

ANA PAULA FALCI DAIBERT

**APLICAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS EM RATOS COM
BLOQUEIO ATRIOVENTRICULAR COMPLETO EXPERIMENTAL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

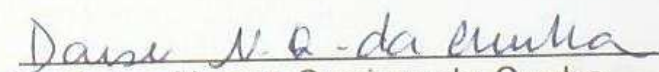
**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013**

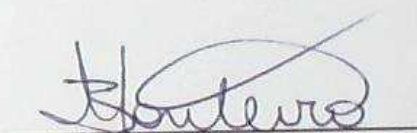
ANA PAULA FALCI DAIBERT

**APLICAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS EM RATOS COM
BLOQUEIO ATRIOVENTRICULAR COMPLETO EXPERIMENTAL**


Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

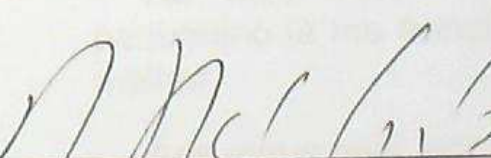
APROVADA: 06 de setembro de 2013.


Daise Nunes Queiroz da Cunha


Betânia Souza Monteiro


Sérgio Luís Pinto da Matta


Lukiya Silva Campos Favarato


Ricardo Junqueira Del Carlo
(Orientador)

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

Daibert, Ana Paula Falci, 1976-

D132a
2013

Aplicação de células-tronco mesenquimais em ratos com bloqueio atrioventricular completo experimental / Ana Paula Falci Daibert. – Viçosa, MG, 2013.

xi, 38 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Ricardo Junqueira Del Carlo.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 33-38.

1. Coração - Válvulas - Doenças. 2. Bloqueio cardíaco.
3. Terapia celular. 4. Sistema cardiovascular - Doenças - Tratamento. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.0896125

Dedico este trabalho:

À Deus, por me dar saúde e energia, por me guiar na alegria e na tristeza e por me dar forças para continuar sempre que penso em desistir de um desafio.

Ao meu marido Alexandre, por me amar, equilibrar e compreender há tantos anos.

Ao meu filho Heitor, que mesmo tão pequenino já me transformou em uma pessoa melhor.

Aos meus pais, por terem me dado a vida e me educado exatamente da forma como fizeram.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, por ter me proporcionado tantos anos de educação de qualidade.

À FAPEMIG e ao CNPq pelo financiamento do projeto.

Ao meu orientador Professor Ricardo Junqueira Del Carlo, pelos 12 anos de orientação e exemplo impecáveis. Agradeço ao senhor em especial pela paciência e perseverança durante o doutorado. Muito obrigada!

À Professora Lukiya Favarato e a toda equipe anestésica do departamento de veterinária da UFV, em especial à Vanessa Guedes, pela ajuda imprescindível na execução desse projeto.

À Daise Nunes, por ter desenvolvido o modelo experimental do projeto e por ter ajudado em todas as fases do mesmo, inclusive abdicando de finais de semana e momentos de lazer com sua família durante o experimento.

À Bárbara Okano, por ter sido essencial para a execução do projeto desde o cuidado com os animais no biotério até o auxílio nas cirurgias. Você merece ter muito sucesso.

À Professora Betânia Monteiro, que mesmo de longe, ajudou a resolver todos os problemas que foram surgindo ao longo do experimento.

À Eveline Caetano, pela ajuda no experimento.

À Marta Rocha Araújo, pela ajuda no experimento e por ter colaborado gentilmente na preparação do material para avaliação histológica.

Ao Professor João Carlos Pereira, pelo auxílio na avaliação histológica do material do experimento.

A todos os professores do DVT/UFV pelos ensinamentos e convivência, especialmente aos professores Lissandro Gonçalves, Paulo Renato Costa e Andrea Pacheco. Serei eternamente grata por tudo que aprendi com vocês.

À querida Rosinéia, por quem tenho extremo apreço, por todas as vezes que me tranquilizou e orientou pelo telefone e por todos os sorrisos quando entrei com o coração partido dentro da secretaria da pós-graduação.

À Fabrícia Hallack, Renata Cruz e Letícia Calovi pela amizade e apoio. Obrigada por me receberem em suas casas, me hospedando com todo o conforto, sempre que eu precisei ficar em Viçosa.

Ao amigo José Olímpio Tavares de Souza pela ajuda na interpretação dos dados do experimento.

À Professora Juliane Lopes, pelo auxílio na análise estatística dos dados do experimento.

Aos funcionários do DVT/UFV, especialmente à Carmen e à Maria José, pela ajuda com o material do experimento e com o preparo do centro cirúrgico.

Aos colegas da pós-graduação, que compartilharam suas experiências comigo durante as disciplinas.

Aos meus colegas de trabalho na UNIPAC/JF que durante os últimos quatro anos trocaram seus horários de aula comigo para permitir que eu pudesse honrar meus compromissos na UFV.

À minha família, pela torcida e orações.

Aos animais, razão da minha busca constante pelo saber.

CONTEÚDO

	Página
LISTAS DE FIGURAS	vi
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1 Introdução	01
2 Material e Métodos	09
2.1 Animais	09
2.2 Indução do Bloqueio Atrioventricular Completo	10
2.3 Grupos Experimentais, Alíquotas Celulares e Vias de Administração	13
2.4 Cultura e Diferenciação das Células-Tronco Mesenquimais para a Fase de Implantação <i>in vivo</i>	15
2.4.1 Cultura Celular	15
2.4.2 Caracterização Celular	16
2.5 Marcação das Células-Tronco Mesenquimais (nanomarcação)	17
2.6 Avaliação Eletrofisiológica	18
2.7 Avaliação Histológica	19
2.8 Análise Estatística	20
3 Resultados e Discussão	20
4 Conclusões	32
5 Referências Bibliográficas	33

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Esquema de traçado de ECG normal com destaque para a onda P, o complexo QRS e a onda T e os intervalos PR e QT.	03
Figura 2	Eletrocardiograma de cão mostrando ritmo sinusal normal e frequência de 140/min, com indicação da onda P, do complexo QRS e da onda T (25 mm/s e 10mm/mV).	03
Figura 3	Eletrocardiograma de cão demonstrando alteração compatível com bloqueio atrioventricular de primeiro grau. Presença de intervalo P-R constantemente prolongado (50 mm/s e 10 mm/mV).	04
Figura 4	Eletrocardiograma de cão demonstrando alteração compatível com bloqueio atrioventricular de segundo grau (Mobitz Tipo II). Presença de onda P não conduzida (25 mm/s e 5 mm/mV).	05
Figura 5	Representação de eletrocardiograma de cão demonstrando alteração compatível com bloqueio atrioventricular de terceiro grau com ritmo de escape ventricular de 45/min (50 mm/s e 10 mm/mV).	05
Figura 6	Fotografias das principais etapas do procedimento de ablação atrioventricular. (A) Visualização do coração após deslocamento cranial do timo e secção do pericárdio. (B) Afastamento lateral do átrio direito e inserção da agulha paralelamente à raiz da artéria aorta e em direção ao ápice do coração. (C) Estabelecimento de contato entre a ponteira do eletrocautério e a agulha, previamente inserida, gerando o bloqueio atrioventricular.	12
Figura 7	Imagens de microscopia de fluorescência. (A) Fotomicrografia da CTM após nanomarcagem com Q-tracker®, demonstrando a fluorescência citoplasmática vermelha emitida pelas células em suspensão. (B) Identificação das células transplantadas pós-lesão. As setas indicam as CTM presentes no pulmão do grupo 24 horas pós-lesão. Os locais marcados com * representam os alvéolos pulmonares. Os núcleos (N) foram contra-corados com DAPI (azul).	21
	Eletrocardiograma do animal 5 do grupo tratado com células-tronco indiferenciadas por via intravenosa	24

Figura 8	obtido, imediatamente antes da indução do bloqueio atrioventricular, demonstrando condução elétrica cardíaca normal, com relação de ondas P e complexos QRS de 1:1.	
Figura 9	Eletrocardiograma do animal 5 do grupo tratado com células-tronco indiferenciadas, por via intravenosa, obtido após a indução do bloqueio atrioventricular de terceiro grau, demonstrando condução elétrica cardíaca anormal, com relação de ondas P e complexos QRS de 6:1.	25
Figura 10	Eletrocardiograma do animal 5 do grupo tratado com células-tronco indiferenciadas, por via intravenosa, obtido 30 dias após a indução do bloqueio atrioventricular, demonstrando condução elétrica cardíaca ainda anormal, mas com redução da relação de ondas P e complexos QRS para 3:1.	25
Figura 11	Frequências cardíacas comparadas em três momentos distintos: antes da indução do bloqueio atrioventricular (1), logo após a indução do bloqueio atrioventricular (2), e 15 ou 30 dias após a indução do bloqueio atrioventricular (3). Onde, CTD – grupo tratado com células-tronco mesenquimais pré-induzidas à cardiomiócitos; CTI – grupo tratado com células-tronco mesenquimais indiferenciadas; PBS – grupo controle.	26
Figura 12	Número de ondas P dissociadas comparadas em três momentos distintos: antes da indução do bloqueio atrioventricular (1), logo após a indução do bloqueio atrioventricular (2), e 15 ou 30 dias após a indução do bloqueio atrioventricular (3). Onde, CTD – grupo tratado com células-tronco mesenquimais pré-induzidas à cardiomiócitos; CTI – grupo tratado com células-tronco mesenquimais indiferenciadas; PBS – grupo controle.	27

RESUMO

Daibert, Ana Paula Falci, Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2013.
Aplicação de células-tronco mesenquimais em ratos com bloqueio atrioventricular completo experimental. Orientador: Ricardo Junqueira Del Carlo.

A falha da propagação do impulso atrioventricular é um grave problema clínico denominado bloqueio atrioventricular. Atualmente, a única alternativa para o tratamento desta doença é o implante de marcapasso, que possui limitações como vida útil limitada da bateria, perfurações cardíacas e formação de trombos. Por isso, a busca por terapias alternativas e, dentre elas a celular. Os objetivos deste estudo foram verificar os efeitos da aplicação, intravenosa e intramiocárdica, de células-tronco mesenquimais (CTMs) indiferenciadas e pré-induzidas à cardiomiócitos, derivadas de tecido adiposo, na condução elétrica cardíaca de ratos com bloqueio atrioventricular completo induzido. Foram utilizados 78 ratos saudáveis, submetidos à ablação do nodo atrioventricular com sistema diatérmico monopolar. Os animais foram separados em 13 grupos de 6 animais, de acordo com o tipo celular recebido (CTMs indiferenciadas ou pré-induzidas à cardiomiócitos), com a via de administração das células (intravenosa ou intramuscular), e com o tempo de observação após a indução da lesão (15 ou 30 dias). Os parâmetros avaliados foram frequência cardíaca e relação do número de ondas P e complexos QRS, ambos analisados por eletrocardiograma. Não foi constatado que algum tipo de terapia utilizada tenha interferido positivamente na condução elétrica cardíaca, entre os grupos avaliados. Contudo, a análise individual dos animais revelou tendência de

melhora da condução elétrica daqueles tratados com CTMs indiferenciadas por via intravenosa. Conclui-se que o tratamento proposto não é capaz reverter completamente o bloqueio atrioventricular induzido, independentemente do tipo celular, da via de administração ou do tempo de observação. Há tendência à melhora das propriedades eletrofisiológicas no grupo tratado com CTMs indiferenciadas e aplicadas por via intravenosa, provavelmente por ação parácrina. A reparação de lesão térmica por tecido fibrótico, mesmo que em menor quantidade após terapia celular, não possibilita o retorno ao padrão normal de condução, uma vez que o tecido condutor cardíaco é muito especializado.

Palavras-chave: células-tronco, nodo atrioventricular, bradiarritmias, medicina reparativa.

ABSTRACT

Daibert, Ana Paula Falci, Universidade Federal de Viçosa, september of 2013.
Application of mesenchymal stem cells in rats with experimental complete atrioventricular block. Adviser: Ricardo Junqueira Del Carlo.

The atrioventricular block (AV block) is a serious clinical problem due to failure of the proper cardiac impulse propagation. The current treatment of the AV block is the use of artificial pacemakers, which has several limitations such as limited battery life, cardiac perforations and thrombus formation. Therefore, there are several authors searching for alternative therapies for this problem, like cell therapy. The aim of this study was to verify the effects of treatment with adipose-derived mesenchymal stem cells (MSCs), undifferentiated and pre induced in cardiomyocytes, administered by two different routes (intravenous and intramuscular) in rats with induced complete AV block. The disease was induced with monopolar diathermy system in 78 rats, which were divided in 13 groups of 6 animals each, according to the cell type received, the administration route and the observation period after injury induction (15 or 30 days). The heart rate and the ratio of P waves and QRS complex were analyzed by electrocardiogram. It was not statistically observed that any specific treatment had a positive effect on cardiac electrical conduction. However, the individual analysis of each animal showed a trend of improvement of the electrical conduction in animals treated with undifferentiated MSCs intravenously administered with a tendency of reestablishment of the standard 1:1 ratio between P waves and QRS complexes. We concluded that the proposed treatment is not able to completely reverse the induced AV block, regardless of

the cell type, administration route or observation period. There is a trend to improvement of electrophysiological properties in the group treated with undifferentiated MSCs and applied intravenously, probably by paracrine action. The thermal damage repair by fibrotic tissue, although in lesser amount after cell therapy, does not allow a return to normal cardiac conduction pattern, since the cardiac conductive tissue is very specialized.

Keywords: stem cells, atrioventricular node, bradyarrhythmias, reparative medicine.

1 INTRODUÇÃO

O impulso elétrico cardíaco gerado no nodo sinoatrial (NSA) é rapidamente conduzido pelos átrios até o nodo atrioventricular (NAV), quando inicia-se nova fase de condução rápida pelo feixe de His, determinando a contração ventricular. O potencial de ação, iniciado por um grupo de células no centro no NSA, espalha-se para as regiões mais periféricas e, em seguida, para o tecido atrial e para o restante do coração (Opie e Downey, 2004; Yokokawa et al., 2008).

O feixe de His, constituído de ramos direito e esquerdo, origina no NAV e penetra no tecido conjuntivo que separa átrios e ventrículos. Suas células, denominadas células de Purkinje, são adaptadas para condução rápida do impulso elétrico, permitindo que todas as células dos ventrículos sejam excitadas quase que simultaneamente (Opie e Downey, 2004).

A falha da propagação do impulso atrioventricular é um grave problema clínico denominado bloqueio atrioventricular (BAV), e acontece quando os impulsos atriais são conduzidos com atraso ou não são conduzidos para os ventrículos (Choi et al., 2006). A incidência aumenta com a idade e, embora raro, pode ter origem congênita (Vogler et al., 2012). Outras causas são aumento do tônus vagal, fibrose do sistema de condução, cardiomiopatia hipertrófica ou infiltrativa por neoplasias, intoxicação digitálica, endocardite bacteriana, infarto do miocárdio, doença de Chagas ou de *Lyme*, desequilíbrios eletrolíticos (Yokokawa et al., 2008; Lima, 2012), intervenções cirúrgicas e doença materna autoimune durante a gestação (Choi et al., 2006).

O eletrocardiograma (ECG) representa, de forma gráfica, a despolarização e a repolarização do músculo cardíaco e fornece informações, principalmente, sobre a frequência cardíaca, ritmo e condução intracardíaca (Martin, 2010).

No ECG normal a primeira fase da ativação elétrica cardíaca (despolarização do NSA e das células atriais vizinhas) é representada pela onda P, que é uma deflexão positiva no modo II do coração normal. Quando a despolarização atinge o nodo atrioventricular (NAV), que se localiza próximo ao óstio do seio coronário no átrio direito, a velocidade de propagação da onda diminui. O objetivo disso é dar tempo para o preenchimento ventricular durante a contração atrial (Katz, 2000).

Na sequência, a corrente passa por outros tecidos especializados não musculares como o feixe de His, os ramos do feixe e as fibras de Purkinje, que ativam o septo interventricular e conseqüentemente as paredes dos ventrículos direito e esquerdo. O intervalo entre a ativação do NAV e a condução pelo sistema His-Purkinje é registrado apenas como uma linha isométrica, sem potencial mensurável, formando o segmento PR. A medida que a onda passa pelos ventrículos, o ECG registra as ondas Q (pequena deflexão negativa), R (grande deflexão positiva) e S (deflexão negativa), formando o complexo QRS. O complexo QRS acontece ao mesmo tempo que a repolarização atrial, impedindo a visualização do registro elétrico da repolarização dos átrios. Um curto segmento de potencial isométrico (ST) segue o complexo QRS, e representa a fase de *plateau* do potencial de ação. A repolarização dos ventrículos resulta em uma deflexão positiva, a onda T, que em geral é menor em amplitude do que o complexo QRS, mas muito mais larga, indicando que a

fase de repolarização ventricular é mais longa do a fase de despolarização [Figuras 1 e 2] (Sabir et al., 2008; Martin, 2010; Farraj et al., 2011).

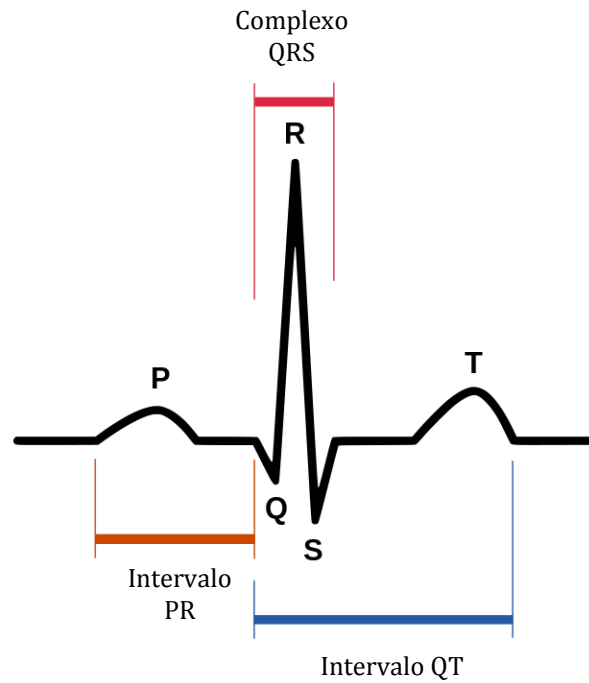


Figura 1. Esquema de traçado de ECG normal com destaque para a onda P, o complexo QRS e a onda T e os intervalos PR e QT (Fonte: Daibert, 2013).

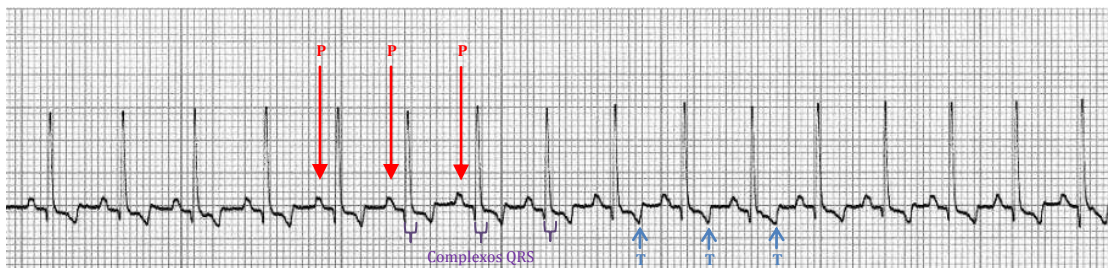


Figura 2. Eletrocardiograma de cão mostrando ritmo sinusal normal e frequência de 140/min, com indicação da onda P, do complexo QRS e da onda T [25 mm/s e 10mm/mV] (adaptado de Martin, 2010).

Com base na análise do ECG, o BAV é classificado em primeiro, segundo e terceiro grau. No primeiro, existirá um prolongamento anormal do intervalo PR. Todas as ondas P serão seguidas por complexos QRS, mas com um intervalo PR constantemente prolongado (Figura 3). Pode ocorrer por atraso na condução atrial, no NAV ou no sistema His-Purkinje, mas a causa mais comum é o atraso na condução no NAV (Vogler et al., 2012).



Figura 3. Eletrocardiograma de cão demonstrando alteração compatível com bloqueio atrioventricular de primeiro grau. Presença de intervalo P-R constantemente prolongado [50 mm/s e 10 mm/mV] (Fonte: Martin, 2010).

O BAV de segundo grau ocorre quando a condução falha de maneira intermitente em passar através do nodo atrioventricular (Martin, 2010) e, de acordo com os achados do ECG, poderá ser classificado em tipo I (Mobitz I) e tipo II (Mobitz II). O primeiro é caracterizado por progressivo prolongamento do intervalo PR antes de uma onda P não conduzida. A primeira onda P conduzida, após a onda P não conduzida, possui o intervalo PR mais curto do ciclo. O tipo II (Figura 4) é definido como a ocorrência de uma única onda P não conduzida, associada com intervalos PR constantes antes e após o impulso bloqueado [intervalos PP e RR são constantes] (Vogler et al., 2012).

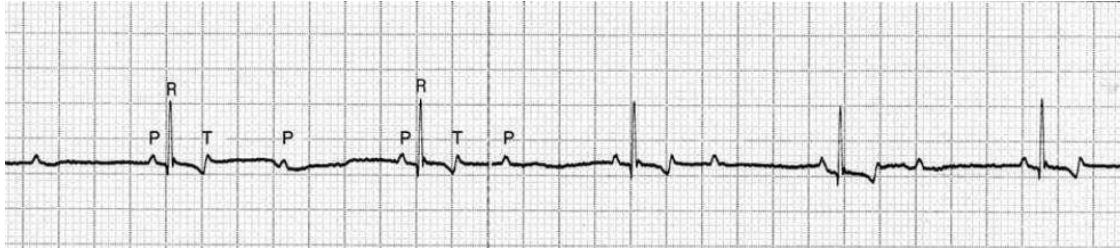


Figura 4. Eletrocardiograma de cão demonstrando alteração compatível com bloqueio atrioventricular de segundo grau (Mobitz Tipo II). Presença de onda P não conduzida [25 mm/s e 5 mm/mV] (Fonte: Martin, 2010).

O BAV de terceiro grau, também denominado completo, pode localizar-se no NAV, no feixe de His ou nos ramos direito ou esquerdo e é caracterizado pela dissociação de cada onda P, ou seja, na falência da condução do impulso atrial para os ventrículos, resultando em completa dissociação atrioventricular com frequências atriais maiores que as ventriculares [Figura 5] (Vogler et al., 2012). A consequência disso é o surgimento de um marcapasso alternativo abaixo do ponto do bloqueio, culminado na ocorrência de ritmo de escape juncional ou em ritmo de escape ventricular, dependendo do ponto anatômico do bloqueio atrioventricular (Martin, 2010).

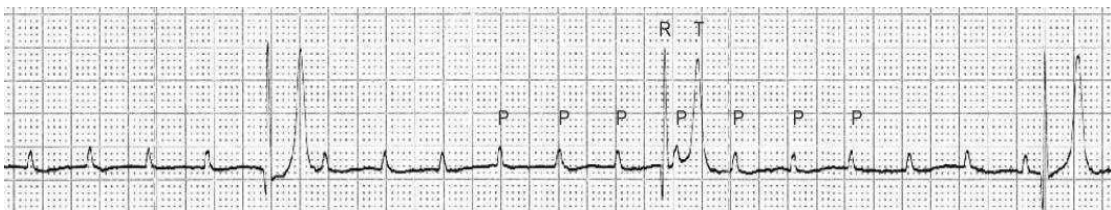


Figura 5. Representação de eletrocardiograma de cão demonstrando alteração compatível com bloqueio atrioventricular de terceiro grau com ritmo de escape ventricular de 45/min [50 mm/s e 10 mm/mV] (Fonte: Martin, 2010).

Boa parte dos pacientes com BAV, especialmente aqueles sintomáticos e portadores de bloqueios completos, são tratados com implantação de marcapasso (Yokokawa et al., 2008) que, apesar dos bons resultados, apresenta complicações como limitada vida útil da bateria, perfurações cardíacas, disfunções valvares, função ventricular diminuída e formação de trombos (Choi et al., 2006).

Devido aos problemas e limitações relacionados ao marcapasso convencional, o marcapasso ideal é o biológico, que deve ser de origem autógena, de fácil fabricação e implantação, sem risco de induzir desenvolvimento tumoral e sem potencial arritmogênico. Além disso, deve funcionar por toda a vida do paciente, responder a estímulos autônomos e permitir a difusão ordenada e seqüencial de estímulos elétricos das câmaras cardíacas superiores para as inferiores (Choi et al., 2006).

Yokokawa et al. (2008) aventaram a possibilidade da utilização da terapia com células-tronco mesenquimais (CTMs) para tratamento de distúrbios de condução elétrica cardíaca, considerando que alterações degenerativas no NAV ou no feixe de His podem ser causas de BAV.

A terapia celular, especialmente a que envolve CTMs, tem sido descrita como de grande potencial para o tratamento de doenças cardíacas, seja na regeneração de cardiomiócitos (Rota et al., 2007; Tsuji et al., 2010); na promoção da angiogênese via efeito parácrino (Kamihata et al., 2001; Tang et al., 2009), na diminuição da fibrose cardíaca (Mias et al., 2007) ou na prevenção da apoptose dos cardiomiócitos residentes (Sadat et al., 2007).

Segundo Monteiro et al. (2010), CTMs estão presentes em regiões perivasculares de todos os tecidos adultos, em pequenas quantidades, incluindo tecido adiposo, periósteo, tecido muscular, órgãos parenquimatosos e na medula óssea. São células pluripotentes, capazes de se diferenciar e produzir outros tipos celulares. A plasticidade das CTMs ainda não é completamente compreendida, sendo a transdiferenciação, a fusão e o efeito parácrino as principais hipóteses propostas.

Na transdiferenciação ocorre alteração da expressão gênica para uma linhagem celular completamente diferente. Pode ocorrer de forma direta, por alteração do seu citoesqueleto e síntese proteica, ou indiretamente por desdiferenciação em uma célula-tronco mais primitiva seguida pela rediferenciação no tipo celular desejado (Monteiro et al., 2010). Na fusão as CTMs unem-se com as células alvo, assumindo o padrão de expressão gênica da célula adulta à qual se uniu. Contudo, o mecanismo mais aceito atualmente é o parácrino, caracterizado pela capacidade de secreção de grande quantidade de quimiocinas, que também expressam receptores para citocinas e fatores de crescimento. Assim, as CTMs conseguem interagir com o nicho celular e promover indução, de acordo com a sinalização química (Meirelles et al., 2006; Takahashi et al., 2007; Monteiro et al., 2010).

In vitro, CTMs podem ser induzidas à diferenciação em cardiomiócitos pelo tratamento com 5-azicitidina (Xu et al., 2004; Carvalho et al., 2013). *In vivo*, CTMs diretamente injetadas na área de lesão cardíaca induziram regeneração do miocárdio e melhora da função cardíaca (Shake et al., 2002).

Segundo Grauss et al. (2008), o transplante de CTMs só não proporciona maiores resultados na melhora da função cardíaca porque a população de CTMs é heterogênea e apenas uma pequena fração é propensa à diferenciação em cardiomiócitos. Portanto, torna-se importante a distinção das subpopulações celulares com o uso de marcadores específicos antes do transplante (Liu et al., 2009).

De acordo com a sociedade internacional de terapia celular, pelo menos três marcadores de superfície são recomendados para a identificação de CTMs: CD73, CD90 e CD105 (Dominici et al., 2006). Ainda, de acordo com Liu et al. (2009), CTMs derivadas do tecido adiposo e CD73⁺ são altamente indiferenciadas e possuem alto potencial para diferenciação em cardiomiócitos *in vitro*.

Kehat et al. (2004) relataram a diferenciação de cardiomiócitos, espontaneamente excitáveis, a partir de células-tronco embrionárias humanas e demonstraram que eles se integraram estrutural, elétrica e mecanicamente com as células cardíacas de ratos, *in vitro*. Além disso, demonstraram que estes cardiomiócitos, quando transplantados, sobreviveram, se integraram e funcionaram em corações de suínos com BAV completo.

Guo et al. (2006) relataram o desenvolvimento de tecido cardíaco a partir de células-tronco embrionárias de ratos e observaram contratilidade espontânea, *in vitro* e *in vivo*.

Choi et al. (2006) desenvolveram um tecido tridimensional, em base colagenosa, contendo células precursoras miogênicas e implantaram em

corações de ratos adultos, com evidências de condução atrioventricular permanente em 1/3 dos animais tratados.

Os objetivos deste trabalho foram verificar os efeitos da aplicação, intravenosa (IV) e intramiocárdica (IM), de células-tronco mesenquimais indiferenciadas e pré-induzidas à cardiomiócitos, na condução elétrica cardíaca de ratos com bloqueio atrioventricular completo induzido.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Os animais foram alojados em gaiolas individuais e mantidos a 23°C, com 12h de ciclo luz/escuro, alimentados com ração comercial e água *ad libitum*. Todos os procedimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), protocolo número 14/2011, da Universidade Federal de Viçosa.

Para a formação dos grupos experimentais foram utilizados 78 ratos adultos Wistar, machos, com peso médio de 280g e aproximadamente 10 semanas de vida. Já para a coleta de tecido adiposo e preparação das células para administração nos animais (terapia celular), foram utilizados três ratos Wistar machos, de 4 semanas de vida.

2.2 Indução do Bloqueio Atrioventricular Completo

A indução do bloqueio atrioventricular completo foi realizada segundo modelo dependente de toracotomia, pericardiotomia parcial, abordagem epicárdica e sistema diatérmico monopolar (Cunha et al., 2012).

No pré-operatório imediato foi administrada antibioticoterapia (enrofloxacina, 10 mg/kg, IP, dose única). Os animais foram anestesiados em câmara de indução com isoflurano 3% e oxigênio 100%, em fluxo constante de 1L/minuto. Posteriormente, foram mantidos em decúbito dorsal e intubados com auxílio de um sistema para pequenos animais composto de fibra óptica (*BioLite, BioTex, Houston, TX, USA*) e um cateter intravenoso, medindo entre 16 e 20 gauges e 2,54 cm de comprimento, adaptado como sonda. A frequência de 20 movimentos respiratórios/minuto e a ausência de tônus mandibular serviram de parâmetros para determinar o momento ideal da intubação. Na sequência, os animais foram submetidos à ventilação por pressão positiva intermitente (*Inspira Advanced Safety Single Animal Pressure/Volume Controlled Ventilators, Harvard Apparatus, Massachusetts, USA*) e foi estabelecida a frequência respiratória entre 50 e 60 movimentos/minuto, com pressão inspiratória entre 16 e 18 cm H₂O e relação inspiração/expiração de 1:1. A anestesia foi mantida com isoflurano diluído em oxigênio 100%, com concentração ajustada para manter o plano anestésico adequado ao procedimento cirúrgico.

Após imobilização em decúbito dorsal sob mesa aquecida, tricotomia, obtenção do eletrocardiograma pré-operatório e antissepsia da região torácica, procedeu-se a esternotomia mediana. O timo foi temporariamente deslocado

cranialmente e o pericárdio parcialmente seccionado com uma tesoura expondo a região basal do coração (Figura 6A). O átrio direito (AD) foi afastado lateralmente com o auxílio de uma haste flexível e algodão (Cotonete, Johnson & Johnson, São Paulo) e o sulco entre o AD e a raiz da aorta foi localizado. Esta manobra expôs uma deposição de gordura encontrada adjacente e no aspecto adventício da raiz da aorta, correspondente à comissura entre o seio não-coronariano e o seio coronariano direito. Uma agulha de acupuntura (0,25mm x 30 mm), dobrada a 3 mm de sua extremidade formando um ângulo de 90°, foi inserida 1 mm dorsal à deposição de gordura na raiz da aorta, paralelamente a esta, e em direção ao ápice do coração (Figura 6B), cessando, momentaneamente, a condução através do nodo AV. Esta interrupção da condução elétrica no NAV foi confirmada pela visualização de pausa na contração ventricular ou ocorrência de arritmia paroxística. Estes eventos também foram observados no ECG. Outro achado confirmatório do posicionamento adequado da agulha no miocárdio foi a ausência de sangramento no ponto de inserção da agulha.

Imediatamente após a introdução da agulha e verificação da interrupção transitória da condução atrioventricular, a ponteira do eletrocautério (Bisturi eletrônico, BP 150, EMAI, São Paulo) foi colocada em contato com a agulha (Figura 6C), gerando a ablação do NAV. O eletrocautério foi regulado no modo coagulação e na potência número 2.

Eletrocardiogramas foram registrados antes da abertura do tórax, para a confirmação de ausência de alterações prévias, e após a cauterização. Devido à interferência da cauterização no eletrocardiógrafo, os eletrodos foram removidos durante a ativação do eletrocautério e reposicionados

imediatamente após o procedimento. Nos casos em que BAV estava incompleto ou transitório, cauterizações adicionais foram realizadas. Após a obtenção do BAV completo, os animais foram monitorados por ECG até o fechamento do tórax ($5\pm 2,5$ minutos). A indução do BAV foi considerada bem sucedida quando a dissociação atrioventricular foi persistente.

Para analgesia pós-operatória foi utilizado tramadol (4 mg/kg IP) a cada 6 horas por 24 horas. A recuperação anestésica foi feita em caixa aquecida por aproximadamente 1 hora.

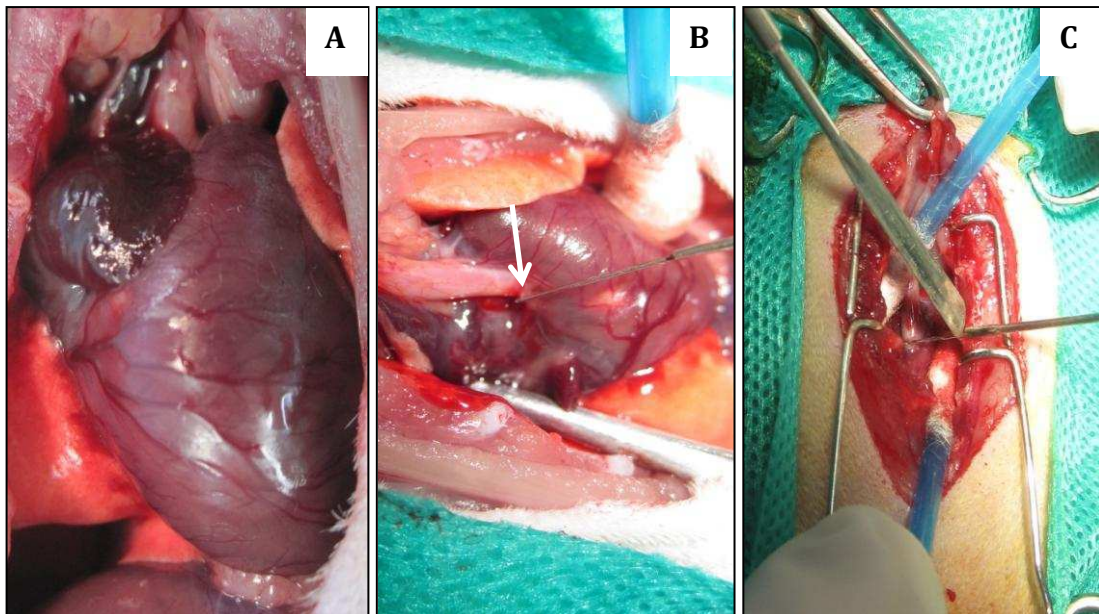


Figura 6. Fotografias das principais etapas do procedimento de ablação atrioventricular. (A) Visualização do coração após deslocamento cranial do timo e secção do pericárdio. (B) Afastamento lateral do átrio direito e inserção da agulha paralelamente à raiz da artéria aorta (seta) e em direção ao ápice do coração. (C) Estabelecimento de contato entre a ponteira do eletrocautério e a agulha, previamente inserida, gerando o bloqueio atrioventricular.

2.3 Grupos Experimentais, Alíquotas Celulares e Vias de Administração

Os animais foram separados aleatoriamente em 13 grupos, de acordo com o material recebido no tratamento (CTMs indiferenciadas, CTMs pré-induzidas a cardiomiócitos ou PBS), com a via de administração (IV ou IM), e com o tempo pós-operatório de avaliação (15 ou 30 dias). Dos 13 grupos, quatro receberam PBS e foram considerados grupos controle. As alíquotas celulares administradas foram constantes ($1,0 \times 10^7$ células $\times 0,5 \text{ mL}^{-1}$), e a administração era feita imediatamente após a indução do BAV. Nos animais que receberam as células por via intramiocárdica, a aplicação era feita ao redor da área presumível do nodo atrioventricular. Os grupos experimentais e suas características estão listados abaixo:

Grupo 1 (n=6): ratos com BAV completo, tratados com PBS, IV, e avaliados por 15 dias.

Grupo 2 (n=6): ratos com BAV completo, tratados com PBS, IV, e avaliados por 30 dias.

Grupo 3 (n=6): ratos com BAV completo, tratados com PBS, IM, e avaliados por 15 dias.

Grupo 4 (n=6): ratos com BAV completo, tratados com PBS, IM, e avaliados por 30 dias.

Grupo 5 (n=6): ratos com BAV completo, tratados com CTMs indiferenciadas, IV, e avaliados por 15 dias.

Grupo 6 (n=6): ratos com BAV completo, tratados com CTMs indiferenciadas, IV, e avaliados por 30 dias.

Grupo 7 (n=6): ratos com BAV completo, tratados com CTMs indiferenciadas, IM, e avaliados por 15 dias.

Grupo 8 (n=6): ratos com BAV completo, tratados com CTMs indiferenciadas, IM e avaliados por 30 dias.

Grupo 9 (n=6): ratos com BAV completo, tratados com CTMs pré-induzidas à cardiomiócitos, IV, e avaliados por 15 dias.

Grupo 10 (n=6): ratos com BAV completo, tratados com CTMs pré-induzidas à cardiomiócitos, IV e avaliados por 30 dias.

Grupo 11 (n=6): ratos com BAV completo, tratados com CTMs pré-induzidas à cardiomiócitos, IM e avaliados por 15 dias.

Grupo 12 (n=6): ratos com BAV completo, tratados com CTMs pré-induzidas à cardiomiócitos, IM e avaliados por 30 dias.

Grupo 13 (n=6): ratos com BAV completo receberam *pellet* ressuspendido em 1,0 mL de PBS em alíquotas de 1×10^7 células, marcadas com *Qtracker Cell Labeling 655*[®], por via intravenosa. Os animais foram submetidos à eutanásia, 24 horas após a lesão, e o coração, os pulmões e o baço foram removidos para validação da técnica de marcação por meio da pesquisa das células marcadas.

2.4 Cultura e Diferenciação das Células-tronco Mesenquimais para a Fase de Implantação *in vivo*

2.4.1 Cultura Celular

Para coleta do tecido adiposo, os animais foram submetidos à eutanásia em câmara anestésica, com inalação passiva de isoflurano até a sobredosagem. Foi realizada tricotomia do abdômen e membros pélvicos e, em seguida, os ratos foram transferidos para capela de fluxo horizontal. Foi realizada incisão abdominal na linha branca, exposição do peritônio e remoção da gordura inguinal. O material coletado foi cortado em pequenos pedaços, lavado duas vezes em solução de PBS 0,15M, pH = 7,2, com penicilina, estreptomicina e anfotericina B (PSA - Gibco, Paisley, UK) e armazenado em solução de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium - Gibco*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - Gibco) e PSA. Realizou-se digestão enzimática do tecido adiposo com solução de colagenase do tipo I (Sigma, St Louis, MO, USA), por 60 minutos, em estufa a 37°C, 5% de CO₂, agitado a cada 15 minutos. Posteriormente, foi realizada centrifugação a 390 giros durante 10 minutos e o precipitado foi ressuspendido em DMEM completo após descarte do sobrenadante. As células foram plaqueadas, inicialmente, na concentração de 5x10⁶ células em frascos de cultura celular de 75 mm² (Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha) e mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂.

As células foram mantidas em cultura com repiques sucessivos até a quarta passagem para serem submetidas à caracterização celular por

citometria e/ou até a quinta passagem, quando, então, foram submetidas às etapas de diferenciação.

2.4.2 Caracterização Celular

Imunofenotipagem

As células da quarta passagem, derivadas de tecido adiposo, foram caracterizadas por citometria de fluxo através da análise de expressão de moléculas de superfície celular CD 73 (anti-CD73 clone 5 F/B9 mouse - AbCam Cambridge, Massachusetts, EUA), CD 54 (anti-CD54 clone 1A29 mouse - AbCam), CD 90 (anti-CD90 clone Ox-7 mouse - AbCam) e CD 45 (anti-CD45 clone 69 mouse - BD Bioscience, San Jose, Califórnia, EUA), utilizando citômetro de fluxo FACScan e software CellQuest®, obtendo-se 30.000 eventos por amostra testada.

Diferenciação Osteogênica

Após a quinta passagem, as células aderentes foram desprendidas com tripsina, contadas e replaqueadas em placa de 6 poços (TPP - Zollstrasse, Trasadingen, Suíça), com lamínulas de 22 mm de diâmetro (Sarstedt), com meio de cultura DMEM enriquecido com 10% de SFB, 10^{-8} mol/mL de dexametasona (Sigma), 5,0 µg/mL de ácido ascórbico 2-fosfato (Sigma), 10,0 mmol/L de β-glicerofosfato (Sigma) e incubado a 37°C por quatro semanas. No

30º dia as lamínulas foram lavadas em PBS e coradas pelo método de Von Kossa para observar a deposição de cálcio.

Diferenciação Cardiogênica

As células na quinta passagem foram desprendidas com tripsina, contadas e replaqueadas na concentração de 1×10^4 células por lamínula, em meio de cultura DMEM enriquecido com 10% de SFB, em placas de cultivo de seis poços, contendo lamínulas de 22 mm de diâmetro (Sarstedt), e incubadas em estufa.

Após 24 horas do plaqueamento, o meio de cultura foi retirado, os poços lavados com solução de PBS e as placas foram submetidas ao protocolo de diferenciação cardiogênica pelo tratamento com 5-azicitidina por 24 horas. Por apresentarem modificações moleculares semelhantes ao cardiomiócito, mas não demonstrarem atividade funcional espontânea, admitiu-se que as MSC foram pré-induzidas à cardiomiócitos (Carvalho et al., 2013).

2.5 Marcação das Células-Tronco Mesenquimais (nanomarcção)

Para a validação da metodologia de terapia celular foram utilizadas CTMs indiferenciadas, na quinta passagem, na concentração de 1×10^7 células/mL de PBS por animal.

As células foram previamente incubadas por 60 minutos, a 37°C, com *Qtracker Cell Labeling 655*[®] (Invitrogen, California, EUA), segundo recomendações do fabricante. As células marcadas foram tripsinizadas e centrifugadas para a obtenção do *pellet* celular. O *pellet* foi ressuspenso em PBS e alíquotas de 1×10^7 células foram preparadas em 1,0mL de PBS para posterior aplicação.

Este preparado foi administrado por via intravenosa em 6 animais, imediatamente após a indução do BAV. Os animais foram submetidos à eutanásia 24 horas após a lesão e o coração, os pulmões e o baço foram removidos para pesquisa das células marcadas.

Uma dose foi preparada para avaliação à fresco em microscópio de fluorescência para comprovar a eficácia da nanomarcagem.

2.6 Avaliação Eletrofisiológica

Todos os traçados eletrocardiográficos foram obtidos em derivação DII (PowerLab 4/30, AD Instruments PowerLab Data Acquisition System, com software LabChart), com os animais posicionados em decúbito dorsal.

Eletrocardiogramas (ECG) foram obtidos antes do início da cirurgia, para verificação da ausência de patologias cardíacas prévias, e após a cauterização do NAV, para comprovação do BAV completo.

Após 15 ou 30 dias da cirurgia (de acordo com o grupo experimental), os animais foram novamente anestesiados com isoflurano, e novos ECGs obtidos. Os traçados foram avaliados quanto à frequência ventricular, presença ou ausência de BAV completo e a relação entre o número de ondas P e os

complexos QRS. A frequência ventricular foi obtida mediante análise de um segmento de pelo menos 10 segundos e a média desse período usada para comparações entre os grupos. Tanto para a obtenção da frequência ventricular quanto para a contagem de ondas P dissociadas, foi selecionado um segmento livre de artefatos e de boa qualidade no terço médio do traçado do ECG.

2.7 Avaliação Histológica

Após a eutanásia por inalação de sobredose de isoflurano o coração foi removido, lavado com solução de PBS, seccionado em duas metades, imediatamente abaixo das valvas atrioventriculares, e fixado em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,2M até o processamento histológico.

Os fragmentos de coração foram incluídos em parafina e cortados em secções histológicas de 5 μ m de espessura. Quatro cortes histológicos seriados foram montados em lâminas de vidro. Duas preparações foram coradas pela técnica de Picro-Sirius Red e analisadas qualitativamente quanto à deposição de colágeno na região do nodo atrioventricular, em microscopia de luz (Olympus BX 53; Tokio, Japan). Os outros dois cortes obtidos foram corados com hematoxilina e eosina (HE) e avaliados quanto aos tipos celulares presentes.

2.8 Análise Estatística

As variáveis frequência cardíaca e relação de ondas P e complexos QRS (P/QRS) foram avaliadas pelo teste ANOVA com medidas repetidas, que permite verificar se houve efeito dos tratamentos realizados sobre a variável resposta, considerando que as medidas foram tomadas dos mesmos indivíduos em três momentos diferentes - antes da indução do BAV, logo após a indução do BAV; e 15 ou 30 dias após a indução do BAV - sendo estes momentos definidos como as sessões 1, 2 e 3 respectivamente.

Cada uma das variáveis resposta (frequência cardíaca e número de ondas P) foi analisada separadamente. Para fins de análise estatística, considerou-se o número de ondas P ideal igual a um. Qualquer valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Todas as análises foram realizadas com o software R (R Core Team, 2013).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As células previamente marcadas com o Q-tracker 655[®] incorporaram o marcador emitindo alta fluorescência citoplasmática (vermelho), com filtro de excitação WG. Os núcleos (azul) são mostrados com filtro de excitação WU, e a figura 7A representa essa marcação nas amostras a fresco.

As células nanomarcadas transplantadas foram encontradas no pulmão dos animais, 24 horas após administração (Figura 7B). Não foram encontradas células transplantadas no local da lesão. Estes resultados comprovaram a eficácia e manutenção da marcação das CTMs com Qtracker 655[®] e

confirmaram a viabilidade das células no momento do transplante. Atribuiu-se a não localização de células nanomarcadas transplantadas no local da lesão, bem como a sua identificação no pulmão, à via de administração intravenosa.

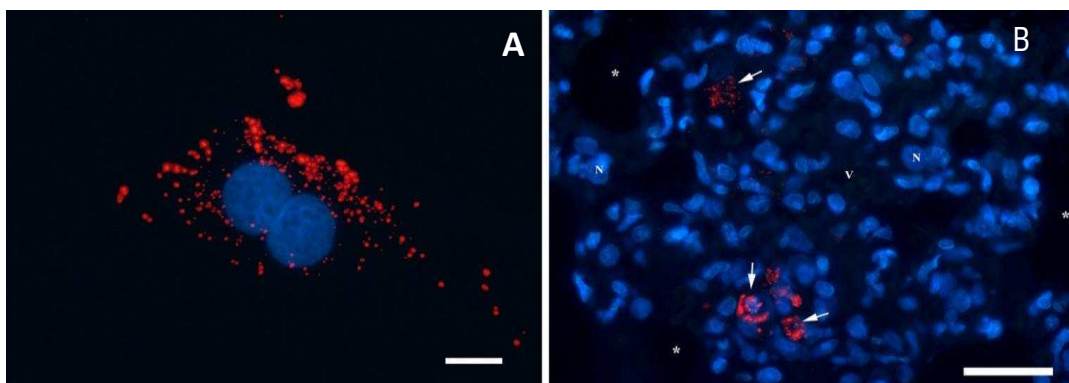


Figura 7. Imagens de microscopia de fluorescência. (A) Fotomicrografia da CTM após nanomarcagem com Q-tracker[®], demonstrando a fluorescência citoplasmática vermelha emitida pelas células em suspensão. Barra: 10 um. (B) Identificação das células transplantadas pós-lesão. As setas indicam as CTM presentes no pulmão do grupo 24 horas pós-lesão. Os locais marcados com * representam os alvéolos pulmonares. Os núcleos (N) foram contra-corados com DAPI (azul). Barra: 50 um (Araújo, 2013).

Segundo Karp e Teo (2009), o *homing* de CTMs expandidas em cultura e transplantadas por via intravenosa é ineficiente. Aparentemente isso deve-se à perda de receptores de quimiocinas e da adesão celular; e ao aumento do tamanho das CTMs em cultura, que, provavelmente, promove retenção dessas células em tecidos não específicos, incluindo o pulmão, e reduz o número de CTMs que atingem o sítio alvo.

A não identificação de CTMs nanomarcadas no local da lesão cardíaca, 24 horas após a aplicação intravenosa, não exclui a possibilidade da ação benéfica das células por meio do mecanismo de ação parácrino. De acordo com Zhou et al. (2009) e Mirotsoy et al. (2011), é evidente que a melhora da

função cardíaca após o transplante de células-tronco é atribuída principalmente à liberação de fatores parácrinos no microambiente do miocárdio lesado. Esses fatores são moléculas citoprotetoras que vão agir no sítio da lesão, mediando a reparação cardíaca e a identificação dessas moléculas é o objetivo de muitas pesquisas atuais (Urbich et al., 2005).

Apenas os animais que foram completamente bloqueados foram incluídos no experimento. A técnica utilizada para indução do BAV mostrou-se eficaz, embora, segundo Cunha et al. (2012) requisite treinamento da equipe. Durante a indução do BAV observaram-se algumas intercorrências como perfuração do ventrículo esquerdo durante esternotomia (n=1), ruptura do átrio direito com eletrocautério (n=1) e extubação endotraqueal durante o procedimento (n=1). A taxa de sobrevivência após a indução do BAV foi de 68,4%, e a mortalidade de alguns animais foi atribuída ao aumento da secreção bronquial impedindo a ventilação adequada (n=3) e diminuição do débito cardíaco a nível não compatível com a vida (n=16).

Existem vários modelos experimentais de indução de BAV publicados, variando o acesso (com ou sem toracotomia) e o método (ablação térmica ou cáustica). Fisher et al. (1966), Alabaster (1972) e Langberg et al. (1991) reportaram técnicas de indução do BAV sem toracotomia. Outros, como Wang et al. (1992), Lee et al. (1998) e Yokokawa et al. (2008) relataram a indução de BAV com aplicação de álcool 70%. MacIver et al. (2010) descreveram técnica de ablação atrioventricular via toracotomia e aplicação de formalina 10%.

Optou-se pela ablação térmica do NAV, com a utilização de sistema diatérmico monopolar associado a toracotomia, por presumir que a utilização de uma substância cáustica poderia interferir na atuação das CTMs, quando aplicadas no local da lesão, e pela necessidade de visualização da região presumível do NAV para aplicação das células no miocárdio. O sistema diatérmico monopolar causa uma injúria térmica, assim como os cateteres de radiofrequência, sendo uma opção muito mais barata e acessível que estes.

Neste estudo foram utilizados dois tipos de CTMs derivadas do tecido adiposo: indiferenciadas e pré-induzidas a cardiomiócitos pelo tratamento com 5-azicitidina. Segundo Carvalho et al. (2013) e Li et al. (2013a), CTMs podem se diferenciar em células semelhantes à cardiomiócitos *in vitro*. Uma série de fatores podem estimular a diferenciação de CTMs em cardiomiócitos como a proteína morfogenética óssea-2 e fator de crescimento de fibroblastos-4 (Yoon et al., 2005), ácido ascórbico e dexametasona (Shim et al., 2004) e co-cultura com cardiomiócitos (Peran et al., 2010). Contudo, o tratamento com 5-azicitidina é a estratégia mais frequentemente empregada para indução de CTMs a cardiomiócitos *in vitro* (Rangappa et al., 2003; Kadivar et al., 2006; Carvalho et al., 2013). Isto se deve ao fato de ser um método mais simples e de menor custo comparado ao desenvolvido por Planat-Bérnard et al. (2004), além dos mecanismos de ação da 5-azicitidina serem mais conhecidos (Burlacu, 2006; Burlacu et al., 2008).

As CTMs submetidas à diferenciação apresentaram modificações moleculares semelhantes a um cardiomiócito, mas não demonstraram atividade funcional espontânea. Então, admitiu-se que foram pré-induzidas à cardiomiócitos, apresentando características celulares para executar as funções de um cardiomiócito. O achado corrobora o encontrado por outros autores que relataram a possível necessidade de fatores fornecidos pelo “nicho cardíaco” para a completa diferenciação celular em cardiomiócito (Martin-Rendon et al., 2008; Loffredo et al., 2011; Carvalho et al., 2013; Li et al., 2013b).

As análises da FC e da relação entre o número de ondas P e dos complexos QRS (P/QRS) foram utilizadas para evidenciar características do BAV completo, como a bradicardia pronunciada e a dissociação de ondas P dos complexos QRS, ou seja, uma relação P:QRS > do que 1:1 (Vogler et al., 2012). Nestas circunstâncias, considerou-se melhora na condução elétrica a redução da relação P/QRS e o aumento da FC (Figuras 8, 9 e 10).

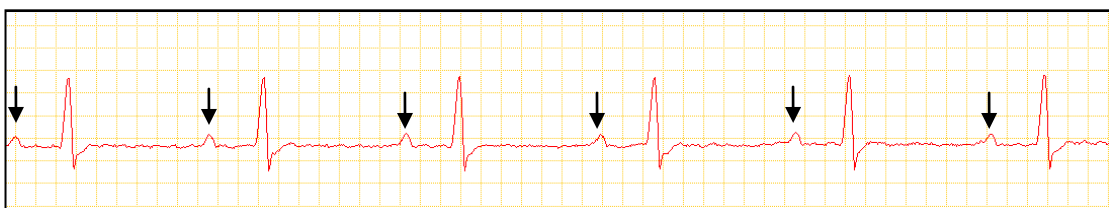


Figura 8. Eletrocardiograma do animal 5 do grupo tratado com células-tronco indiferenciadas por via intravenosa obtido, imediatamente antes da indução do bloqueio atrioventricular, demonstrando condução elétrica cardíaca normal, com relação de ondas P e complexos QRS de 1:1. Setas indicando ondas P.

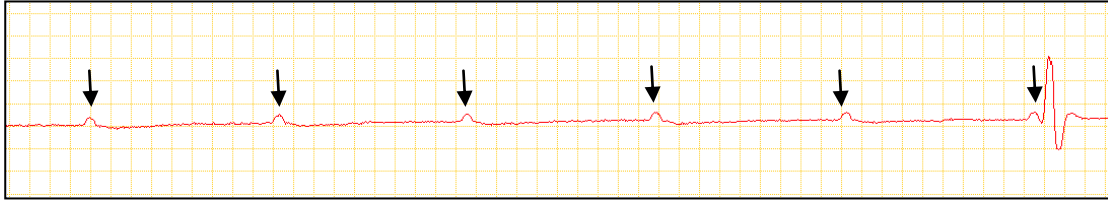


Figura 9. Eletrocardiograma do animal 5 do grupo tratado com células-tronco indiferenciadas, por via intravenosa, obtido após a indução do bloqueio atrioventricular de terceiro grau, demonstrando condução elétrica cardíaca anormal, com relação de ondas P e complexos QRS de 6:1. Setas indicando ondas P.

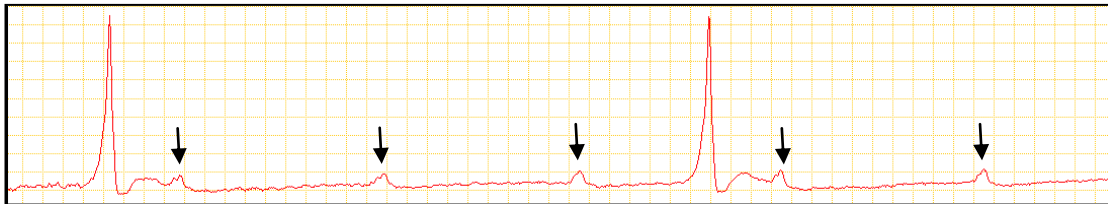


Figura 10. Eletrocardiograma do animal 5 do grupo tratado com células-tronco indiferenciadas, por via intravenosa, obtido 30 dias após a indução do bloqueio atrioventricular, demonstrando condução elétrica cardíaca ainda anormal, mas com redução da relação de ondas P e complexos QRS para 3:1. Setas indicando ondas P.

A FC dos animais antes da indução do BAV estava de acordo com valores apresentados na literatura para a espécie estudada (Farraj et al., 2011) e foi mensurada como 387 ± 55 bpm.

Todos os animais apresentaram marcada redução da FC logo após a cauterização (126 ± 40 bpm), corroborando dados da literatura (Yokokawa et al., 2008), e tornando-se referencial importante para constatação da indução do BAV.

Sobre a FC, a análise de variância com medidas repetidas indicou efeito significativo das sessões. Isto é, a FC aferida foi significativamente maior no momento anterior à indução do BAV ($F=162,63$; $gl=2$; $p<0,001$) do que nos outros dois momentos avaliados, o que comprova a relação entre a redução da FC e a indução do bloqueio (Figura 11). Contudo, não foi possível verificar

efeito do tratamento (tipo celular e via de administração) sobre a FC aferida, haja vista que não há diferença significativa da FC aferida nos animais submetidos aos diferentes tratamentos nas sessões 2 (logo após o BAV) e 3 (15 e 30 dias após o BAV) ($F=0,90$; $gl=2$; $p=0,40$).

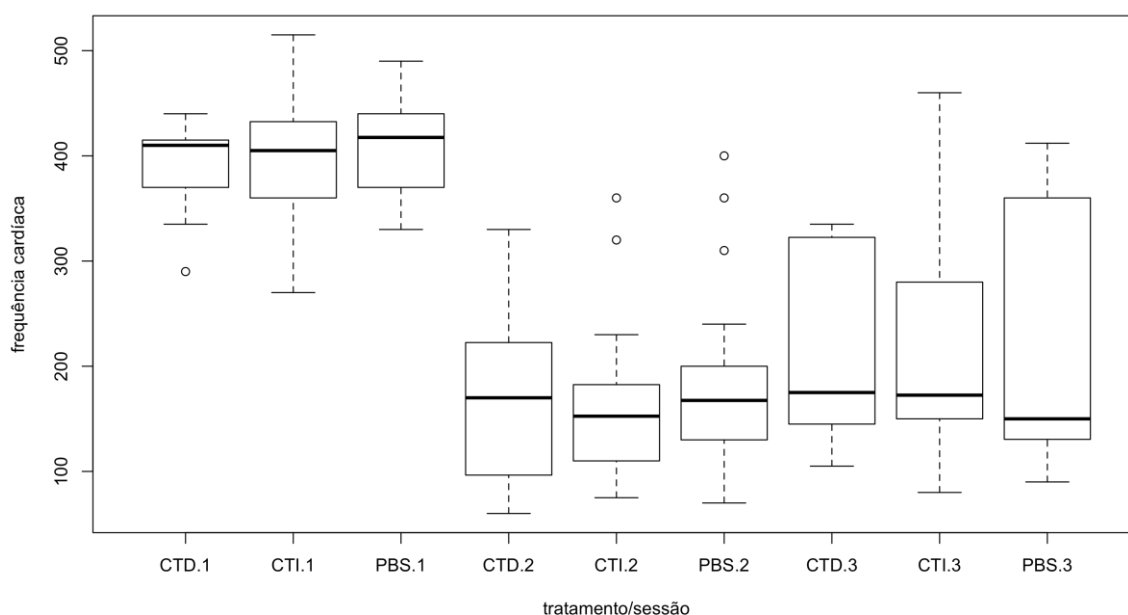


Figura 11. Frequências cardíacas comparadas em três momentos distintos: antes da indução do bloqueio atrioventricular (1), logo após a indução do bloqueio atrioventricular (2), e 15 ou 30 dias após a indução do bloqueio atrioventricular (3). Onde, CTD – grupo tratado com células-tronco mesenquimais pré-induzidas à cardiomiócitos; CTI – grupo tratado com células-tronco mesenquimais indiferenciadas; PBS – grupo controle.

Resultados semelhantes foram observados quando foi avaliada a relação de ondas P com complexos QRS, ou seja, a análise de variância com medidas repetidas do número de ondas P, aferida por ECG, indicou também um efeito significativo das sessões 1 em relação à 2 e 3. Isto é, o número de ondas P aferido foi significativamente menor no momento anterior à indução do BAV ($F=109,21$; $gl=2$; $p<0,001$), indicando que houve adequada indução do BAV. Contudo, também não foi verificado efeito dos tratamentos (tipo celular,

via de administração ou tempo de observação) sobre o número de ondas P, já que não houve diferença significativa nos animais submetidos aos diferentes tratamentos nas sessões 2 (logo após o bloqueio) e 3 (15 e 30 dias após o bloqueio) ($F=0,90$; $gl=2$; $p=0,40$) (Figura 12).

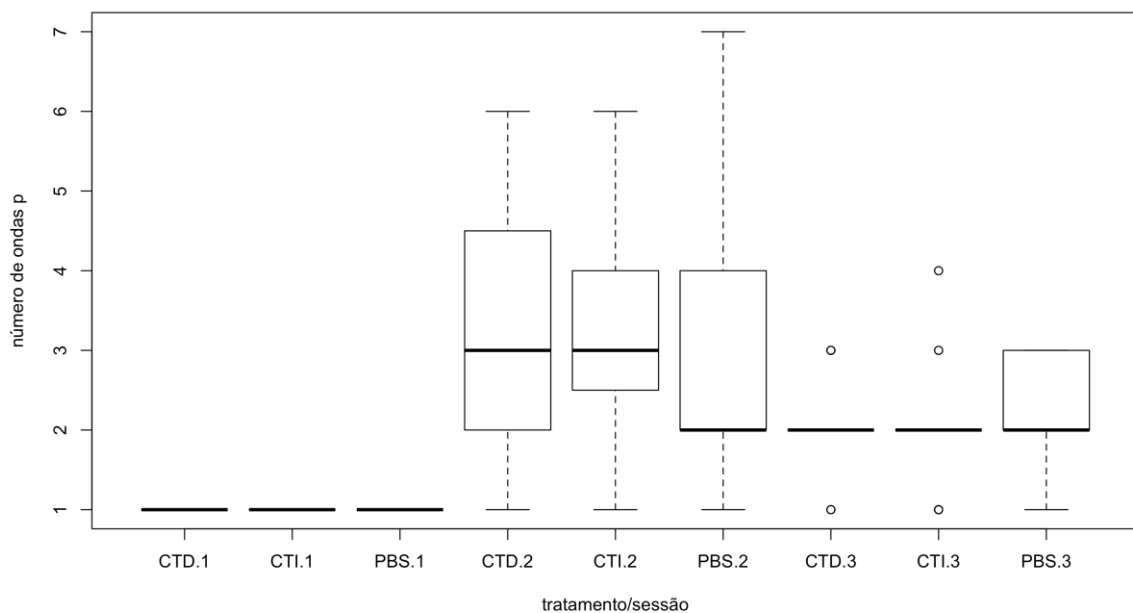


Figura 12. Número de ondas P dissociadas comparadas em três momentos distintos: antes da indução do bloqueio atrioventricular (1), logo após a indução do bloqueio atrioventricular (2), e 15 ou 30 dias após a indução do bloqueio atrioventricular (3). Onde, CTD – grupo tratado com células-tronco mesenquimais pré-induzidas à cardiomiócitos; CTI – grupo tratado com células-tronco mesenquimais indiferenciadas; PBS – grupo controle.

Portanto, estatisticamente, nessas condições experimentais, não pôde ser comprovado que algum tipo de terapia tenha interferido positivamente no funcionamento cardíaco uma vez que o esperado seria uma diferença significativa das FCs ou do número de ondas P dissociadas quando comparadas as sessões 2 e 3.

Apesar destes resultados, foi observado aumento da FC em todos os animais estudados (tanto nos tratados quanto nos controles) no dia da eutanásia (158 ± 38 bpm e 163 ± 69 bpm 15 e 30 dias, após a indução do BAV, respectivamente). Além disso, quando foi pesquisada a porcentagem de variação das FCs médias após o BAV e no dia da eutanásia, o grupo tratado com CTMs indiferenciadas, aplicadas por via intravenosa, apresentou a maior porcentagem. Essa tendência ao restabelecimento da FC inicial verificada nesse grupo foi considerada um achado positivo do tratamento.

Nenhum animal do experimento reverteu completamente o BAV, pois a relação P/QRS de 1:1, verificada antes da cauterização, não foi mais observada. Por outro lado, não foi verificada piora na condução elétrica (aumento na relação P/QRS). A porcentagem de variação do número de ondas P dissociadas após o BAV e no dia da eutanásia foi maior no grupo tratado com CTMs indiferenciadas, aplicadas por via intravenosa. Portanto, assim como descrito para a variável FC, esse grupo demonstrou uma tendência positiva ao tratamento quando foi avaliada a relação P:QRS.

Esses achados diferem dos apresentados por Yokokawa et al. (2008), que constataram retorno do padrão 1:1 de condução atrioventricular em 33% dos animais, com BAV completo, tratados com CTMs indiferenciadas, derivadas da medula óssea e administradas por via intramiocárdica. Hipotetiza-se que esses autores tenham obtido melhores resultados em virtude da origem celular utilizada. De acordo com Gaebel et al. (2011), CTMs humanas, de diferentes fontes, podem induzir diferenças morfológicas e funcionais significativas em parâmetros cardíacos. Segundo esses autores, as CTMs humanas, derivadas da medula óssea, demonstraram melhores resultados

sobre o desempenho do miocárdio do que as derivadas do tecido adiposo ou do cordão umbilical.

No presente estudo, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na resposta à terapia celular segundo a via de administração das células-tronco. Embora a administração tenha ocorrido logo após a indução da lesão, dois fatores devem ser ponderados. Primeiramente, o miocárdio do rato é delgado, impossibilitando a aplicação segura de todo o volume no músculo cardíaco. Segundo, no presente trabalho a área cauterizada não é macroscopicamente visível, e as células foram injetadas na área presumível da lesão, o que pode ter influenciado, de forma negativa, o resultado da aplicação intramiocárdica, uma vez que a mesma poderia estar irreversivelmente danificada pela injúria térmica.

A avaliação histológica das lâminas coradas pelo *Picrosirius Red* revelou fibrose na região do NAV, caracterizada por grande deposição de colágeno, que pode ser atribuída ao processo cicatricial secundário à lesão térmica causada para indução do bloqueio. Contudo, a quantidade de colágeno observada foi significativamente maior nos grupos controle do que nos que receberam terapia celular, sugerindo efeito inibitório das CTMs sobre a formação colagenosa.

Achados semelhantes foram reportados por Yokohama et al. (2008) que observaram, após indução do BAV com injeção de álcool 70%, raros miócitos na região do nodo atrioventricular em virtude da grande deposição de colágeno. Relataram ainda que o tratamento com CTMs atenuou

significativamente a deposição de colágeno no NAV e que o transplante de CTMs possui efeito antifibrótico, via inibição do crescimento de fibroblastos.

Border e Noble (1994) e Lijnen et al. (2000) verificaram que a expressão de TGF- β 1, uma citocina pró-fibrogênica, encontrava-se diminuída após o transplante de CTMs. Essa citocina é a maior responsável pelas alterações fibro-inflamatórias, como proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno

No presente estudo não se observou diferenças no colágeno depositado quando comparados os mesmos grupos, 15 e 30 dias após a indução do BAV. Assim, a fibrose verificada aos 15 dias foi semelhante à observada aos 30 dias, indicando que este processo aconteceu antes do 15^o dia e que uma vez instaurado, não se modificou nos primeiros 30 dias. Esse achado corrobora a literatura, que cita que a fibrose é um processo precoce e irreversível (Yokokawa et al., 2008).

A análise histológica das preparações coradas com hematoxilina e eosina revelou presença de macrófagos e polimorfonucleares entremeados à grande desorganização tecidual na região do NAV. Fragmentação citoplasmática, picnose nuclear, hidrólise citoplasmática e acidofilia foram evidenciadas e são sugestivas de necrose. Atribuiu-se estes achados ao dano térmico na região do NAV durante a indução do bloqueio, visto que a queimadura caracteriza-se histologicamente por necrose de coagulação (Bogliolo, 2011).

Ao analisar, isoladamente, os resultados eletrocardiográficos de cada animal deste estudo, observou-se tendência dos animais do grupo tratado com CTMs indiferenciadas, administradas por via intravenosa, apresentarem melhor recuperação da propriedade eletrofisiológica cardíaca, com aumento da FC e maior variação do número de ondas P dissociadas. Hipotetiza-se que esse resultado deve-se à maior rapidez de evocação da ação parácrina da CT indiferenciada, que provavelmente agiu diminuindo o tamanho da cicatriz formada, permitindo a manifestação de vias de condução elétrica atrioventricular.

Segundo Mirotsoou et al. (2011), as CTs indiferenciadas promovem melhor efeito do que as diferenciadas, uma vez que as CTs não participam diretamente da reparação do coração, mas sim secretam fatores que irão influenciar as células residentes do tecido lesionado à reparação. Sendo assim, células diferenciadas precisariam voltar ao estado indiferenciado para exercer a função desejada, o que demandaria mais tempo.

A aplicação intravenosa também foi mais eficiente, provavelmente, por não causar trauma adicional ao tecido cardíaco. Além disso, a aplicação intramiocárdica, no presente modelo experimental, foi prejudicada pela espessura delgada da parede do coração murino, o que pode ter ocasionado perda de volume aplicado. Outro ponto negativo observado para a aplicação intramiocárdica é que parte das células pode ter sido aplicada em áreas de lesão irreversível.

4 CONCLUSÕES

O tratamento com CTMs, conforme proposto neste modelo experimental, não é capaz de reverter completamente o bloqueio atrioventricular induzido, independentemente do tipo celular, da via de administração ou do tempo de observação. Há tendência à melhora das propriedades eletrofisiológicas no grupo tratado com CTMs indiferenciadas e aplicadas por via intravenosa, por ação parácrina, provavelmente pela secreção de fatores antifibróticos. A reparação de lesão térmica por tecido fibrótico, mesmo que em menor quantidade após terapia celular, não possibilita o retorno ao padrão normal de condução, uma vez que o tecido condutor cardíaco é especializado.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alabaster CT. A method of producing permanent, complete atrioventricular block in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 1972; 46: 581

A language and environment for statistical computing. 2013. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

Araujo, MR. Avaliação histológica e imunofluorescente da lesão compressiva na medula espinhal de ratos Wistar tratados com células-tronco mesenquimais [dissertação de mestrado]. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa; 2013. 34p.

Bogliolo GBF. *Patologia Geral*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 8.ed. 2011. 312p

Border WA, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl. J. Med.* 1994; 331:1286-1292

Burlacu A. Can 5-azacytidine convert the adult stem cells into cardiomyocytes? A brief overview. *Arch Physiol Biochem.* 2006;112(4- 5):260-264

Burlacu A, Rosca AM, Maniu H, Titorencu I, Dragan E, Jinga V, et al. Promoting effect of 5-azacytidine on the myogenic differentiation of bone marrow stromal cells. *Eur J Cell Biol.* 2008;87(3):173-184

Carvalho PH, Daibert APF, Monteiro BS, Okano BS, Carvalho JL, Cunha DNQ, Favarato LSC, Pereira VG, Augusto LEF, Del Carlo RJ. Differentiation of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Into Cardiomyocytes. *Arq Bras Cardiol.* 2013; 100 (1):82-89

Choi Y, Stamm C, Hammer PE, et al. Cardiac conduction through engineered tissue. *Am. J. of Pathol.* 2006; 169(1):72-85

Cunha DNQ, Daibert APF, Okano BS, Pereira VG, Favarato LSC, Andrade E, Del Carlo RJ, Monteiro BS. Modelo para bloqueio atrioventricular completo em ratos. *Jornal Brasileiro de Ciência Animal.* 2012; 5(10):467

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8:315–317

Farraj AK, Hazari MS, Cascio WE. The utility of the small rodent electrocardiogram in toxicology. *Toxicological Sciences*. 2011;121(1):11-30

Fisher VJ, Lee RJ, Christenson LC, Kavalier F. Production of chronic complete atrioventricular heart block without thoracotomy. *J. Appl. Physiol*. 1966; 21: 1119–1121

Gaebel R, Furlani D, Sorg H, Polchow B, Frank J, Bieback K, et al. Cell origin of human mesenchymal stem cells determines a different healing performance in cardiac regeneration. *PLoS One*. 2011; 6(2):e15652

Grauss RW, van Tuyn J, Steendijk P, Winter EM, Pijnappels DA, Hogers B, et al. Forced myocardin expression enhances the therapeutic effect of human mesenchymal stem cells after transplantation in ischemic mouse hearts. *Stem Cells*. 2008; 26:1083–1093

Guo X, Zhao Y, Chang H, et al. Creation of engineered cardiac tissue in vitro from mouse embryonic stem cells. *Circulation*. 2006; 113:2229-2237

Kadivar M, Khatami S, Mortazavi Y, Shokrgozar MA, Taghikhani M, Soleimani M. In vitro cardiomyogenic potential of human umbilical vein-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 340:639–647

Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, Fujiyama S, Tsutsumi Y, Ozono R, et al. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation*. 2001; 104:1046–1052

Karp JM, Teo GSL. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Press*. 2009; 4(3):206-216

Katz AM. Physiology of the heart, 4.ed. 2000, pp. 1–39. Lippincott Williams & Wilkins of Wolters Kluwer, Baltimore, MA.

Kehat I, Khimivich L, Caspi, O, Gepstein A, Shofti R, Arbel G, et al. Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2004; 22(10):1282-9

Langberg JJ, Chin M, Schamp DJ, Lee MA, Goldberger J, Pederson DN, et al. Ablation of the atrioventricular junction with radiofrequency energy using a new electrode catheter. *Am. J. Cardiol.* 1991; 67: 142–147

Lee RJ, Siervers RE, Gallinghouse GJ, Ursell C. Development of a model of complete heart block in rats. *J Appl Physiol.* 1998; 85:758-763.

Li Q, Qi, L, Guo Z, Li H, Zuo H, Li N. CD73+ adipose-derived mesenchymal stem cells posses higher potential to differentiate into cardiomyocytes *in vitro*. *Journal of Molecular Histology.* 2013a; published online.

Li X, Zhang F, Song G, Gu W, Chen M, Yang B et al. Intramyocardial injection of pig pluripotent stem cells improves left ventricular function and perfusion: a study in a porcine model os acute myocardial infarction. *PLoS One.* 2013b; 8(6):e66688

Lijnen PJ, Petrov VV, Fagard RH. Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor-beta (1). *Mol. Genet. Metab.* 2000;71:418-435

Lima MCCD. Arritmias. In: Rabelo RC. *Emergências de Pequenos Animais – Conduitas Clínicas e Cirúrgicas no Paciente Grave.* 2012. Rio de Janeiro: Elsevier. 1.ed. p.925-933.

Liu ZJ, Zhuge Y, Velazquez OC. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem.* 2009; 106:984–991

Loffredo FS, Steinhauser ML, Gannon J, Lee RT. Bone marrow-derived cell therapy stimulates endogenous cardiomyocyte progenitors and promotes cardiac repair. *Cell Stem Cell.* 2011;8(4):389-398

MacIver RH, Stewart RD, Backer CL, Tsao S, Harrington DA, Mavroudis C. An improved *in vivo* method for atrioventricular node ablation via thoracotomy. *Braz J Med Biol Res.* 2010; 43(2):206-210

Martin M. ECG de pequenos animais. Rio de Janeiro: Revinter. 2.ed. 2010. 123p

Martin-Rendon E, Sweeney D, Lu F, Girdlestone J, Navarrete C, Watt SM. 5-Azacytidine-treated human mesenchymal stem/progenitor cells derived from umbilical cord, cord blood and bone marrow do not generate cardiomyocytes *in vitro* at high frequencies. *Vox Sang.* 2008;95(2):137-148

Meirelles LS, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science.* 2006; 119:2204-2213

Mias C, Lairez O, Trouche E, Roncalli J, Calise D, Seguelas MH, et al. Mesenchymal stem cells promote matrix metalloproteinase secretion by cardiac fibroblasts and reduce cardiac ventricular fibrosis after myocardial infarction. *Stem Cells.* 2009; 27:2734–2743

Mirotsov M, Jayawardena TM, Schmeckpeper J, Gnecci M, Dazau VJ. Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in the heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2011; 50(2):280-289

Monteiro BS, Argolo Neto, NM, Del Carlo, RJ. Células-tronco mesenquimais. *Ciência Rural.* 2010; 40:238-245

Opie LH, Downey JM. In: Opie, L.H. *Heart Physiology – From Cell to Circulation.* Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins. 4.ed. 2004. 625p.

Peran M, Marchal JA, Lopez E, Jimenez-Navarro M, Boulaiz H, Rodriguez-Serrano F, Carrillo E, Sanchez-Espin G, de Teresa E, Tosh D, Aranega A. Human cardiac tissue induces transdifferentiation of adult stem cells towards cardiomyocytes. *Cytotherapy.* 2010; 12:332–337

Planat-Bénard V, Menard C, André M, Puceat M, Perez A, Garcia-Verdugo J-M, et al. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circ Res.* 2004;94(2):223-229

Rangappa S, Fen C, Lee EH, Bongso A, Sim EK. Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes. *Ann Thorac Surg.* 2003; 75:775–779

Rota M, Kajstura J, Hosoda T, Bearzi C, Vitale S, Esposito G, Iaffaldano G, Padin-Iruegas ME, Gonzalez A, Rizzi R, Small N, Muraski J, Alvarez R, Chen X, Urbanek K, Bolli R, Houser SR, Leri A, Sussman MA, Anversa P. Bone marrow cells adopt the cardiomyogenic fate in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104:17783–17788

Sabir IN, Killeen MJ, Grace AA, Huang CL. Ventricular arrhythmogenesis: insights from murine models. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2008; 98:208-218

Sadat S, Gehmert S, Song YH, Yen Y, Bai X, Gaiser S, et al. The cardioprotective effect of mesenchymal stem cells is mediated by IGF-I and VEGF. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 363:674–679

Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, Senechal G, Meyers J, Redmond JM, Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *American Thoracic Surgery.* 2002; 73:1919-1925

Shim WS, Jiang S, Wong P, Tan J, Chua YL, Tan YS, Sin YK, Lim CH, Chua T, Teh M, Liu TC, Sim E. Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 324:481–488

Takahashi K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007;1-12

Tang J, Wang J, Yang J, Kong X, Zheng F, Guo L, et al. Mesenchymal stem cells over-expressing SDF-1 promote angiogenesis and improve heart function in experimental myocardial infarction in rats. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2009; 36:644–650

Tsuji H, Miyoshi S, Ikegami Y, Hida N, Asada H, Togashi I et al. Xenografted human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells are immunologically tolerated and transdifferentiated into cardiomyocytes. *Circ Res.* 2010; 106:1613–1623

Urbich C, Aicher A, Heeschen C, Dernbach E, Hofmann WK, Zeiher AM, et al. Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2005; 39(5):733-742

Vogler J, Breithardt G, Eckardt L. Bradyarrhythmias and conduction blocks. *Revista Española de Cardiología.* 2012; 65 (7):656-667

Wang PJ, Ursell PC, Sosa-Suarez G, Okishige K, Friedman PL. Permanent AV block or modification of AV nodal function by selective AV nodal artery ethanol infusion. *Pacing Clin. Electrophysiol.* 1992; 15: 779–789

Xu, W; Zhang, X; Qian, H; Zhu, W; Sun, X; Hu, J; Zhou, H; Chen, Y. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. *Exp Biol Med.* 2004; 229(7):623-31

Yokokawa M, Ohnishi S, Ishibashi-Ueda H, Obata H, Otani K, Miyahara Y, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells improve atrioventricular conduction in a rat model of complete atrioventricular block. *Cell Transplantation.* 2008; 17:1145-1155

Yoon J, Min BG, Kim YH, Shim WJ, Ro YM, Lim DS. Differentiation, engraftment and functional effects of pre-treated mesenchymal stem cells in a rat myocardial infarct model. *Acta Cardiol.* 2005; 60:277–284

Zhou Y, Wang S, Yu Z, Hoyt RF, Jr, Sachdev V, Vincent P, et al. Direct injection of autologous mesenchymal stromal cells improves myocardial function. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 390(3):902–907