILHO, M.A. et al. Plasma rico em plaquetas de coelhos: introdução a um modelo animal experimental. **ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v.21, n.4, p.175-179, 2008.

OLSSON, D.C. et al. Comportamento biológico de matriz *scaffold* acrescida de células progenitoras na reparação óssea. **Ciência Rural**, v.38, n.8, p.2403-2412, 2008.

PAGLIOSA, G.M.; ALVES, G.E.S. Considerações sobre a obtenção e o uso do plasma rico em plaquetas e das células mesenquimais indiferenciadas em enxertos ósseos. **Ciência Rural**, v.37, n.4, p.1202-1205, 2007.

PEREIRA, I.S.O. et al. Protocolo piloto de separação e quantificação de células-tronco de tecido adiposo de coelhos para posterior uso em laringe. **Acta ORL**, v.26, n.3, p.11-16, 2008.

PETRUNGARO, P.S. Using platelet-rich plasma to accelerate soft tissue maturation in esthetic periodontal surgery. **Compendium of Continuing Education in Dentistry**, v.22, n.9, p.729-732, 2001.

POFFO, R. et al. Cirurgia cardíaca videoassistida: resultados de um projeto pioneiro no Brasil. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v.24, p.318-326, 2009.

PÓVOA, R.; SOUZA, D. Análise crítica do eletrocardiograma e do ecocardiograma na detecção da hipertrofia ventricular esquerda. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v.15, n.2, p.81-89, 2008.

QUILES, J.L. et al. Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. **Toxicology**, v.180, n.1, p.79-95, 2002.

RADOSEVICH, M.; GOUBRAN, H.A.; BURNOUF, T. Fibrin sealant: scientific rationale, production methods, properties, and current clinical use. **Vox Sanguinis**, v.72, p.133-143, 1997.

RANGAPPA, S. et al. Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes. **The Annals of Thoracic Surgery**, v.75, p.775–779, 2003.

REGISTRO BRASILEIRO DE TRANSPLANTES. ABTO ano XI janeiro/junho 2005.

RICHTER, R.K. et al. Cirurgia torácica videoassistida (CTVA) na correção de ducto arterioso patente. Estudo experimental em cães. **Archives of Veterinary Science**, v.12, p.35-40, 2007.

ROBEY, P.G. Stem cells near the century mark. **The Journal of Clinical Investigation**, v.105, n.11, p.1489-1491, 2000.

SÁ, M.P.B.O. et al. Cardiotoxicidade e quimioterapia. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v.7, p.326-330, 2009.

SAMPSON, S.; GERHARDT, M.; MANDELBAUM, B. Platelet rich plasma injection grafts musculoskeletal injuries: a review. **Current Reviews in Musculoskeletal Medicine**, v.1, p.165-174, 2008

SÁNDOR, G.K.B.; SUURONE, R. Combining Adipose-Derived Stem Cells, Resorbable Scaffolds and Growth Factors: An Overview of Tissue Engineering. **Journal of Canadian Dental Association**, v.74, n. 2, p.167-170, 2008.

SANTOS, A.C.S. et al. Cardioncologia: anormalidades eletrocardiográficas em pacientes com cardiomiopatia pós-uso de doxorrubicina. **Revista da SOCERJ**, v.22, n.5, p.281-288.

SANZ, R.; JIMÉNEZ-QUEVEDO, P. Terapia com células-tronco em cardiomiopatia não-isquêmica. **Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva**, v. 15, n. 4, p. 416-420, 2007.

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

SEONG, J.M. et al; HWANG, Y.S. Stem cells in bone tissue engineering. **Biomedical Materials**. v.6, n.5, p. 2010.

SELTING, K.A. et al. Cardiac troponin I in canine patients with lymphoma and osteosarcoma receiving doxorubicin: comparison with clinical heart disease in a retrospective analysis. **Veterinary and Comparative Oncology**, v.2, n.3, p.142-156, 2004.

SILVA, C.E.V.; CAMACHO, A.A. Alterações ecocardiográficas em cães sob tratamento prolongado com doxorubicina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.3, p.300-306, 2005.

SINGAL, P.K. et al. Adriamycin-induced heart failure: mechanism and modulation. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.207, n.12, p.77-86, 2000.

SISSON, D.D.; THOMAS, W.P.; KEENE, B.W. Doença miocárdica primária no cão. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. Philadelphia: Saunders, p.925-948, 2004.

SOARES, C. Manutenção Interna. **Scientific American Brasil**, n.39, 2005.

SOUZA, V.F. et al. Células-tronco: uma breve revisão. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.2, n.2, p.251-256, 2003.

SUZUKI, K. et al. Intracoronary infusion of skeletal myoblasts improves cardiac function in doxorubicin-induced heart failure. **Circulation**, v.104 (Supl I), p. 213-217, 2001.

TALLARICO, D. et al. Myocardial cytoprotection by trimetazidine against anthracycline-induced cardiotoxicity in anticancer chemotherapy. **Angiology**, v.54, n.2, p. 219-27, 2003.

TERAOKA, K. et al. Progressive cardiac dysfunction in adriamycin-induced cardiomyopathy rats. **European Journal of Heart Failure**, v.2, n.4, p.373-378, 2000.

TSE, H.F. et al. Angiogenesis in schaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell transplantation. **The Lancet**, v.361, p.47-49, 2003.

VENDRAMIN, F.S. et al. Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: técnica de preparo e utilização em cirurgia plástica. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.33, n.1, p.24-28, 2006.

VENTURA, F.V.C. et al. Pericardiectomia parcial toracoscópica em um cão. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.37, p.79-83, 2009.

VILAS-BOAS, F. et al. Bone marrow cell transplantation to the myocardium of a patient with heart failure due to Chagas' disease. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v.2, n.82, p.185-187, 2004.

VOGEL, G. Can old cells learn new tricks? **Science**, v.287, p.1418-1419, 2000.

WAGERS, A.J.; WEISSMAN, I.L. Plasticity of adult stem cells. **Cell**, v.116, p.639-48, 2004

WALSH, P.J. et al. Thoracoscopic versus open partial pericardectomy in dogs: comparison of postoperative pain and morbidity. **Veterinary Surgery**, v.28, p.472-479, 1999.

WALTON, R.S. Video-assisted thoracoscopy. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.31, n.4, p.729-759, 2001.

WAN, C.D. et al. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells derived from adipose tissues in a rat orthotopic liver transplantation model. **Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International**, v.7, p.29-33, 2008.

WEIBRIC, G. et al. Quantification of thrombocyte growth factors in platelet concentrates produced by discontinuous cell separation. **Factor Growth**, v.20, n.2, p.93-97, 2002.

WEIBRICH, G. et al. Effects of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. **Bone**, v.34, n.4, p.665-671, 2004.

WOLLERT, K.C.; DREXLER, H. Clinical applications of stem cells for the heart. **Circulation Research**, v.96, p.151-163, 2005.

YASUDA, T. et al. Quantitative analysis of survival of transplanted smooth muscle cells with real-time polymerase chain reaction. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v.129, n.4, p.904-911, 2005.

YOO, K.J. et al. Autologous smooth muscle cell transplantation improved heart function in dilated cardiomyopathy. **The Annals of Thoracic Surgery**, v.70, n.3, p.859-65, 2000.

YOU, J.J. et al. Relation between cardiac troponin I and mortality in acute decompensated heart failure. **American Heart Journal**, v.153, n.4, p.462-70, 2007.

ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. **Células-tronco – A fronteira da Medicina**. São Paulo: Atheneu, 2006, 245p.

ZANONI, L.Z. et al. O uso da L-carnitina como adjuvante no tratamento da miocardiopatia dilatada em criança com AIDS. **Revista Paulista de Pediatria**, v.29, n.2, p.289-293, 2011.

ZHANG, J. et al. Autologous mesenchymal stem cells transplantation in Adriamycin-induced cardiomyopathy. **Chinese Medical Journal (Engl)**, v.118, n.1, p.73-76, 2005.

ZUCCONI, E. et al. Mesenchymal stem cells derived from canine umbilical cord vein – a novel source for cell therapy studies. **Stem Cells and Development**, v.19, n.3 p.395-403, 2010.

ZUK, P.A. et al. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, n.12, p. 4279–4295, 2002.

ANEXO 1 – Carta de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais

**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A Comissão Científica e a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisaram o projeto:

Projeto: 110279

Data da Versão do Projeto: 12/07/2011

Pesquisadores:

PAULA BARROS TERRACIANO
EMERSON ANTONIO CONTESINI
ALESSANDRA BILESKI MAGRISSO
PRISCILLA DOMINGUES MORSCHBACHER
ELIZABETH OBINO CIRNE LIMA

Título: Terapia com células-tronco mesenquimais e biopolímero em cardiomiopatia dilatada não isquêmica induzida com doxorrubicina em coelhos Nova Zelândia

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação de projetos onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEP/HCPA.

Porto Alegre, 18 de julho de 2011.

Dr. Alessandro Bersch Osvaldt
Coordenador da CEUA/HCPA

APÊNDICE A – Resultados da troponina I nos diferentes grupos

Saudáveis

Solução Fisiológica			
Coelhos	Controle	Pós-Doxo	Pós-Trat
25	0,016	0,016	0,009
45	0,004	0,004	0,010
20	0,006	0,006	0,008
37	0,007	0,007	0,010
32	0,007	0,007	0,006

Células-Tronco			
Coelhos	Controle	Pós-Doxo	Pós-Trat
19	<0,006	<0,006	0,010
22	0,008	<0,006	0,023
29	0,008	0,008	0,038
30	0,019	0,019	0,037
46	0,009	0,009	0,006

PRP			
Coelhos	Controle	Pós-Doxo	Pós-Trat
14	0,008	<0,006	0,597
15	0,014	0,016	0,021
18	<0,006	0,007	0,036
40	0,005	0,005	0,043
48	0,016	0,016	0,026

PRP + Células-Tronco			
Coelhos	Controle	Pós-Doxo	Pós-Trat
27	0,003	0,003	0,075
38	0,003	0,003	2,128
42	0,003	0,003	0,006
47	<0,006	0,006	0,008
33	0,007	0,006	0,010

Doentes

Solução Fisiológica			
Coelhos	Controle	Pós-Doxo	Pós-Trat
3	0,007	0,059	0,222
6	0,010	0,058	0,521
8	0,012	0,197	0,216
10	0,013	0,118	0,146
21	0,009	0,084	0,276

Células-Tronco			
Coelhos	Controle	Pós-Doxo	Pós-Trat
17	0,006	0,029	0,010
23	0,022	0,060	0,030
31	0,007	0,179	0,094
43	0,007	0,067	0,081
44	0,015	0,075	0,112

PRP			
Coelhos	Controle	Pós-Doxo	Pós-Trat
16	<0,006	0,057	0,008
35	0,017	0,199	1,561
36	0,022	0,075	0,069
39	0,016	0,059	0,238
13	<0,006	0,061	0,367

PRP + Células-Tronco			
Coelhos	Controle	Pós-Doxo	Pós-Trat
11	<0,006	0,029	0,005
12	0,009	0,020	0,007
24	0,013	0,084	0,200
26	0,018	0,158	0,177
34	0,015	0,143	0,159

APÊNDICE B – Resultados dos pesos nos diferentes grupos

Saudáveis

Solução Fisiológica							
Coelho	Chegada	Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4	Ciru	Eutan
25	2,50	2,70	2,85	2,95	3,00	3,10	3,05
45	2,60	2,45	2,30	2,30	2,30	2,30	2,50
20	2,50	2,60	2,85	3,00	3,00	3,00	3,00
37	2,50	2,70	2,85	2,70	2,60	2,60	2,60
32	3,00	3,00	3,10	3,10	3,10	3,10	3,10

Células-Tronco							
Coelho	Chegada	Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4	Ciru	Eutan
19	2,50	2,65	2,70	2,75	2,75	2,75	3,05
22	2,40	2,50	2,50	2,60	2,60	2,60	2,70
29	2,75	3,00	3,15	3,15	3,10	3,10	3,30
30	2,60	2,75	2,85	2,85	2,90	2,90	3,25
46	2,95	3,00	3,20	3,20	3,10	3,10	3,60

PRP							
Coelho	Chegada	Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4	Ciru	Eutan
14	2,60	2,85	3,00	3,15	3,15	3,15	3,30
15	2,60	2,90	3,30	3,50	3,50	3,50	3,10
18	2,40	2,55	2,60	2,70	2,70	2,70	3,65
40	2,30	2,40	2,50	2,70	2,70	2,80	2,95
48	2,9	3,10	3,25	3,30	3,30	3,40	3,55

PRP + Células-Tronco							
Coelho	Chegada	Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4	Ciru	Eutan
27	2,60	2,80	3,00	3,00	3,00	3,00	2,90
38	2,70	2,80	2,90	2,90	2,90	2,90	3,30
42	2,30	2,50	2,70	2,70	2,80	2,80	2,80
47	3,85	3,85	3,80	3,80	3,80	3,85	3,80
33	2,45	2,60	2,90	2,90	2,90	2,90	3,00

Doentes

Solução Fisiológica							
Coelho	Chegada	Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4	Ciru	Eutan
3	3,00	3,10	3,30	3,10	2,95	2,70	2,80
6	2,60	1,80	2,50	2,60	2,50	2,70	2,80
8	3,20	2,50	3,30	3,30	3,30	3,30	3,20
10	3,20	2,40	3,25	3,20	2,90	2,60	2,70
21	2,00	2,00	2,15	2,35	2,25	2,25	2,25

Células-Tronco							
Coelho	Chegada	Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4	Ciru	Eutan
17	2,30	2,30	2,45	2,65	2,60	2,60	2,60
23	2,40	2,40	2,90	2,90	2,90	2,70	3,30
31	2,60	2,60	2,85	2,80	2,80	2,70	2,80
43	2,50	2,50	2,60	2,50	2,50	2,30	2,50
44	2,80	2,80	3,20	2,90	2,90	2,80	3,10

PRP							
Coelho	Chegada	Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4	Ciru	Eutan
16	2,10	2,10	2,15	2,15	2,25	2,25	2,30
35	2,45	2,45	2,70	2,80	2,80	2,70	2,95
36	2,60	2,60	2,75	2,80	2,80	2,80	3,50
39	2,50	2,50	2,65	2,80	2,80	2,70	2,85
13	2,20	2,20	2,60	2,75	2,50	2,50	2,60

PRP + Células-Tronco							
Coelho	Chegada	Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4	Ciru	Eutan
11	2,00	2,00	2,20	2,35	2,25	2,25	2,30
12	2,10	2,10	2,30	2,45	2,45	2,45	2,60
24	2,60	2,60	2,80	2,90	2,90	2,90	3,25
26	2,20	2,20	2,60	2,45	2,45	2,30	2,90
34	2,50	2,50	2,40	2,90	2,90	2,60	2,90

APÊNDICE C – Resultados do eletrocardiograma nos diferentes grupos

Saudáveis

Solução Fisiológica															
ECG	Coelho 25			Coelho 45			Coelho 20			Coelho 37			Coelho 32		
FC	200	200	260	200	220	260	240	220	220	280	220	220	220	200	220
R	sin	sin	sin	sin	sin	sin	Sin	sin	sin	sin	sin	Sin	sin	sin	sin
P (seg)	0,04	0,03	0,03	0,03	0,04	0,03	0,02	0,03	0,03	0,02	0,02	0,02	0,03	0,03	0,03
P (mV)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
PR	0,07	0,06	0,06	0,07	0,07	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,07	0,07	0,07
QRS	0,05	0,05	0,05	0,04	0,04	0,04	0,03	0,04	0,04	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
R	0,30	0,35	0,20	0,1	0,05	0,2	0,10	0,10	0,10	0,30	0,25	0,25	0,30	0,30	0,30
ST	nor	nor	nor	nor	nor	nor	Nor	nor	nor	Nor	nor	Nor	nor	nor	nor
T	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
QT	0,14	0,13	0,14	0,15	0,16	0,14	0,14	0,15	0,14	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
Eixo	60	60	60	60	180	0	150	150	150	30	0	0	30	30	30
	C	PD	PT	C	PD	PT	C	PD	PT	C	PD	PT	C	PD	PT

Células-Tronco															
ECG	Coelho 19			Coelho 22			Coelho 29			Coelho 30			Coelho 46		
FC	220	260	280	280	240	220	240	260	240	260	280	300	260	240	280
R	sin	sin	sin	sin	sin	sin	Sin	sin	sin	Sin	sin	Sin	sin	sin	sin
P (seg)	0,03	0,03	0,03	0,02	0,03	0,03	0,02	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,04
P (mV)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	(-) 0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
PR	0,07	0,07	0,07	0,06	0,06	0,06	0,07	0,07	0,06	0,06	0,05	0,05	0,06	0,06	0,06
QRS	0,04	0,05	0,04	0,04	0,04	0,05	0,04	0,05	0,05	0,04	0,04	0,04	0,04	0,05	0,05
R	(S)0,2	(S)0,4	(S)0,15	0,30	0,30	0,20	0,25	0,20	0,20	0,10	0,20	0,10	0,05	0,15	0,10
ST	nor	nor	nor	nor	nor	nor	Nor	nor	nor	Nor	nor	Nor	nor	nor	nor
T	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+
QT	0,12	0,14	0,12	0,12	0,13	0,15	0,13	0,14	0,14	0,14	0,14	0,13	0,14	0,14	0,14
Eixo	-90	-90	-90	30	30	30	120	120	150	0	60	0	60	30	0
	C	PD	PT	C	PD	PT	C	PD	PT	C	PD	PT	C	PD	PT

PRP															
ECG	Coelho 14			Coelho 15			Coelho 18			Coelho 40			Coelho 48		
FC	260	220	240	260	280	220	240	200	200	220	300	260	220	220	260
R	sin	sin	sin	sin	sin	sin	Sin	sin	sin	Sin	sin	Sin	sin	sin	sin
P (seg)	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02	0,03	0,04	0,03	0,03	0,04
P (mV)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	(-) 0,1	0,05	0,05	0,05	0,10
PR	0,06	0,06	0,06	0,07	0,07	0,06	0,06	0,06	0,05	0,05	0,06	0,06	0,07	0,07	0,07
QRS	0,04	0,05	0,05	0,03	0,03	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,05	0,06	0,04	0,04	0,04
R	0,3	0,2	0,35	(S) 0,3	(S) 0,1	(S) 0,1	0,10	0,20	0,05	0,25	0,5	0,25	0,15	0,15	0,15
ST	nor	nor	nor	nor	ele	nor	Nor	nor	nor	Nor	nor	Nor	nor	nor	Nor
T	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+
QT	0,13	0,15	0,16	0,12	0,13	0,16	0,16	0,16	0,15	0,15	0,12	0,16	0,16	0,16	0,14
Eixo	30	60	60	180	150	150	120	120	180	60	60	60	120	120	120
	C	PD	PT	C	PD	PT	C	PD	PT	C	PD	PT	C	PD	PT

PRP + Células Tronco															
ECG	Coelho 27			Coelho 38			Coelho 42			Coelho 47			Coelho 33		
FC	200	220	260	220	260	280	260	240	240	220	220	240	200	280	240
R	sin	sin	sin	sin	sin	sin	Sin	sin	sin	sin	sin	Sin	sin	sin	sin
P (seg)	0,02	0,03	0,04	0,02	0,02	0,03	0,04	0,04	0,04	0,03	0,03	0,04	0,03	0,02	0,02
P (mV)	0,05	0,05	0,05	0,05	(-) 0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
PR	0,07	0,08	0,07	0,05	0,06	0,06	0,06	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,06	0,05	0,05
QRS	0,04	0,03	0,04	0,05	0,05	0,05	0,03	0,03	0,04	0,04	0,04	0,05	0,04	0,04	0,04
R	0,2	(S)0,005	0,15	0,3	0,3	0,3	0,1	0,05	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,15	0,1
ST	nor	nor	nor	nor	nor	nor	Nor	nor	nor	nor	nor	Nor	nor	nor	nor
T	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
QT	0,16	0,14	0,14	0,14	0,14	0,13	0,15	0,15	0,16	0,14	0,14	0,14	0,16	0,14	0,15
Eixo	30	-60	90	90	60	90	60	-30	0	30	30	30	150	120	120
	C	PD	PT	C	PD	PT	C	PD	PT	C	PD	PT	C	PD	PT

Doentes

Solução Fisiológica															
ECG	Coelho 3			Coelho 6			Coelho 8			Coelho 10			Coelho 21		
FC	300	280	320	320	260	260	240	240	260	300	280	260	300	260	280
R	Sin	sin	sin	sin	sin	sin	Sin	sin	sin	sin	sin	Sin	sin	sin	Sin
P (seg)	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,03	0,03	0,03	0,02	0,02	0,02	0,03	0,03	0,03
P (mV)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
PR	0,06	0,05	0,06	0,06	0,06	0,07	0,07	0,07	0,06	0,05	0,05	0,05	0,08	0,06	0,06
QRS	0,04	0,05	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,05	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
R	0,25	0,25	0,3	0,05	0	0,2	0,05	0,05	0,05	0,3	0,25	0,3	0,05	(S) 0,2	0,2
ST	Nor	nor	nor	nor	nor	nor	Nor	nor	nor	nor	nor	Nor	nor	nor	Nor
T	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
QT	0,13	0,14	0,12	0,11	0,15	0,13	0,14	0,16	0,12	0,14	0,15	0,14	0,13	0,14	0,14
Eixo	90	90	90	120	150	120	-30	-30	-30	60	60	90	-60	-90	-90
	C	PD	PT	C	PD	PT	C	PD	PT	C	PD	PT	C	PD	PT

Células-Tronco															
ECG	Coelho 17			Coelho 23			Coelho 31			Coelho 43			Coelho 44		
FC	280	260	260	240	280	280	220	240	240	240	220	260	220	260	260
R	Sin	sin	sin	sin	sin	sin	Sin	sin	sin	sin	sin	Sin	sin	sin	Sin
P (seg)	0,03	0,04	0,03	0,02	0,02	0,02	0,04	0,04	0,04	0,02	0,02	0,02	0,03	0,03	0,04
P (mV)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
PR	0,06	0,07	0,06	0,06	0,06	0,06	0,07	0,07	0,07	0,06	0,06	0,06	0,07	0,07	0,07
QRS	0,04	0,04	0,04	0,04	0,05	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,03	0,04	0,04
R	0,1	0,1	0,05	0,2	0,1	0,1	0,15	0,1	0,1	(S) 0,25	(S) 0,25	(S) 0,3	(S) 0,5	(S) 0,1	(S) 0,15
ST	Nor	nor	nor	nor	nor	nor	Nor	nor	nor	ele	nor	Ele	nor	nor	Nor
T	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
QT	0,13	0,15	0,13	0,14	0,14	0,14	0,16	0,15	0,15	0,13	0,16	0,13	0,15	0,15	0,14
Eixo	120	120	30	0	0	0	60	0	0	240	240	240	180	210	240
	C	PD	PT	C	PD	PT	C	PD	PT	C	PD	PT	C	PD	PT

PRP															
ECG	Coelho 16			Coelho 35			Coelho 36			Coelho 39			Coelho 13		
FC	220	200	240	240	180	260	220	200	240	220	220	260	240	200	200
R	sin	sin	sin	sin	sin	sin	Sin	sin	sin	sin	sin	Sin	sin	sin	Sin
P (seg)	0,03	0,02	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,04	0,04	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
P (mV)	0,1	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,10	0,05	0,05	0,1	0,05	0,05
PR	0,06	0,06	0,06	0,05	0,07	0,06	0,07	0,06	0,07	0,07	0,06	0,07	0,07	0,08	0,07
QRS	0,04	0,04	0,04	0,04	0,05	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,05	0,04	0,04	0,03	0,03
R	0,05	0,1	(S) 0,05	0,35	0,2	0,15	0,10	0,05	(S) 0,15	0,10	0,15	0,05	0,15	(S) 0,1	0,1
ST	nor	nor	nor	nor	nor	nor	Nor	nor	nor	nor	nor	Nor	nor	nor	Nor
T	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
QT	0,15	0,16	0,15	0,14	0,18	0,14	0,14	0,16	0,15	0,14	0,16	0,14	0,14	0,15	0,14
Eixo	150	90	0	30	30	30	60	-60	240	90	60	180	120	-30	120
	C	PD	PT	C	PD	PT	C	PD	PT	C	PD	PT	C	PD	PT

PRP + Células-Tronco															
ECG	Coelho 11			Coelho 12			Coelho 24			Coelho 26			Coelho 34		
FC	200	280	280	260	260	260	280	240	300	240	240	260	220	240	300
R	sin	sin	sin	sin	sin	sin	CVPs	sin	sin	sin	sin	Sin	sin	sin	Sin
P (seg)	0,03	0,04	0,04	0,03	0,04	0,03	0,02	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,04	0,03
P (mV)	0,10	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
PR	0,07	0,07	0,06	0,06	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	0,06	0,06	0,06	0,07	0,07	0,06
QRS	0,04	0,03	0,04	0,05	0,05	0,05	0,04	0,05	0,05	0,04	0,04	0,04	0,03	0,03	0,04
R	(S) 0,2	(S) 0,1	(S) 0,1	0,1	0,05	(S) 0,05	0,1	0,1	0,15	0,05	(S) 0,1	0,1	0,05	0,05	(S) 0,15
ST	nor	nor	nor	nor	nor	nor	Nor	nor	nor	ele	ele	Nor	nor	nor	Ele
T	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
QT	0,15	0,14	0,14	0,15	0,16	0,16	0,15	0,17	0,14	0,14	0,15	0,14	0,16	0,17	0,14
Eixo	180	180	180	0	210	210	-30	0	30	0	-120	-30	-30	-30	180
	C	PD	PT	C	PD	PT	C	PD	PT	C	PD	PT	C	PD	PT

APÊNDICE D – Resultados do ecocardiograma nos diferentes grupos

Saudáveis

Solução Fisiológica															
ECO	Coelho 25			Coelho 45			Coelho 20			Coelho 37			Coelho 32		
Ao(M)	0,82	0,78	1,01	0,75	0,70	0,73	0,7	0,64	0,80	0,81	0,77	0,78	0,87	0,86	0,89
AE(M)	0,72	0,79	0,98	0,72	0,58	0,82	0,66	0,69	0,75	0,66	0,84	0,85	0,79	0,79	0,81
Ao(B)	0,825	0,87	0,86	0,87	0,77	0,83	0,75	0,82	0,83	1,00	0,82	0,85	0,90	0,89	0,91
AE(B)	1,12	1,19	1,05	1,20	0,92	0,93	0,95	1,11	1,05	1,17	0,91	0,98	1,18	1,15	1,19
VD	0,17	0,18	0,27	0,37	0,30	0,34	0,22	0,22	0,23	0,21	0,27	0,30	0,26	0,26	0,28
SIV	0,27	0,29	0,29	0,25	0,27	0,28	0,29	0,27	0,27	0,27	0,26	0,28	0,28	0,27	0,28
PL	0,22	0,24	0,27	0,25	0,24	0,26	0,26	0,23	0,25	0,23	0,23	0,24	0,26	0,23	0,26
VEd	1,56	1,39	1,24	1,49	1,17	1,26	1,23	1,37	1,31	1,61	1,37	1,35	1,57	1,55	1,56
VEs	1,20	0,99	0,85	1,02	0,83	0,87	0,84	0,96	0,95	1,07	1,03	1,02	1,03	1,25	1,13
FE	49,5	59,5	64,2	63,7	60,2	63	65	61	66	66	53,5	55,2	67,7	66,9	67,4
FS	23,08	28,7	31,6	31,9	29,1	30,7	31,9	29,9	31,6	33,5	24,9	31,0	34,6	33,4	34,5
	C	PD	PT	C	PD	PT	C	PD	PT	C	PD	PT	C	PD	PT

Células-Tronco															
ECO	Coelho 19			Coelho 22			Coelho 29			Coelho 30			Coelho 46		
Ao(M)	0,85	0,78	0,78	0,74	0,75	0,75	0,77	0,76	0,80	0,75	0,81	0,83	0,73	0,85	0,84
AE(M)	0,85	0,68	0,65	0,73	0,81	0,84	0,79	0,75	0,95	0,75	0,68	0,76	0,58	0,92	0,93
Ao(B)	0,80	0,89	0,78	0,85	0,76	0,71	0,87	0,82	0,99	0,83	0,84	0,90	0,94	0,9	0,91
AE(B)	1,05	1,07	1,17	0,87	0,84	0,88	1,20	1,00	1,18	1,01	1,10	1,09	1,13	1,09	1,07
VD	0,23	0,20	0,30	0,23	0,25	0,30	0,27	0,34	0,29	0,23	0,18	0,22	0,17	0,33	0,31
SIV	0,31	0,31	0,31	0,31	0,34	0,36	0,26	0,30	0,28	0,29	0,27	0,27	0,27	0,30	0,30
PL	0,26	0,26	0,27	0,31	0,31	0,30	0,25	0,30	0,28	0,26	0,26	0,26	0,25	0,26	0,29
VEd	1,44	1,82	1,54	1,05	1,09	1,17	1,41	1,60	1,53	1,58	1,61	1,31	1,47	1,33	1,41
VEs	0,91	1,29	1,04	0,71	0,79	0,85	0,91	1,12	1,00	1,00	1,03	0,84	1,00	0,92	0,93
FE	70	59,5	64,2	65	58	58,5	70,5	61,5	67,7	70,7	69,2	70,5	63,7	62,5	66,5
FS	36,59	29,3	32,2	32,0	27,1	27,6	35,5	30,4	34,7	36,9	35,9	36,0	32,0	30,6	33,6
	C	PD	PT	C	PD	PT	C	PD	PT	C	PD	PT	C	PD	PT

PRP															
ECO	Coelho 14			Coelho 15			Coelho 18			Coelho 40			Coelho 48		
Ao(M)	0,82	0,78	0,89	0,72	0,84	0,84	0,87	0,81	0,86	0,69	0,71	0,73	0,84	0,85	0,88
AE(M)	0,85	0,77	0,70	0,66	0,73	1,45	0,87	0,74	0,72	0,81	0,72	0,79	0,75	0,75	0,78
Ao(B)	0,92	0,85	0,93	0,86	0,84	0,80	0,76	0,77	0,89	0,64	0,82	0,84	0,96	0,96	0,97
AE(B)	1,36	1,38	1,17	1,22	1,07	1,23	1,03	1,02	1,08	0,86	1,04	1,00	1,08	1,07	1,13
VD	0,14	0,14	0,25	0,18	0,20	0,29	0,32	0,23	0,28	0,11	0,18	0,22	0,33	0,33	0,26
SIV	0,27	0,30	0,29	0,32	0,28	0,25	0,26	0,27	0,31	0,26	0,36	0,31	0,30	0,30	0,29
PL	0,22	0,29	0,27	0,26	0,24	0,24	0,23	0,25	0,29	0,20	0,26	0,26	0,29	0,29	0,28
VEd	1,70	1,44	1,51	1,13	1,27	1,47	1,37	1,24	1,43	1,33	1,25	1,47	1,40	1,41	1,43
VEs	1,18	1,00	1,02	0,65	0,84	1,06	0,89	0,85	0,92	0,82	0,85	1,01	0,90	0,90	0,98
FE	62	62,7	65,5	78	68	58,7	68,5	63,7	69,7	73	65,2	63,2	69,2	69,2	63,5
FS	30,63	30,7	32,7	42,3	34,2	28,2	34,9	31,3	36,1	38,4	32,0	31,6	35,6	34,5	31,8
	C	PD	PT	C	PD	PT	C	PD	PT	C	PD	PT	C	PD	PT

PRP + Células Tronco															
ECO	Coelho 27			Coelho 38			Coelho 42			Coelho 47			Coelho 33		
Ao(M)	0,75	0,90	0,91	0,67	0,67	0,71	0,77	0,78	0,84	0,92	0,92	0,90	0,82	0,83	0,74
AE(M)	0,68	0,79	0,86	0,72	0,66	0,84	0,92	0,92	0,83	0,91	0,91	0,87	0,70	0,72	0,69
Ao(B)	0,83	0,85	0,88	0,85	0,84	0,91	0,96	0,84	1,01	0,98	0,98	0,96	0,87	0,78	0,93
AE(B)	1,08	1,20	1,25	1,03	1,10	1,19	1,05	1,11	1,10	1,17	1,17	1,01	1,02	1,01	1,05
VD	0,15	0,19	0,28	0,23	0,33	0,32	0,17	0,30	0,24	0,50	0,50	0,45	0,22	0,28	0,25
SIV	0,31	0,29	0,28	0,28	0,27	0,30	0,31	0,32	0,32	0,30	0,30	0,31	0,29	0,29	0,32
PL	0,27	0,25	0,20	0,28	0,27	0,29	0,25	0,38	0,25	0,26	0,26	0,25	0,27	0,29	0,30
VEd	1,20	1,44	1,53	1,47	1,33	1,39	1,46	1,25	1,13	1,48	1,48	1,33	1,25	1,07	1,11
VEs	0,81	1,05	1,00	1,03	0,94	0,91	1,03	0,82	0,69	0,99	0,99	1,03	0,78	0,69	0,80
FE	65	57,5	68	60,7	61	68	60,5	68,2	73,5	66	66	67	71,7	69,5	71,0
				5				5					5		5
FS	32,29	27,5	34,9	29,8	29,4	34,3	29,6	34,8	38,8	33,3	33,3	37,8	37,4	35,6	36,4
		6	7	8	6	5	2	0	0	9	9	4	0	8	0
	C	PD	PT	C	PD	PT	C	PD	PT	C	PD	PT	C	PD	PT

Doentes

Solução Fisiológica															
ECO	Coelho 3			Coelho 6			Coelho 8			Coelho 10			Coelho 21		
Ao(M)	0,83	0,80	0,77	0,7	0,66	0,75	0,85	0,91	0,81	0,65	0,83	0,74	0,73	0,7	0,71
												5			
AE(M)	0,78	0,68	0,53	0,81	0,75	0,86	0,83	0,93	0,80	0,63	0,77	0,66	0,65	0,60	0,63
Ao(B)	0,87	0,80	0,88	0,78	0,73	0,83	1,02	0,92	0,95	0,78	0,78	0,80	0,71	0,76	0,75
AE(B)	1,18	1,06	0,80	1,00	0,90	1,01	1,14	1,11	1,21	1,09	0,98	0,98	0,80	1,01	1,00
VD	0,15	0,18	0,11	0,23	0,26	0,34	0,31	0,31	0,46	0,21	0,28	0,20	0,19	0,34	0,30
SIV	0,27	0,20	0,26	0,25	0,30	0,32	0,28	0,29	0,33	0,29	0,35	0,26	0,27	0,26	0,25
PL	0,24	0,19	0,27	0,23	0,28	0,29	0,21	0,27	0,30	0,30	0,31	0,26	0,25	0,25	0,26
VEd	1,42	1,36	1,53	1,21	1,13	1,16	1,39	1,40	1,57	1,00	1,13	1,44	1,28	1,21	1,30
VEs	0,92	0,96	1,06	0,79	0,77	0,76	0,98	0,97	1,15	0,57	0,81	1,06	0,83	0,80	1,06
FE	68,75	61	62	68	64,2	68	60,7	62,2	56,2	78,5	58,7	55,5	69	67	65,2
					5		5	5	5		5				5
FS	35,34	29,5	30,8	34,4	31,7	34,6	29,8	30,8	26,8	42,7	27,9	26,4	35,2	34,1	33,1
		4	8	4	1	3	6	4	4	5	4	3	8	6	4
	C	PD	PT	C	PD	PT	C	PD	PT	C	PD	PT	C	PD	PT

Células-Tronco															
ECO	Coelho 17			Coelho 23			Coelho 31			Coelho 43			Coelho 44		
Ao(M)	0,84	0,78	0,73	0,83	0,89	0,82	0,80	0,83	0,8	0,81	0,76	0,85	0,84	0,83	0,82
AE(M)	0,79	0,76	0,75	0,82	0,95	0,94	0,83	0,79	0,75	0,76	0,63	0,59	0,84	0,84	0,76
Ao(B)	0,77	0,82	0,83	0,76	0,86	0,85	0,77	0,89	0,86	0,89	0,88	0,87	0,91	0,89	0,86
				5											
AE(B)	0,84	1,00	1,00	1,13	1,02	1,11	1,10	1,05	0,9	1,10	0,89	1,08	1,24	1,19	1,01
VD	0,32	0,30	0,35	0,21	0,50	0,21	0,38	0,29	0,38	0,33	0,26	0,33	0,17	0,23	0,27
SIV	0,26	0,25	0,28	0,32	0,30	0,33	0,27	0,28	0,31	0,35	0,34	0,37	0,25	0,28	0,29
PL	0,25	0,21	0,26	0,28	0,22	0,27	0,25	0,27	0,32	0,29	0,28	0,29	0,22	0,25	0,27
VEd	1,26	1,24	1,18	1,31	1,33	1,42	1,45	1,25	1,19	1,29	1,29	1,12	1,78	1,54	1,44
VEs	0,80	0,94	0,76	0,87	0,89	0,87	0,98	0,84	0,8	0,83	0,89	0,72	1,23	1,04	0,92
FE	70,75	53	69,5	66,5	65,5	72,5	64,7	66	71,8	69,5	63,5	70,2	61,7	64,7	69,7
							5		3		5	5	5	5	5
FS	36,25	24,4	35,8	33,2	33,0	38,4	32,7	32,7	35,7	35,6	31,0	35,6	31,0	32,5	36,0
		0	1	7	2	5	6	3	6	6	1	3	0	7	5
	C	PD	PT	C	PD	PT	C	PD	PT	C	PD	PT	C	PD	PT

PRP															
ECO	Coelho 16			Coelho 35			Coelho 36			Coelho 39			Coelho 13		
Ao(M)	0,71	0,75	0,75	0,98	1,02	1,01	0,78	0,75	0,80	0,81	0,75	0,85	0,82	0,87 5	0,9
AE(M)	0,77	0,61	0,60	0,81	0,71	0,82	0,73	0,83	0,85	0,73	0,83	0,83	0,71	0,81	0,82
Ao(B)	0,79	0,80	0,90	0,88	1,00	0,88	0,86	0,92	0,79	0,85	0,83	0,91	0,82	0,86	0,88
AE(B)	0,82	1,00	1,07	1,08	1,29	1,25	0,91	1,09	1,13	1,14	1,01	1,00	1,13	1,22	1,25
VD	0,13	0,12	0,31	0,15	0,19	0,23	0,15	0,19	0,17	0,33	0,31	0,43	0,16	0,17	0,2
SIV	0,21	0,26	0,26	0,24	0,26	0,28	0,26	0,27	0,26	0,29	0,27	0,31	0,25	0,25	0,28
PL	0,22	0,21	0,26	0,25	0,24	0,27	0,25	0,26	0,25	0,28	0,25	0,28	0,24	0,22	0,24
VEd	1,34	1,24	1,25	1,63	1,54	1,49	1,44	1,29	1,32	1,38	1,26	1,26	1,32	1,44	1,44
VEs	1,81	0,85	0,83	1,09	1,08	1,06	0,95	0,86	0,87	0,96	0,86	0,83	0,97	1,00	0,98
FE	74,75	63,2 5	67,5	65,2 5	60,7 5	59,5	67,7 5	66,5	67,2 5	63	64,5	68	57	62,2 5	65,3 3
FS	40,04	30,9 7	33,7 3	33,2 8	29,8 0	28,8 6	34,4 9	33,1 4	34,2 8	30,8 0	31,8 8	34,2 6	26,7 6	30,4 9	32,8 5
	C	PD	PT	C	PD	PT	C	PD	PT	C	PD	PT	C	PD	PT

PRP + Células-Tronco															
ECO	Coelho 11			Coelho 12			Coelho 24			Coelho 26			Coelho 34		
Ao(M)	0,8	0,71	0,55	0,74	0,83	0,75	0,68	0,71	0,94	0,69	0,69	0,88	0,82	0,88	0,80
AE(M)	0,78	0,56	0,55	0,71	0,75	0,70	0,75	0,73	0,93	0,77	0,65	0,78	0,74	0,77	0,67
Ao(B)	0,82	0,77	0,84	0,79	0,89	0,84	0,86	0,77 5	0,80 5	0,66	0,75	0,88	0,90	0,89	0,77
AE(B)	0,96	0,93	0,85	1,07	1,10	0,94	1,02	1,03	1,16	0,96	1,08	1,27	1,26	1,20	0,93
VD	0,23	0,13	0,21	0,16	0,21	0,23	0,14	0,21	0,26	0,17	0,24	0,29	0,36	0,19	0,30
SIV	0,26	0,23	0,28	0,28	0,28	0,28	0,29	0,34	0,31	0,25	0,27	0,30	0,28	0,28	0,26
PL	0,23	0,24	0,30	0,24	0,23	0,24	0,21	0,26	0,27	0,21	0,23	0,26	0,28	0,27	0,25
VEd	1,23	1,11	1,01	1,33	1,32	1,26	1,30	1,40	1,39	1,29	1,21	1,42	1,48	1,41	1,16
VEs	0,84	0,80	0,70	0,90	0,88	0,83	0,89	1,03	0,92	0,89	0,74	0,87	0,97	0,94	0,79
FE	64,75	59,5	63	64,5	66,5	67,2 5	63,7 5	56,2 5	66,5	62,5	74	72,7 5	67,7 5	66,5	63,5
FS	32,25	28,3 8	30,4 5	32,2 0	33,2 7	34,0 6	31,4 1	26,7 4	33,3 9	31,2 6	39,1 8	38,6 6	34,5 8	33,4 5	31,3 9
	C	PD	PT	C	PD	PT	C	PD	PT	C	PD	PT	C	PD	PT

APÊNDICE E – Resultados da análise histopatológica nos diferentes grupos

Saudáveis

Solução Fisiológica	
Coelhos	Lesão Cardíaca
25	0
45	+
20	+
37	0
32	0

Células-Tronco	
Coelho	Lesão Cardíaca
19	0
22	0
29	+
30	+
46	+

PRP	
Coelho	Lesão Cardíaca
14	0
15	+
18	+
40	+
48	0

PRP + Células-Tronco	
Coelho	Lesão Cardíaca
27	+
38	0
42	+
47	0
33	+

Doentes

Solução Fisiológica	
Coelho	Lesão Cardíaca
3	++
6	++
8	++
10	++
21	++

Células-Tronco	
Coelho	Lesão Cardíaca
17	++
23	+
31	+
43	++
44	++

PRP	
Coelho	Lesão Cardíaca
16	++
35	+++
36	+++
39	+++
13	+++

PRP + Células-Tronco	
Coelho	Lesão Cardíaca
11	+
12	++
24	++
26	++
34	+