



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Faculdade de Ciências Médicas

Fabio Antonio Abrantes Tuche

**Visualização *in vivo* de células mononucleares de medula óssea na
microcirculação coronariana após isquemia miocárdica**

Rio de Janeiro

2010

Fabio Antonio Abrantes Tuche

**Visualização *in vivo* de células mononucleares de medula óssea na
microcirculação coronariana após isquemia miocárdica**

Tese apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Eliete Bouskela

Co-orientador: Prof. Dr. Michael D. Menger

Rio de Janeiro

2010

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIÚS/BIBLIOTECA CB/A

T887 Tuche, Fabio Antonio Abrantes.

Visualização in vivo de células mononucleares de medula óssea na microcirculação coronariana após isquemia miocárdica / Fabio Antonio Abrantes Tuche - 2010.
84 f. : il.

Orientadora : Eliete Bouskela.

Co-orientador : Michael D. Menger.

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Leucócitos mononucleares - Teses. 2. Células da medula óssea - Teses. 3. Células sanguíneas - Teses. 4. Isquemia miocárdica - Teses. 5. Microcirculação - Teses. 6. Aterosclerose - Teses. 7. Microscopia de fluorescência - Teses. I. Bouskela, Eliete. II. Menger, Michael D. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616.127-005.4

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Fabio Antonio Abrantes Tuche

Visualização *in vivo* de células mononucleares de medula óssea na microcirculação coronariana após isquemia miocárdica

Tese apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 31 de Março de 2010.

Banca Examinadora:

Prof.^a. Dr.^a. Eliete Bouskela (Orientadora)
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. Antônio Carlos Campos de Carvalho
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Hans Fernando Rocha Dohmann
Secretaria Municipal de Saúde e Defesa Civil

Prof. Dr. Nivaldo Ribeiro Villela
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. Radovan Borojevic
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2010

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, pelo amor e exemplo.

AGRADECIMENTOS

A todos aqueles (amigos, familiares e mestres) que direta ou indiretamente contribuíram para a realização da tese, em especial à minha esposa Letícia, pelo amor, amizade e paciência.

. . . in the members and in the extremities the blood passes from the arteries into the veins either directly by means of an anastomosis or indirectly through the porosities of the flesh, or by both these means.

William Harvey

RESUMO

TUCHE, Fabio Antonio Abrantes. *Visualização in vivo de células mononucleares de medula óssea na microcirculação coronariana após isquemia miocárdica*. 2010. 85 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

A terapia celular para doenças cardiovasculares representa uma nova e promissora opção terapêutica, principalmente para a cardiopatia isquêmica. A injeção de células mononucleares de medula óssea (CMMO) pela via intracoronariana (ICO) é a mais estudada em ensaios clínicos. Embora já se tenha documentado efeitos benéficos com essa terapia, dados relativos aos mecanismos de interação entre as células transplantadas e o ambiente microvascular cardíaco são escassos. A avaliação das CMMO na microcirculação miocárdica tem o potencial de esclarecer seus mecanismos de ação, abrindo novas possibilidades terapêuticas. O objetivo do estudo foi descrever e avaliar uma inovadora técnica de injeção ICO direta e visualização *in vivo* das CMMO na microcirculação miocárdica de pequenos roedores, após um período de isquemia miocárdica global (IMG) seguida de reperfusão, na presença e na ausência da aterosclerose. **Materiais e Métodos:** A técnica de transplante cardíaco heterotópico cervical (TCHC) em murinos foi modificada com a inserção e fixação de um microcateter conectado a uma seringa, no tronco braquiocefálico do animal doador. IMG foi induzida ocluindo-se a artéria nutridora do enxerto com um microclamp vascular, por 1 hora. As CMMO foram isoladas e marcadas antes da injeção ICO. Microscopia intravital de fluorescência (MIF) foi usada para análise da microcirculação coronariana do ventrículo direito (VD), incluindo arteríolas, capilares e vênulas pós-capilares. Parâmetros de perfusão e permeabilidade microvasculares e as interações entre as CMMO e células endoteliais foram estudados. O impacto da aterosclerose na recuperação, fenótipo e função celular também foi avaliado. **Resultado:** A MIF permitiu análise detalhada da microcirculação coronariana e da cinética das CMMO injetadas pela via ICO. A IMG afetou a microcirculação, reduzindo a densidade capilar funcional (DCF). Tal redução foi maior na presença de aterosclerose. A principal área de retenção celular foi a rede capilar e não as arteríolas ou vênulas. Nem a presença de isquemia, nem de aterosclerose alterou o número de células retidas. O número de CMMO retidas não aumentou na presença de isquemia, nem de aterosclerose e não se correlacionou com a perfusão microvascular ou inflamação prévios à injeção. Houve forte correlação entre o número de CMMO retidas e a expressão de CXCR4. A injeção de CMMO não afetou negativamente a DCF e a microcirculação. Aterosclerose não alterou o número de CMMO obtidas após isolamento por gradiente de Ficoll. A expressão de CD54 estava reduzida em camundongos ApoE^{-/-}. CMMO de doadores ateroscleróticos geraram um número aumentado de unidades formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos. A análise ecocardiográfica da função do VD do enxerto cardíaco cervical foi exequível. **Conclusões:** A injeção ICO direta e a visualização detalhada da cinética das CMMO na microcirculação coronária *in vivo* por MIF foi possível. A IMG provocou redução da densidade capilar funcional. A retenção das CMMO após injeção ICO se deu nos capilares e provavelmente depende da expressão de CXCR4.

Palavras-chave: Células Mononucleares de Medula Óssea. Isquemia Miocárdica. Microcirculação. Aterosclerose. Microscopia Intravital.

ABSTRACT

Cell therapy for cardiovascular disease represents a promising new therapeutic option, especially for ischemic heart disease. The intracoronary (ICo) injection of bone marrow mononuclear cells (BMMC) is the most commonly studied route in clinical trials. Although it has been documented beneficial effects with this therapy, data pertaining the mechanisms of interaction between transplanted cells and cardiac microvascular environment are lacking. Assessment of BMMC in myocardial microcirculation has the potential to clarify its mechanisms of action, opening new therapeutic possibilities. The objective of the study was to describe and to evaluate an innovative technique of direct ICo injection and *in vivo* visualization of BMMC in myocardial small rodents, after a period of global cardiac ischemia (GMI) and reperfusion, in the presence and absence of atherosclerosis. Materials and Methods: The syngeneic murine cervical heterotopic heart transplantation (CHHT) technique was modified by inserting and fixing a catheter connected to a syringe into the donor animal brachiocephalic trunk. GMI was induced occluding the nutritive artery of the graft for 1 hour. Bone marrow mononuclear cells were isolated and labeled prior to ICo injection. Intravital fluorescence microscopy (IFM) was used for analysis of the coronary microcirculation of the right ventricle (RV), including arterioles, capillaries and venules. Parameters of microvascular perfusion, microvascular permeability and the interactions between the BMMC and endothelial cells were studied. The impact of atherosclerosis on the recovery, phenotype and cellular function was also evaluated. Results: The IFM has allowed detailed analysis of both the coronary microcirculation, as the kinetics of BMMC. The GMI affected microcirculation, reducing the functional capillary density (FCD). This reduction was higher in the presence of atherosclerosis. The main area of cell retention was the capillary network, not the arterioles or venules. The number of BMMC retained was not increased in the presence of ischemia, neither of atherosclerosis and didn't correlate with microvascular perfusion or inflammation before injection. Cell retention was strongly correlated with BMMC expression of CXCR4. BMMC injection didn't affect negatively the FCD and microcirculation. Atherosclerosis didn't change the number of BMMC recovered after Ficoll gradient isolation. BMMC expression of CD54 was reduced in ApoE^{-/-} mice. BMMC of atherosclerotic donors have generated a greater number of colony forming units of granulocytes and macrophages. The RV function analyses of the cardiac graft could be performed by echocardiography. Conclusions: The direct ICo injection and detailed visualization of BMMC kinetics in the coronary microcirculation *in vivo* was possible. The ICG caused reduction of functional capillary density. Retention BMMC after ICo injection occurred in the capillaries and probably depends on the expression of CXCR4.

Keywords: Bone Marrow Mononuclear Cells. Ischemia. Microcirculation. Atherosclerosis. Intravital Microscopy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Continuum cardiovascular aterosclerótico.....	20
Figura 2 -	Técnica modificada do transplante cardíaco heterotópico cervical.....	34
Figura 3 -	Técnica de reperfusão do enxerto cardíaco cervical após isquemia fria.....	35
Figura 4 -	Técnica de reperfusão do enxerto cardíaco cervical após isquemia quente.....	37
Figura 5 -	Visualização da microcirculação coronariana mediante infusão de FITC-dextrana.....	40
Figura 6 -	Visualização de capilares e vênulas pós-capilares.....	41
Figura 7 -	Visualização de CMMO marcadas na microcirculação coronariana	43
Figura 8 -	Retenção de várias CMMO em um único capilar.....	53
Figura 9 -	Análise histológica do miocárdio do enxerto cardíaco.....	56
Figura 10 -	Imagens do enxerto cardíaco cervical por ecocardiografia.....	58

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Tempo de isquemia “fria” do enxerto durante o procedimento de transplante cardíaco.....	47
Gráfico 2 - Influência da isquemia miocárdica global (isquemia “quente”) na densidade capilar funcional.....	51
Gráfico 3 - Influência da injeção de CMMO na densidade capilar funcional da microcirculação coronariana.....	52
Gráfico 4 - Número de células retidas por campo (“plugging cells”) nos diferentes grupos estudados.....	54
Gráfico 5 - Avaliação do enxerto cardíaco cervical por ecocardiografia.....	58
Gráfico 6 - Recuperação celular após gradiente de Ficoll.....	59
Gráfico 7 - Avaliação de células CD45 ^{low} CD34 ⁺ (%) segundo o protocolo ISHAGE.....	60
Gráfico 8 - Correlação entre o número de células retidas e a expressão de CXCR4.....	63
Gráfico 9 - Ensaios clonogênicos <i>in vitro</i>	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Descrição dos grupos experimentais estudados.....	31
Tabela 2 -	Parâmetros microcirculatórios coronarianos avaliados na microscopia intravital de fluorescência.....	50
Tabela 3 -	Avaliação dos marcadores de superfície de células tronco/progenitoras por citometria de fluxo.....	61
Tabela 4 -	Avaliação das moléculas de adesão celular por citometria de fluxo.....	61
Tabela 5 -	Correlação entre o número de CMMO retidas e o tempo de isquemia “fria” / parâmetros microcirculatórios da MIF.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CI	Cardiopatia isquêmica
CMMO	Células mononucleares de medula óssea
CPDMO	Células progenitoras derivadas da medula óssea
CPE	Células progenitoras endoteliais
CTH	Células tronco hematopoiéticas
CTM	Células tronco mesenquimais
DAC	Doença arterial coronariana
DAP	Doença arterial periférica
DCF	Densidade capilar funcional
DCV	Doença cérebro vascular
DIC	Diâmetro interno cavitário
EUA	Estados Unidos da América
FE	Fração de ejeção
FEnc	Fração de encurtamento
FRCV	Fatores de risco cardiovasculares
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IC	Insuficiência cardíaca
ICO	Intracoronariana
IFM	Intensidade de fluorescência média
IMG	Isquemia miocárdica global
IR	Isquemia e reperfusão
MIF	Microscopia intravital de fluorescência
MO	Medula óssea
PM	Permeabilidade microvascular
RMC	Ressonância magnética cardíaca
SUS	Sistema Unificado de Saúde
TCHC	Transplante cardíaco heterotópico cervical
TIF	Tempo de isquemia “fria”
UFC-GM	Unidades formadoras de colônias granulócitos-macrófagos
VD	Ventrículo direito
VE	Ventrículo esquerdo
VFHC	Velocidade de fluxo de hemácias nos capilares perfundidos
VFHV	Velocidade de fluxo de hemácias nas venulas pós-capilares

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	HIPÓTESES DO ESTUDO	28
2	OBJETIVOS DO ESTUDO	29
2.1	Objetivos primários	29
2.2	Objetivos secundários	29
3	MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1	Animais	30
3.2	Protocolo de avaliação in vivo do transplante intracoronariano de CMMO marcadas na microcirculação cardíaca, após isquemia miocárdica global	30
3.2.1	<u>Descrição dos grupos experimentais estudados</u>	31
3.2.2	<u>Técnica de transplante cardíaco heterotópico cervical modificada</u>	31
3.2.3	<u>Indução de isquemia miocárdica global (“isquemia quente”)</u>	36
3.2.4	<u>Separação das CMMO</u>	37
3.2.5	<u>Marcação e preparo para a injeção das CMMO isoladas</u>	38
3.2.6	<u>Técnica de microscopia intravital de fluorescência</u>	38
3.2.7	<u>Histologia</u>	44
3.2.8	<u>Estudo ecocardiográfico do coração transplantado</u>	44
3.3	Protocolos de contagem, avaliação fenotípica e proliferação celular comparando CMMO de camundongos saudáveis com CMMO de camundongos ApoE^{-/-}	44
3.3.1	<u>Avaliação da recuperação celular após o gradiente de Ficoll</u>	45
3.3.2	<u>Caracterização fenotípica por citometria de fluxo</u>	45
3.3.3	<u>Ensaio clonogênicos <i>in vitro</i></u>	45
3.4	Análise estatística	46
4	RESULTADOS	47
4.1	Avaliação in vivo do transplante intracoronariano de CMMO marcadas na microcirculação cardíaca, após isquemia miocárdica global	47
4.1.1	<u>Tempo de isquemia “fria” durante o transplante cardíaco</u>	47
4.1.2	<u>Aquisição de imagens e avaliação dos parâmetros de MIF</u>	48
4.1.3	<u>Influência da isquemia quente nos parâmetros microcirculatórios</u>	48
4.1.4	<u>Influência da injeção de CMMO nos parâmetros microcirculatórios</u>	49

4.1.5	<u>Visualização da cinética das CMMO injetadas na microcirculação</u>	52
4.1.6	<u>Visualização <i>post mortem</i> das CMMO injetadas</u>	55
4.1.7	<u>Estudo ecocardiográfico do coração transplantado</u>	57
4.2	Recuperação celular da população mononuclear isolada da medula óssea de camundongos com e sem aterosclerose	59
4.3	Caracterização fenotípica da população mononuclear isolada da medula óssea de camundongos com e sem aterosclerose	59
4.4	Avaliação funcional da população mononuclear isolada da medula óssea de camundongos com e sem aterosclerose	63
4.5	Enumeração dos principais resultados	65
5	DISCUSSÃO	66
6	CONCLUSÃO	77
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	78
	REFERÊNCIAS	79

INTRODUÇÃO

Continuum cardiovascular aterosclerótico: da ativação endotelial à insuficiência cardíaca

O termo ateroma foi criado por Albrecht Von Haller em 1755, se referindo ao acúmulo de lipídios, células e debris nas paredes arteriais; desde então, é crescente o entendimento do complexo processo fisiopatológico da aterosclerose e de suas conseqüências nos leitos vasculares, que principalmente se manifestam clinicamente como: doença arterial coronariana (DAC), doença cérebro vascular (DCV) e doença arterial periférica (DAP)(1).

Na última década, houve um avanço significativo no conhecimento dos aspectos moleculares e celulares, envolvidos na gênese e na progressão da aterosclerose.

A aterosclerose se caracteriza por um processo inflamatório contínuo, intimamente relacionado à crônica exposição a conhecidos fatores de risco cardiovasculares (FRCV) tais como: tabagismo, hipertensão arterial sistêmica, obesidade, dislipidemia, sedentarismo, história familiar de coronariopatia precoce e diabetes mellitus(2). Há evidências tanto experimentais quanto clínicas, da presença de inflamação ao longo de todos os estágios da doença(2;3). No curso inicial da aterosclerose ocorre ativação das células endoteliais vasculares, com infiltração secundária de lipoproteínas oxidadas. A presença de inflamação e disfunção endotelial ocorre mesmo antes do aparecimento de lesões macrovasculares detectáveis(1). O endotélio, uma vez ativado, expressa uma série de moléculas de adesão que seletivamente recrutam diferentes classes de leucócitos, que tendem a se acumular nas regiões onde as placas ateroscleróticas surgem. Os monócitos, que são as células inflamatórias mais numerosas dentre as que povoam as placas, aderem à superfície endotelial disfuncional, se ligando a moléculas de adesão celular que não são expressas em endotélios saudáveis, mas sim mediante o estímulo de mediadores tais como citocinas pró-inflamatórias, angiotensina II e lipoproteínas oxidadas(2). Após adesão ao endotélio ativado os monócitos, adentram a camada íntima estimulados por quimiocinas pró-inflamatórias, onde se transformam em macrófagos capazes de fagocitar as partículas de lipoproteínas

modificadas. Tais macrófagos com citoplasmas ricos em partículas lipídicas são as chamadas células espumosas, que localmente se proliferam, sustentam e amplificam o processo inflamatório, liberando uma série de fatores de crescimento e promovendo localmente um aumento de citocinas aterogênicas, que induzem a apoptose de células musculares lisas, degradação da matriz de colágeno e conseqüente aumento do conteúdo lipídico(3). Mesmo lesões ateroscleróticas incipientes já possuem uma região central rica em partículas de colesterol e células espumosas. Cronicamente ocorre progressão dessas lesões ateroscleróticas, com crescente grau de obstrução arterial. Diferentes territórios vasculares e órgãos podem ser acometidos, tais como o coração, os vasos arteriais cervicais e dos membros inferiores, determinando o estabelecimento de diferentes vertentes da aterosclerose. No curso da doença aterosclerótica, eventos agudos de desestabilização, fratura e secundário rompimento da placa aterosclerótica são responsáveis pela exposição do conteúdo lipídico aos componentes do sangue, com imediato e crescente acúmulo local de plaquetas. Em última instância ocorre obstrução aguda da passagem de sangue, secundária à trombose e espasmo vasculares locais. No caso de uma significativa obstrução arterial, ocorre o processo de isquemia do órgão irrigado pela artéria acometida, podendo evoluir com necrose celular e posterior fibrose teciduais. A extensão da área de lesão tecidual é principalmente dependente do tempo de interrupção do fluxo sanguíneo e da localização anatômica da lesão obstrutiva. O infarto agudo do miocárdio (IAM) e o acidente vascular encefálico isquêmico representam as formas potencialmente mais graves desses quadros.

Nas últimas décadas houve um avanço no tratamento emergencial do IAM , o que gerou uma situação paradoxal. A mortalidade relacionada ao evento agudo diminuiu, porém houve um aumento dos casos de insuficiência cardíaca (IC) secundária ao estabelecimento da cardiopatia isquêmica(CI)(4). A IC é um importante problema de saúde pública neste início de século que afeta cerca de 5 milhões de pessoas nos Estados Unidos da América (EUA) com cerca de 550.000 novos casos anualmente(4). No Brasil a taxa de mortalidade anual é de cerca de 5,31 em indivíduos com idade entre 20-59 anos, aumentado para 6,17 entre 60-69, 7,43 entre 70 e 79 anos e atingindo 10,02 em pacientes com 80 anos ou mais. No ano de 2002, o número de internações por IC foi de 372.604, com um gasto pelo

Sistema Unificado de Saúde (SUS) da ordem de R\$198.836.488,73 e um total de 25.984 óbitos, o que corresponde a 7,75% dos óbitos em todas as internações realizadas(5).

Na maioria das vezes durante a fase inicial da IC, após o insulto cardíaco, os pacientes cursam assintomáticos ou minimamente sintomáticos, mesmo com a diminuição da capacidade do coração de bombear do sangue. Isso provavelmente se deve à ativação de mecanismos compensatórios, locais e sistêmicos, após a injúria miocárdica. Tais mecanismos incluem a ativação do sistema nervoso adrenérgico e do sistema renina-angiotensina, que levam a uma manutenção do débito cardíaco através de uma maior retenção de água e sódio, vasoconstrição periférica e maior contratilidade miocárdica. Após o insulto miocárdico, que inclui necrose de cardiomiócitos com formação de tecido cicatricial sem capacidade funcional contrátil, o balanço de pressões intracavitárias e forças de estiramento tentem a gerar um remodelamento ventricular com dilatação das cavidades cardíacas. Com o passar do tempo, dado o caráter progressivo da cardiomiopatia isquêmica, os mecanismos compensatórios não são mais capazes de evitar o surgimento e/ou agravamento dos sintomas de IC, que incluem dentre outros, a angina, a dispnéia aos esforços e o edema de membros inferiores(4).

Atualmente as diferentes modalidades de tratamento preconizadas para os distintos elementos que compõem esse continuum cardiovascular (fatores de risco, disfunção endotelial, aterosclerose, síndromes coronarianas agudas, cardiopatia isquêmica, insuficiência cardíaca), são oriundas da união entre o conhecimento fisiopatológico referente a esses elementos com as melhores evidências científicas disponíveis. É crescente a noção de que a CI e a IC não são doenças apenas do músculo cardíaco, que perde sua função hemodinâmica de bomba, mas sim condições nas quais diferentes sistemas estão interligados, pela interação de variadas moléculas e populações celulares. Apesar do caráter progressivo do continuum cardiovascular aterosclerótico, existe algum grau imane de reversão dessas condições.

Aterosclerose, cardiopatia isquêmica e o novo paradigma do reparo endógeno

Nos últimos anos, houve o surgimento de novos conceitos e conhecimentos relacionados à patogênese da doença aterosclerótica e às suas conseqüências, principalmente no que diz respeito à doença arterial coronariana, dentre os quais se destaca o paradigma do reparo endógeno(1), segundo a qual virtualmente vários, senão todos os órgãos do corpo humano, incluindo o coração, possuem algum grau de manutenção reparativa, que sofre influência de vários fatores, tais como a idade e a presença de co-morbidades agudas ou crônicas. No caso do sistema cardiovascular, o processo de reparo endógeno é complexamente regulado, intimamente relacionado à presença de injúria endotelial e tecidual, envolvendo a mobilização e recrutamento local de variados tipos celulares com potencial reparador.

No continuum cardiovascular aterosclerótico, o reparo endógeno é definido como o processo pelo qual, mediante insultos agudos ou crônicos ao endotélio vascular e ao músculo cardíaco, a ação de diferentes células tronco e células progenitoras contribuem para a regressão no crescimento das lesões ateroscleróticas, restauração do binômio integridade-função endotelial e ainda para algum grau de reparo e preservação do músculo cardíaco(6;7). Em estados basais fisiológicos, tais células são encontradas, na medula óssea, na circulação sanguínea periférica, na parede vascular e no coração(6-8). A mobilização dessas células para os locais de injúria vascular e tecidual se dá principalmente a partir da ação de citocinas e quimiocinas hematopoiético-regulatórias do tipo Th2 (antiinflamatórias). Tais células "reparadoras" ,exercem um efeito contrário àquele de células progenitoras "danosas" e de citocinas do tipo Th1(pró-inflamatório), que são recrutadas para os segmentos endoteliais ativados, promovendo a progressão da doença aterosclerótica localmente(1). Diferentes tipos de insulto ao endotélio vascular e ao músculo cardíaco, tais como a ação de radicais livres, lipoproteínas oxidadas, toxinas virais ou bacterianas, ou ainda, processos fisiológicos (p.ex. isquemia), podem alterar o ambiente tecidual, estimulando a degranulação de macrófagos residentes com conseqüente liberação de uma série de citocinas pró-inflamatórias do tipo Th1, com capacidade de recrutar essas células consideradas

“danosas”. Com isso, o endotélio ativado, se torna rapidamente hiperpermeável tanto a essas células “danosas” quanto a essas citocinas pró-inflamatórias, ocorrendo o estabelecimento de um processo inflamatório local contínuo e perpetuador da injúria vascular e tecidual. Em contrapartida, ocorre paralelamente no tecido acometido, a secreção de citocinas do tipo Th2 e quimiocinas (IL-3, IL-8, fator estimulante de colônias de granulócitos, etc.) que participam da mobilização de células consideradas “reparadoras”. Provavelmente, quando um número suficiente de células reparadoras são mobilizadas e retidas no local da injúria em variados contextos (lesão da camada endotelial vascular, aterosclerose, isquemia ou necrose tecidual), ocorre diminuição do processo inflamatório deletério, prevalecendo o reparo endotelial e tecidual(1).

Portanto, no continuum cardiovascular aterosclerótico (Figura1), o conceito de reparo endógeno ineficaz se aplica tanto às situações de insulto e disfunção endotelial que levam ao remodelamento vascular e à progressão da aterosclerose(1;9), quanto aos casos de necrose miocárdica secundária à isquemia que evoluem com o remodelamento cardíaco, estabelecimento da cardiopatia isquêmica e insuficiência cardíaca progressiva(6;7;10). Sendo assim o conceito de terapia celular é baseado na idéia de que a disponibilização de células apropriadas pode sobrepujar as deficiências de um ineficaz sistema de reparo endógeno pré-existente, reduzindo inflamação, limitando dano e restaurando a integridade vascular e tecidual(1;7).

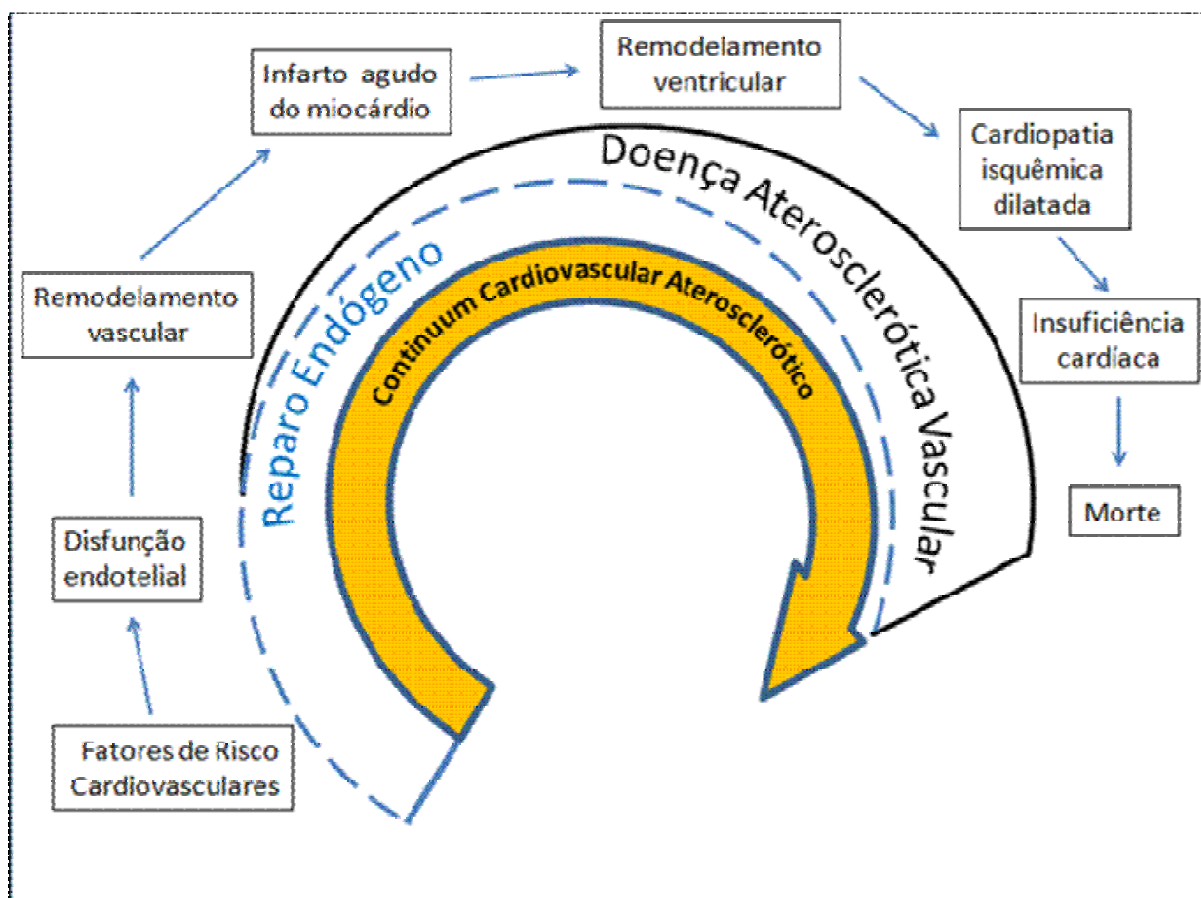


Figura 1: Continuum cardiovascular aterosclerótico. O continuum cardiovascular aterosclerótico envolve o surgimento e progressão da doença aterosclerótica vascular a partir a ação negativa dos fatores de risco cardiovasculares. Numa fase inicial, ocorrem a disfunção endotelial e o conseqüente remodelamento vascular. Com o tempo, a capacidade de reparo endógeno se reduz e a doença aterosclerótica se estabelece e progride. O infarto agudo do miocárdio ocorre mesmo na ausência de lesões ateroscleróticas significativas e pode levar ao remodelamento ventricular com estabelecimento da cardiopatia isquêmica. A doença vascular e a doença cardíaca progridem simultaneamente. Nas fases mais avançadas surge a insuficiência cardíaca clinicamente manifesta, com doença aterosclerótica avançada difusa e mínima capacidade de reparo endógeno. A morte é o evento final desse processo.

Papel das células da medula óssea no reparo endógeno: uma janela terapêutica

A medula óssea constitui um reservatório de células tronco e células progenitoras que possuem a capacidade de proliferação e diferenciação em diversos outros tipos celulares, destacando-se as células progenitoras adultas multipotentes, as células tronco mesenquimais (CTM), e os hemangioblastos, supostos precursores comuns às linhagens hematopoiéticas e endoteliais(8). É crescente o estudo da aplicação dessas células em medicina regenerativa, devido ao seu papel tanto no desenvolvimento do sistema cardiovascular, quanto na manutenção e reparo dos

tecidos vascular e cardíaco, na senescência ou em condições patológicas ao longo da vida adulta. Vários estudos recentes demonstram de forma cada vez mais consistente que células originadas na medula óssea (MO) participam intensamente da regeneração de várias estruturas do sistema cardiovascular.

Atualmente técnicas de citometria de fluxo baseadas na avaliação e quantificação da presença de um conjunto de moléculas na superfície celular (CD, do inglês *cluster of differentiation*), associadas ao uso de anticorpos monoclonais permitem a identificação e até a seleção de populações de células tronco e de células progenitoras com fenótipos específicos(11). As células tronco hematopoiéticas (CTH), capazes de auto-renovação e diferenciação ilimitadas, constituem uma pequena parcela de uma população celular heterogênea identificada pelo expressão do epítipo CD34(8). O restante das células CD34+, dentre as quais se encontram as células progenitoras endoteliais (CPE), são células com capacidade limitada de regeneração da MO(8). Atualmente, existem diferentes metodologias por citometria de fluxo, para a enumeração de células CD34+, tanto derivadas da MO quanto do sangue periférico(12;13).

Até o momento as CPE representam a subpopulação progenitora celular mais estudada em humanos. Tais células não se localizam apenas na MO mas também no sangue periférico e na camada adventícia vascular(14). A mobilização de células progenitoras da MO para a circulação periférica e a posterior retenção dessas nos locais de injúria vascular e miocárdica envolve um sistema complexo, influenciado por diferentes variáveis fisiológicas e patológicas. Notadamente a senescência, os FRCV e a insuficiência renal diminuem a mobilização de CPE enquanto que a atividade física, diferentes classes de fármacos cardiovasculares, isquemia e necrose miocárdica aumentam o número de CPE circulantes(8).

Em 1997, as CPE foram caracterizadas pela primeira vez e desde então, diferentes metodologias têm sido relatadas na literatura(15). Visto que apenas critérios morfológicos não são suficientes, para a análise e obtenção de CPE, é necessária a utilização de métodos mais específicos, tais como a citometria de fluxo com anticorpos apropriados ou métodos de cultura para enriquecimento dessa população celular seguidos do emprego de colorações capazes de identificar células endoteliais(16;17).

As CPE podem ser caracterizadas e quantificadas a partir de culturas de células mononucleares ou de análises por citometria de fluxo de células circulantes. A exata definição das CPE continua controversa e inconsistente, baseada tanto em critérios fenotípicos quanto funcionais. Devido a sua origem comum, as CPE compartilham com as CTH muitos antígenos de superfície, tais como o CD133, CD34, VEGFR2 (também conhecido como KDR ou Flk-1), Tie-2, c-Kit, Sca-1, CD31 e VE-caderina. Não existe um melhor marcador descrito para se caracterizar e identificar as CPE circulantes, o que torna difícil a padronização e a comparação de resultados de diferentes estudos publicados. Na maioria das vezes a combinação de um marcador de CTH [CD34, CD117 (também conhecido como cKit) e CD133], com um marcador de células endoteliais (VEGFR2 e VE-caderina), tem sido utilizada para se identificar as CPE, mais freqüentemente a combinação CD34/VEGFR2(18). A capacidade de células CD133+ gerarem CPE tem sido questionada(17). Estudos recentes demonstram que subpopulações mielóides de células CD14+ também possuem capacidade angiogênica contribuindo para reparo endotelial(18). A partir de diferentes técnicas já descritas para o cultivo de células mononucleares isoladas do sangue periférico, com variadas metodologias, dois tipos celulares principais têm sido descritos: as CPE de crescimento precoce e as de crescimento tardio. Esses dois tipos de CPE possuem diferenças no que diz respeito ao tempo em que surgem nas culturas celulares, morfologia, taxa de proliferação, perfil de expressão gênica e propriedades funcionais(16;17). Asahara e colaboradores observaram que as CPE originadas na MO participam no processo de angiogênese pós-natal, segundo o qual, o surgimento de novos vasos na vida adulta é possível(15). As CPE possuem a capacidade não só de diferenciação em células endoteliais mas também em cardiomiócitos, quando em co-culturas com células musculares cardíacas neonatais(19). A injeção de CPE no miocárdio após um IAM resultou em melhora da função cardíaca, promovendo angiogênese sem transdiferenciação em cardiomiócitos(19).

Em 2001, o clássico estudo de Orlic e colaboradores levantaram a possibilidade de que CTH injetadas na zona de borda, ao redor do miocárdio infartado, seriam capazes de regenerar o músculo cardíaco e estruturas vasculares(20). Estudos mais recentes contestaram tal teoria(19). As CTM podem derivar da MO, do tecido adiposo dentre outros e possuem a capacidade de

diferenciação em linhagens mesodérmicas (adipócitos, condrócitos e células ósseas) e em cardiomiócitos *in vitro* (19). Quando transplantadas no miocárdio infartado houve melhora funcional sem diferenciação em cardiomiócitos(19).

O mecanismo de ação das diferentes populações celulares da MO estudadas até o momento é desconhecido. Há crescentes evidências de que CT e CP da MO sejam capazes de produzir de diferentes fatores parácrinos (fatores de crescimento e citocinas), que normalmente são secretados por células cardíacas em resposta à injúria. Sendo assim o transplante de células tronco e células progenitoras da MO, após um infarto do miocárdio parece aumentar a sinalização local e sistêmica, potencializando os mecanismos de reparo vascular e do miocárdio, através da modulação no coração de eventos biológicos relacionados à neovascularização, fibrose, inflamação, integridade celular, contratilidade, remodelamento e bioenergética(8;21).

Baseados inicialmente nos conhecimento gerado a partir de resultados obtidos em estudos experimentais, de forma translacional, um grande número de estudos clínicos, avaliando a terapia celular em pacientes com doença cardiovasculares já foram publicados e muitos estudos de fase III estão em andamento(22). Em todo o mundo, cerca de 1500 pacientes cardiopatas já foram tratados com células progenitoras adultas(23). Atualmente a terapia celular é considerada uma perspectiva promissora para o tratamento do IAM e da IC.

Em 2001 foi publicada a primeira descrição de exeqüibilidade e segurança do método de transplante de células de MO pela via ICO, em pacientes com IAM(24;25). A via ICO, segundo a qual se utiliza um cateter balão insuflado durante a infusão de células dentro da artéria relacionada ao infarto, permite o direcionamento das células diretamente para a área acometida. Devido à sua praticidade e segurança quando comparada às vias de injeção direta, transepicárdica ou transendocárdica, que na fase aguda após um IAM podem aumentar o risco de perfuração cardíaca, a via ICO tem sido a mais utilizada em estudos clínicos(26). Tal procedimento parece permitir um maior acúmulo de células no músculo cardíaco infartado, quando comparada à via de injeção transvenosa retrograda(27).

Em uma metanálise de 6 estudos clínicos prospectivos, controlados e randomizados, com um total de 517 pacientes, realizada a partir de uma revisão sistemática da literatura, avaliou-se a segurança e o impacto na função miocárdica, do tratamento com células-tronco/progenitoras de medula óssea, pela via ICO, na fase aguda pós-IAM. Comparados com os grupos controles, os grupos tratados com essa terapia evoluíram com melhora significativa da fração de ejeção (FE) do ventrículo esquerdo (VE) (2.53%, 95% intervalo de confiança: 0.67-4.39, P=0.008) em um seguimento de 3 a 6 meses. A taxa de eventos adversos cardiovasculares maiores, incluindo arritmias ventriculares, re-hospitalização por IC e outros eventos cardiovasculares (morte cardíaca, recorrência de IAM, procedimento de revascularização da artéria relacionada ao IAM e acidente vascular encefálico), não foi significativamente diferente entre os grupos(28). Em uma sub-análise do maior desses estudos, o REPAIR-AMI, demonstrou-se através de análise por ressonância magnética cardíaca (RMC) que o tratamento com células de MO foi capaz de limitar o processo de remodelamento do VE em até um ano após o IAM, que sabidamente possui um importante papel na predição de desfechos clínicos(29). De fato no seguimento desses pacientes em até 2 anos após o IAM, demonstrou-se redução significativa de eventos CV adversos importantes e a manutenção da melhora da função miocárdica devido à administração ICO de CMMO(30). Além da infusão ICO de CMMO não selecionadas, o transplante de populações celulares específicas também tem sido testado. Em 2004 foi relatada a segurança e exequibilidade da infusão de células tronco mesenquimais em pacientes com IAM, observando-se uma melhora da função miocárdica em 3 meses de seguimento (31). O estudo REGENT comparou o transplante de CMMO não selecionadas, ao uso de células positivas para os marcadores de superfície CD34 e CXCR4. Tal estudo demonstrando benefícios clínicos semelhantes entre ambos os grupos(32). Nesse estudo, a grande perda do seguimento de pacientes e o não cegamento dos investigadores pode ter influenciado os resultados (33).

Atualmente, segundo os preceitos da medicina baseada em evidências, as intervenções e cuidados estabelecidos para a doença aterosclerótica e todas as suas vertentes, derivam das melhores evidências científicas disponíveis, a partir dos resultados obtidos em estudos clínicos que avaliaram desfechos relevantes. A aceitação da terapia com CMMO para pacientes com doença aterosclerótica, mais

especificamente aqueles acometidos por um IAM, é ainda hoje amplamente debatida, visto que muitas são as dúvidas relativas à sua aplicabilidade. Pontos importantes, tais como os mecanismos de ação, a existência de populações celulares ideais a serem transplantadas, o número de células injetadas, o momento ideal do transplante, o tempo de duração dos efeitos benéficos, a segurança em longo prazo, dentre outros, permanecem não esclarecidos. Vários estudos experimentais e clínicos estão em andamento visando esclarecer esses pontos pendentes. Sendo assim, somente com a integração dos conhecimentos obtidos em estudos experimentais e clínicos, através da medicina translacional, a terapia celular com células de MO para pacientes com IAM poderá se estabelecer na prática clínica.

Fundamentações teóricas para a realização do estudo

Desde as descobertas que vários órgãos, incluindo o coração, possuem uma capacidade, mesmo que limitada, de reparo e que células-tronco e células progenitoras originadas na MO participam ativamente desse processo, vários estudos experimentais e clínicos têm sido publicados avaliando a terapia celular em pacientes com IAM.

Atualmente existe consenso que a terapia com a infusão ICO de CMMO autólogas em pacientes com IAM é segura e determina um efeito de melhora da função contrátil cardíaca, principalmente em pacientes que evoluem com disfunção ventricular esquerda na fase aguda da evento. Uma das principais questões a serem respondidas, diz respeito ao comportamento das células infundidas nos ambiente vascular e muscular do coração, ou seja, sua cinética de interação com os diferentes componentes microcardiovasculares. Teoricamente, para se responder essa pergunta, a metodologia de avaliação ideal deve cumprir 4 pré-requisitos: 1- capacidade de avaliação *in vivo*; 2- capacidade de avaliação com resolução visual ao nível celular individual; 3- capacidade de avaliação do ambiente miocárdico microvascular propriamente dito e 4- ausência de citotoxicidade, quer seja em relação as células injetadas quer seja em relação à células cardíacas . Até o momento nenhuma das tecnologias utilizadas para a visualização de células transplantadas no coração, pela via ICO, preencheu esses critérios

simultaneamente. Por exemplo, são vários os estudos que avaliaram *in vivo* a retenção, destino e localização das células injetadas no coração usando a aplicação de marcadores biológicos nas células antes da injeção para posterior visualização das células marcadas no coração. As metodologias com uso com marcadores radioativos para visualização das células injetadas mediante técnicas de medicina nuclear e outras com o uso de nano ou micropartículas conjugadas à RMC ou ecocardiografia são exemplos, que embora possam ser aplicadas de forma segura, *in vivo* no coração, não possuem a resolução de imagens ao nível celular individual (34;35). Por outro lado, as técnicas *post mortem* de histopatologia e imunohistoquímicas, que por definição são inócuas, permitem a visualização nítida e individualizada das células no miocárdio, porém são técnicas que não permitem o estudo no momento da injeção, implicando a impossibilidade de se avaliar mecanismos dinâmicos de interação das células injetadas com as constituintes do ambiente microvascular cardíaco. De fato tais mecanismos são amplamente especulados, porém até hoje são desconhecidos. É fato que, com base no amplo conhecimento adquirido sobre a cinética microvascular de leucócitos, durante reação inflamatória, acredita-se que as células originadas da MO desempenhem um papel coordenado e semelhante ao mecanismo de retenção leucocitária na microcirculação cardíaca, quando injetadas pela via ICO. A cascata de eventos de adesão dos leucócitos à camada de células endoteliais depende de uma interação complexa e dinâmica entre fatores reológicos, moleculares e celulares sendo, de forma reducionista, dividida nas seguintes etapas: rolamento, ativação, adesão firme e transmigração(36;37). Técnicas de MIF são as mais freqüentemente descritas na literatura, para ao estudo dessa cadeia de fenômenos que envolve a interação leucócito-endotélio(38). Tais técnicas podem ser aplicadas, principalmente em animais de pequeno porte, para o estudo dessa seqüência de eventos celulares em diversos órgãos, inclusive no coração mediante injúria miocárdica(39).

Atualmente, na era das pesquisas moleculares e genéticas, o uso de modelos murinos oferece a grande vantagem da utilização de animais com uma série de genes silenciados, o que possibilita o estudo de condições patológicas específicas. No caso do estudo da aterosclerose, o uso de camundongos com o gene da Apolipoproteína-E silenciado é um modelo efetivo de mimetização da doença(40). Dessa forma, o estabelecimento de uma técnica, que permita a observação *in vivo*,

na microcirculação do músculo cardíaco, do comportamento das células-tronco e progenitoras transplantadas pela via ICO, tanto em situações de perfusão sanguínea normal, quanto durante a isquemia/reperfusão é fundamental para a elucidação dos mecanismos de ação dessas células. Além disso, tal técnica permite o estudo de diferentes condições e intervenções, potencialmente capazes de aumentar a retenção celular local, com conseqüente incremento do efeito reparador.

Nos próximos capítulos da tese apresentamos os objetivos, seguidos da metodologia utilizada no protocolo, descrevendo os grupos e os procedimentos experimentais, com ênfase na técnica modificada do TCHC murino, que nos permitiu tanto a injeção ICO das CMMO quanto a realização de IMG (isquemia “quente”) do órgão transplantado. Segue posteriormente a metodologia de aquisição e análise das imagens de MIF da microcirculação cardíaca do enxerto cervical e o restante da metodologia incluindo estudos *in vitro* comparando as CMMO de animais com e sem aterosclerose. Por fim, são apresentados os resultados, a discussão dos mesmos, as conclusões do estudo, as perspectivas futuras e as referencias bibliográficas.

1 HIPÓTESES DO ESTUDO

- A cinética das CMMO na microcirculação cardíaca, quando injetadas pela via ICO, é semelhante àquela apresentada por leucócitos durante estados inflamatórios (rolamento, firme adesão e transmigração).
- A isquemia miocárdica altera a cinética das CMMO na microcirculação cardíaca.
- Após isquemia miocárdica a presença de aterosclerose altera a cinética das CMMO na microcirculação cardíaca.

2 OBJETIVOS DO ESTUDO

2.1 Objetivos primários

- Desenvolver um novo modelo experimental que permita o transplante celular pela via ICO em camundongos.
- Realizar a visualização *in vivo* das CMMO transplantadas na microcirculação cardíaca antes e após a indução de IMG.

2.2 Objetivos secundários

- Comparar através de estudos *in vitro* as características quantitativas, fenotípicas e funcionais de CMMO em camundongos com e sem aterosclerose.
- Avaliar a relação entre as características das CMMO transplantadas e parâmetros de MIF.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Camundongos, C57Bl/6 selvagens (Bl6), C57Bl/6 *knockout* (KO) para o gene da Apolipoproteína E (ApoE^{-/-}) e C57Bl/6 KO para o gene da PECAM-1 (Pecam^{-/-}), de ambos os gêneros e pesando acima de 26 g, foram utilizados (Charles River Laboratories, Wilmington, Mass, USA). Os animais foram mantidos em ciclos diários de 12 horas de escuridão, alternadas com 12 horas de exposição à luz, tendo livre acesso a água e ração padrão (Altromin, Lage, Alemanha). Os animais ApoE receberam ração com alto conteúdo lipídico durante pelo menos 8 semanas. Animais endogâmicos foram utilizados para garantir o transplante singeneico, tanto do enxerto cardíaco quanto das CMMO, de um único animal doador, para um animal receptor, por experimento *in vivo*, visando evitar a rejeição dos tecidos transplantados. Todos os animais foram submetidos a procedimentos experimentais de acordo com a legislação de proteção a animais alemã, aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa e Experimentação Animal do Estado de Saarland, Alemanha. Em todos os experimentos os camundongos foram anestesiados com injeção intraperitoneal (i.p.) de quetamina (75 mg/kg de peso, Pharmacia GmbH, Erlangen, Alemanha) e xilazina 2% (15 mg/kg de peso, Rompun, Bayer, Leverkusen, Alemanha). Durante os procedimentos de transplante cardíaco, MIF e análise do enxerto cardíaco por ecocardiografia e ressonância magnética, os animais foram mantidos sedados com isoflurano 2% sob fluxo de O₂ e aquecidos (37°C). Os animais foram sacrificados ainda anestesiados, mediante esternotomia, diafragmatomia e ventriculotomia.

3.2 Protocolo de avaliação *in vivo* do transplante intracoronariano de CMMO marcadas na microcirculação cardíaca, após isquemia miocárdica global

3.2.1 Descrição dos grupos experimentais estudados

Os animais foram divididos em 5 grupos distintos:

GRUPO 1 - camundongos Bl6 (n=6) que 3 horas após receberem o coração singeneico transplantado, foram submetidos à infusão ICO de CMMO, sem a prévia realização de IMG do enxerto cervical. **GRUPO 2** - camundongos Bl6 (n=6) que 3 horas após receberem o coração singeneico transplantado, foram submetidos à infusão ICO de CMMO, com a prévia realização de IMG do enxerto cervical, durante 1 hora. **GRUPO 3** - camundongos ApoE^{-/-} (n=6) que 3 horas após receberem o coração singeneico transplantado, foram submetidos à infusão ICO de CMMO, com a prévia realização de IMG do enxerto cervical, durante 1 hora. **GRUPO 4** - camundongos Bl6 (n=6) que 3 horas após receberem o coração singeneico transplantado, foram submetidos à ICO de meio sem CMMO, com a prévia realização de IMG do enxerto cervical, durante 1 hora. **GRUPO 5** - camundongos PECAM^{-/-} (n=2) que 3 horas após receberem o coração singeneico transplantado, foram submetidos à infusão ICO de CMMO, com a prévia realização de IMG do enxerto cervical, durante 1 hora (Tabela 1).

Tabela 1. Descrição dos grupos experimentais estudados

	Animais*	N**	Isquemia fria [†]	Isquemia quente ^{††}	Injeção IC de CMMO *
Grupo1	Bl6	6	Sim	Não	Sim
Grupo2	Bl6	6	Sim	Sim	Sim
Grupo3	ApoE ^{-/-}	6	Sim	Sim	Sim
Grupo4	Bl6	6	Sim	Sim	Não
Grupo5	Pecam-1 ^{-/-}	2	Sim	Sim	Sim

*doadores e receptores; ** Numero de procedimentos; [†] durante o TCHC; ^{††}IMG do enxerto cervical iniciada 1h após o TCHC, durante 1h; *1h após final da isquemia quente. N-número de procedimentos por grupo; IC-intracoronariana; CMMO-células mononucleares de medula óssea; TCHC-transplante cardíaco heterotópico cervical; IMG-isquemia miocárdica global

3.2.2 Técnica de transplante cardíaco heterotópico cervical modificada

O animal doador anestesiado foi colocado sobre uma plataforma microcirúrgica na posição supina. A artéria carótida comum foi acessada e isolada através de uma incisão paramediana longitudinal na face ventral cervical. O vaso foi

ligado distalmente, antes de sua bifurcação entre artérias carótidas interna e externa. A porção proximal foi clampeada, logo após a sua emergência pela abertura superior da caixa torácica. Uma pequena incisão foi feita proximalmente à ligadura distal e o vaso foi embebido topicamente com heparina (5UI/0.1ml salina). Um pequeno microcateter de polietileno, acoplado a uma seringa (1 ml) com solução salina, foi introduzido retrogradamente através da incisão. O clamp microvascular foi removido e o microcateter progredido, fixando-se sua ponta na artéria carótida, com uma ligadura circunferencial (fio de sutura, 11-0, nylon). A seguir, uma laparotomia com incisão na linha mediana foi realizada, seguida do isolamento dos grandes vasos abdominais. O tronco celíaco e a artéria mesentérica superior foram ligados, 5 UI de heparina foram injetados na veia cava abdominal e cerca de 0.4 mL de sangue foram aspirados da mesma, para subsequente preparo de meio das CMMO.

Para a conservação do coração transplantado, foi infundida uma solução de preservação de órgãos Perfadex gelada (Viaspan, Suécia) retrogradamente na aorta abdominal (10 min., 100 mmH₂O). O início dessa infusão definiu o começo do período de isquemia fria. A caixa torácica foi concomitantemente aberta através de uma esternotomia na linha média. Após um período de 10 minutos de infusão, a veia cava inferior foi ligada e dissecada até a sua junção com o átrio direito. A superfície ventral do coração foi recoberta por uma gaze embebida em solução de preservação gelada. Posteriormente realizou-se o isolamento da aorta ascendente e do tronco braquiocefálico, juntamente com a artéria subclávia direita e a artéria carótida comum direita, incluindo o cateter acoplado à seringa, fixado previamente. A artéria subclávia direita foi ligada na sua origem e cortada distalmente. A artéria carótida comum direita também foi cortada distalmente ao ponto de inserção do cateter. O arco aórtico foi isolado incluindo a origem da artéria carótida comum esquerda e da artéria subclávia esquerda, sendo então cortado na porção proximal da aorta descendente. Então, o tronco da artéria pulmonar foi isolado e cortado logo abaixo da bifurcação entre as artérias pulmonares direita e esquerda. Uma ligadura (9-0 nylon) posterior ao coração foi realizada incluindo todas as conexões vasculares restantes. Finalmente, os enxertos foram rapidamente excisados e mantidos no gelo para posterior transplante.

No animal receptor, uma incisão paramediana foi realizada na face direita ventral cervical. A artéria carótida comum e a veia jugular externa foram dissecadas,

ligadas distalmente e clampeadas proximalmente. As porções distais livres de ambos os vasos foram lavadas com heparina. A administração de heparina sistêmica não foi realizada. Na parede anterior da porção mais distal de ambos os vasos foi realizada uma sutura transmural visando puxar os vasos através dos manguitos de polietileno, cada um medindo aproximadamente 1 mm de comprimento (0,6 mm e 0,8 mm de diâmetro para os “cuffs” arterial e venoso respectivamente). Posteriormente, as porções distais dos vasos foram evertidas sobre os cuffs e fixadas nos mesmos com ligaduras circunferenciais (9-0, nylon). O implante do enxerto cardíaco foi realizado simplesmente acoplando-se à luz do arco aórtico e do tronco da artéria pulmonar do enxerto cardíaco os cuffs previamente fixados à artéria carótida e à veia jugular do recipiente, respectivamente (Figura 2).

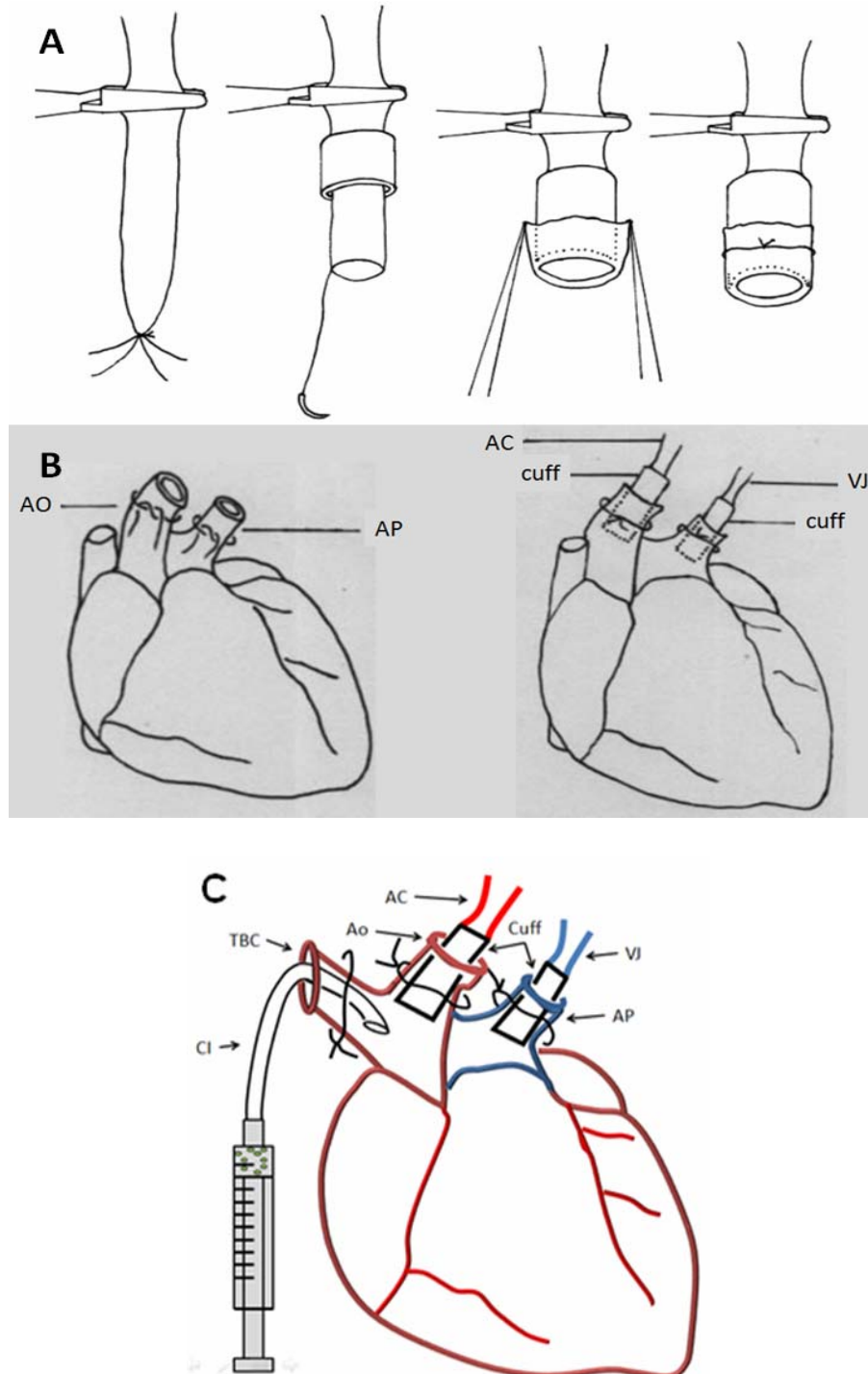


Figura 2: Técnica modificada do transplante cardíaco heterotópico cervical. A - Método de preparação dos vasos cervicais do animal receptor com a utilização de "cuff". Após aplicação do microclamp vascular na porção proximal do vaso, o vaso é seccionado e a extremidade distal é passada através do orifício interno do "cuff", depois evertida e firmemente fixada com ligadura circunferencial. B - Exemplo de preparo de enxerto cardíaco convencional. Tanto a artéria carótida comum quanto a veia jugular externa do animal receptor, com cuffs já fixados, são acopladas às luzes internas da aorta e da artéria pulmonar do enxerto cardíaco, respectivamente, com posterior fixação mediante adicionais ligaduras circunferenciais. C - Técnica modificada e preparo do enxerto cardíaco com preservação do tronco braquicefálico no qual está fixado o cateter de injeção das CMMO. CI, Cateter de injeção; TBC, Tronco braquiocefálico; Ao, Aorta; AC, Artéria carótida; AP, Artéria pulmonar; VJ, veia jugular.

A fixação das anastomoses foi feita com ligaduras circunferenciais (9-0, nylon). A reperfusão do coração transplantado ocorreu com a remoção dos microclamps vasculares que ocluíam, tanto a veia jugular externa direita quanto a artéria carótida direita do animal receptor (Figura 3).

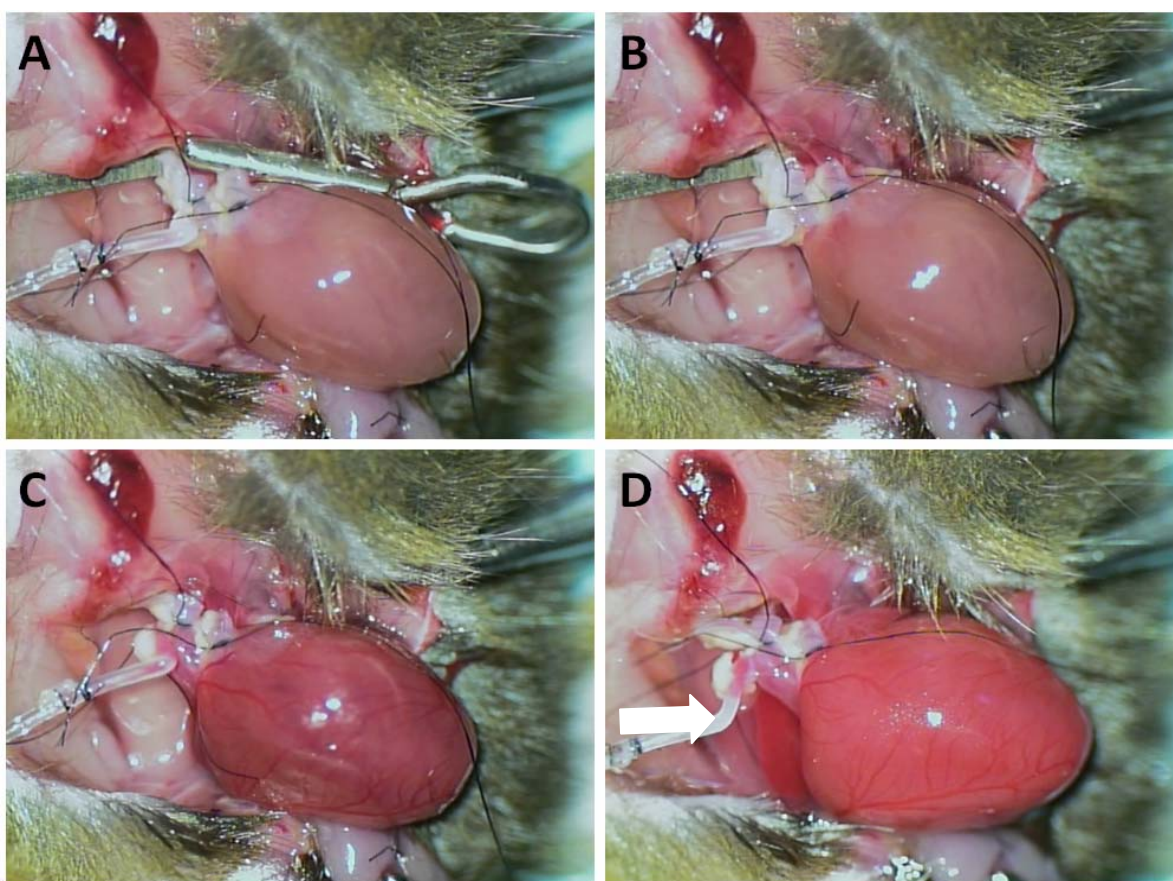


Figura 3: Técnica de reperfusão do enxerto cardíaco cervical após isquemia “fria”. A - Após estabelecimento das anastomoses entre os vasos cervicais do animal receptor e os vasos do enxerto cardíaco, o mesmo encontra-se pronto para a reperfusão que determina o final do período de isquemia “fria”. B - Primeiramente o microclamp que oclui a veia jugular é retirado. C - Posteriormente é removido o microclamp que oclui a artéria carótida do animal receptor, responsável pela irrigação sanguínea do enxerto. Imediatamente após o restabelecimento do fluxo sanguíneo, observa-se a mudança da coloração do enxerto. D - Enxerto totalmente perfundido com visualização macroscópica dos vasos subepicárdicos. (Seta branca – ponta do microcateter de injeção fixada no tronco braquiocefálico do enxerto cardíaco).

Todos os procedimentos de transplante foram realizados por um cirurgião treinado e experiente. Após a reperfusão, para se evitar o ressecamento da superfície epicárdica, o coração transplantado foi recoberto por uma gaze embebida em PBS, até a realização dos procedimentos subsequentes.

3.2.3 Indução de isquemia miocárdica global (“isquemia quente”)

Exatamente uma hora após o momento de reperfusão pós-transplante, foi realizada novamente a colocação de um microclamp vascular, apenas na artéria carótida direita do animal receptor, proximalmente ao local da anastomose desse vaso com a aorta do coração transplantado. Após um período fixo de 1 hora, durante o qual o coração transplantado ficou inteiramente desprovido de aporte sanguíneo (isquemia miocárdica global), o microclamp foi retirado, com imediata reperfusão do enxerto (Figura 4). Então, o coração transplantado foi novamente recoberto por uma gaze embebida em PBS, até a realização dos procedimentos de MIF.

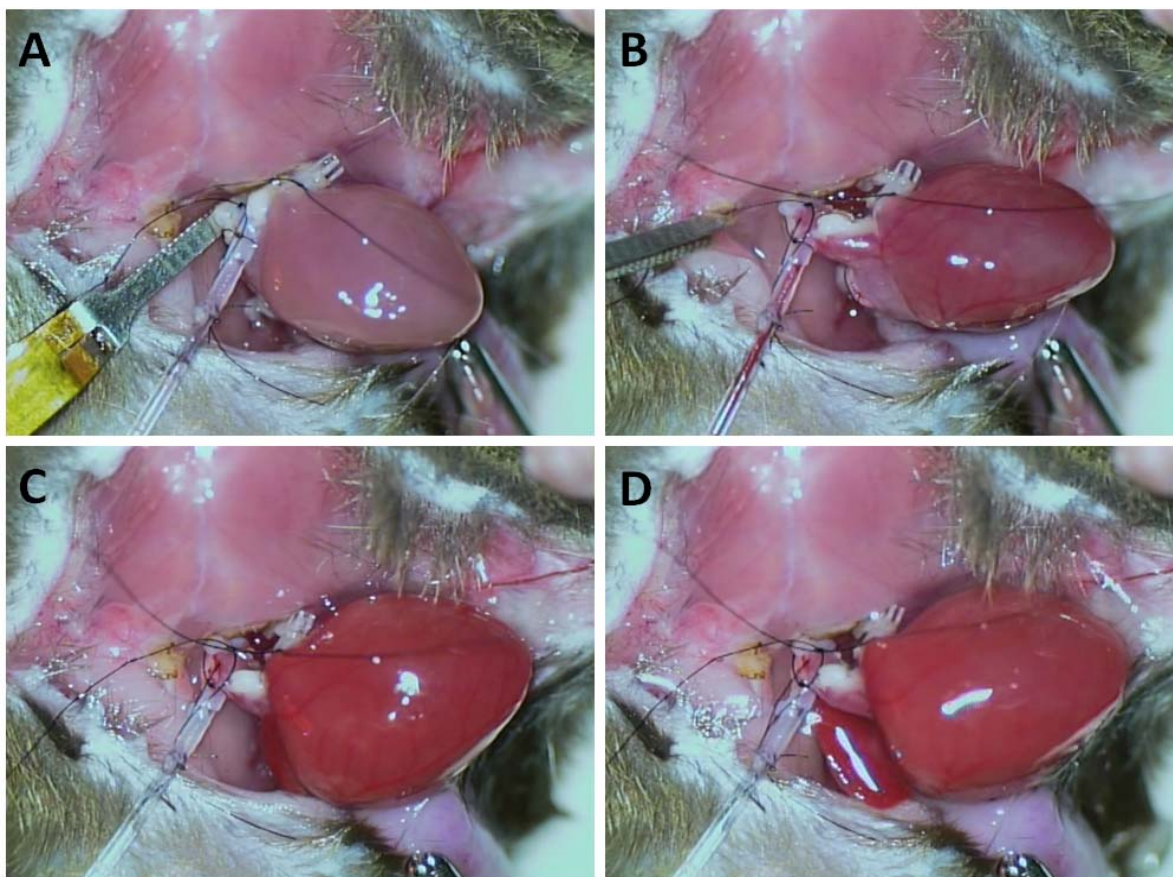


Figura 4: Técnica de reperusão do enxerto cardíaco cervical após isquemia “quente”. A -Microclamp aplicado sobre a artéria carótida direita do animal receptor, gerando isquemia global de todo o enxerto cardíaco. Miocárdio de aspecto acinzentado e sem perfusão. B-Momento imediatamente após a retirada do microclamp, com perfusão inicial miocárdica e enchimento do ventrículo direito. C-Enxerto cardíaco com miocárdio totalmente perfundido, de coloração avermelhada e evidentes vasos epicárdicos. D-Contração miocárdica do enxerto com discreta redução volumétrica, opacificação dos vasos epicárdicos e efetivo enchimento do átrio direito.

3.2.4 Separação das CMMO

A separação das CMMO foi realizada tanto para o procedimento de injeção ICO *in vivo*, durante a realização da MIF, quanto para os estudos *in vitro*, seguindo protocolo baseado naquele utilizado no estudo clínico REPAIR-AMI . Todos os procedimentos de injeção *in vivo* tiveram como fonte de células a MO dos mesmos animais que doaram o coração. Nesses casos a separação das CMMO se deu logo após terminada a explantação do coração doado. Resumidamente, os membros inferiores foram retirados e seus ossos longos(tíbias e femurs) isolados. A medula óssea no interior dos ossos foi obtida mediante a irrigação com solução salina (10 mL), diretamente em um tubo contendo 25UI de heparina em 0,5 mL de NaCl 0,9%.

A solução foi homogeneizada e filtrada (100µm, BD Falcon), visando a eliminação de eventuais fragmentos indesejáveis de tecido ósseo ou musculares. As CMMO foram isoladas por centrifugação (2200 rpm, 20 min) em gradiente de Ficoll (Biocoll, densidade = 1.077 g/mL, Biochrom AG). O anel de CMMO foi obtido, as células lavadas 2 vezes em PBS (2000 RPM, 5 minutos), contadas de forma automatizada e ressuspensas em PBS (2×10^6 células/ml) para procedimentos posteriores. Todo o procedimento foi realizado de forma estéril em capelas de fluxo laminar.

3.2.5 Marcação e preparo para a injeção das CMMO isoladas

Para a marcação duradoura das CMMO injetadas pela via ICO *in vivo* e sua visualização, durante a realização da MIF, foram utilizados dois marcadores fluorescentes simultaneamente, a PKH26 (PKH26-GL, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) e a Rodamina 6G (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, EUA). Primeiramente 2 mL da solução de CMMO (4×10^6 células) foram centrifugados (2000 rpm, 5 min) e as células ressuspensas em 0,4 mL de diluente C (próprio do kit utilizado). O mesmo volume do diluente C com 1,6 µL de PKH26 foi adicionado à solução. As células foram incubadas durante cerca de 5 minutos, no escuro, em temperatura ambiente até a adição de 0,8mL de meio XVIVO 10 (Stemcell tech) contendo 20% de soro autólogo, para a interrupção da reação de marcação. Posterior injeção as CMMO foram lavadas 1x em PBS (2000 rpm, 5 min) e ressuspensas em 1 mL do mesmo. Tal solução (4×10^6 CMMO marcadas com PKH26) foi então incubada com 20 µL de Rodamina 6G também durante cerca de 5 minutos, no escuro e em temperatura ambiente. As células então foram lavadas em PBS (2000 rpm, 5 min) e ressuspensas na concentração de 10^6 células/mL, em meio X Vivo 10 (Stemcell tech) contendo 20% de soro autólogo, para posterior injeção ICO.

3.2.6 Técnica de microscopia intravital de fluorescência

Primeiramente o animal receptor foi colocado sobre a mesa de um microscópio Zeiss AxioTech modificado (Zeiss, Oberkochen, Alemanha), equipado com uma lâmpada de mercúrio de 100 W, sistema de filtros para epi-iluminação

com luz azul (comprimento de onda para excitação: 450-490nm; comprimento de onda para emissão: de verde >520nm), luz verde (excitação: 530-560nm; emissão:>580nm), luz ultra-violeta (excitação: 330-390nm; emissão: de verde >430nm) e 3 lentes objetivas com aumentos distintos (10x, abertura numérica AN = 0.30; 20x, AN=0.50 e 50x, AN=0.55; Zeiss, Oberkochen, Alemanha). As imagens microscópicas foram televisionadas e gravadas utilizando-se uma câmera (FK6990, Pieper, Schwerte, Alemanha) acoplada ao microscópio e um gravador de DVDs para posterior análise.

Uma lâmina circular de vidro pequena e fina foi aplicada gentilmente sobre a área de observação da microcirculação na superfície superior do ventrículo direito do coração transplantado, para se evitar a compressão do tecido e de microvasos do miocárdico. A posição da lâmina de vidro foi ajustada utilizando-se um micromanipulador de modo que a superfície epicárdica, que foi umedecida com PBS, ficasse aderida à face inferior da lâmina de vidro. O início da aquisição das imagens se deu após um período de equilíbrio (cerca de 10 min após a colocação do animal na mesa do microscópio). Utilizando-se o microcateter (acoplado ao tronco braquicefálico do coração transplantado), as observações dos vasos sub-epicárdicos foram realizadas, mediante repetidas infusões de FITC-dextrana (150.000, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) até um volume total de 0,2 ml (Figura 5). Utilizou-se o filtro de luz azul e a lente com aumento de 10x para uma primeira observação da microcirculação.

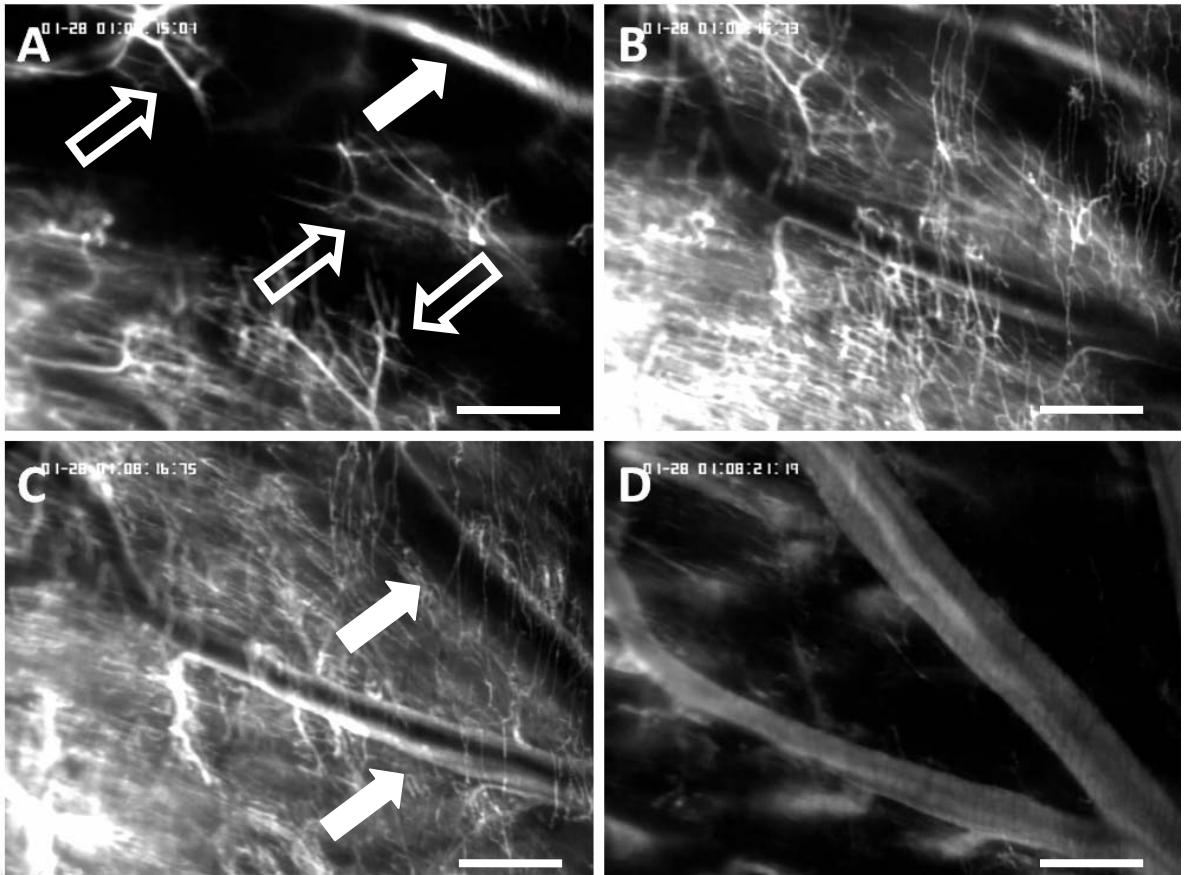


Figura 5: Visualização da microcirculação coronariana mediante infusão de FITC-dextrana. A – Visualização de uma arteríola pré-capilar (seta branca cheia) e das primeiras redes capilares (seta branca vazia) perfundidas pelo FITC-dextrana. B – Redução da perfusão da arteríola pelo FITC-dextrana e aumento generalizado da perfusão de múltiplas redes capilares. C – Ausência de visualização da arteríola, perfusão final das redes capilares e perfusão inicial das vênulas pós-capilares (setas brancas cheias). D – Predomínio de FITC-dextrana no leito das vênulas pós-capilares. Barra branca – 240 μ m.

Foram obtidas, com a lente de maior aumento (50x), antes e após a injeção das CMMO marcadas, pelo menos 3 imagens de campos contendo vênulas pós-capilares e pelo menos 3 imagens de campos contendo exclusivamente capilares.

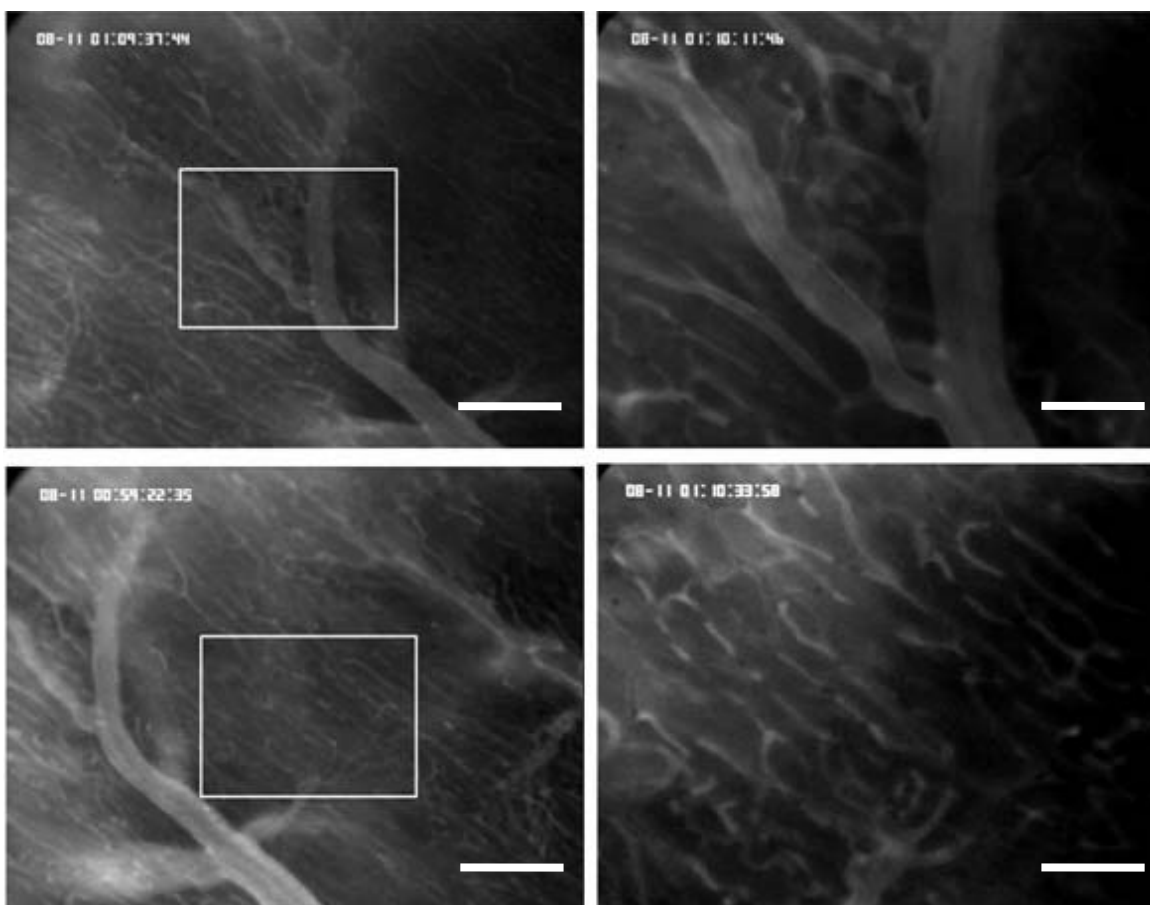


Figura 6: Visualização de capilares e vênulas pós capilares. A-Visualização de vênula pós-capilar (aumento 20x). B - Mesma vênula pós-capilar visualizada em maior aumento (50x). C-Seleção de campo com rede de capilares. D-Mesmo campo de capilares em maior aumento. Barras brancas: A e C – 130 μm ; B e D – 50 μm .

Os seguintes parâmetros microvasculares foram avaliados antes e após a infusão das CMMO marcadas: velocidade de fluxo de hemácias nas venulas pós-capilares (expressa em mm/s), permeabilidade microvascular, definida como a relação entre a intensidade da fluorescência da FITC-dextrana extravascular e a intravascular (expressa em percentual), densidade capilar funcional, definida como o comprimento de capilares nutritivos perfundidos dividido pela área da rede de capilares subepicárdica (expressa em cm/cm^2), velocidade de fluxo de hemácias nas capilares perfundidos (expressa em mm/s) e diâmetro capilar médio (média dos valores de 10 capilares por campo; expresso μm).

Para aquisição das imagens durante a injeção intracoronariana das CMMO marcadas, também através do microcateter, utilizou-se o filtro de luz verde e a lente com aumento de 20x. Durante cerca de 2 minutos, foram infundidas lentamente, cerca de 2×10^6 CMMO marcadas, diluídas em 0,2 ml de meio X Vivo 10 (Stemcell tech) contendo 20% de soro. As interações adesivas entre as CMMO marcadas e o

endotélio microvascular foram avaliadas durante a infusão das células e nos primeiros 5 minutos após o término da infusão. Os seguintes parâmetros foram avaliados durante a infusão das células: rolamento de CMMO, definido pelo número de CMMO que rolaram ao longo da superfície endotelial microvascular das vênulas pós-capilares e ultrapassaram um ponto de referência durante um período de observação de 30 segundos (expresso em células/min/mm de circunferência microvascular) e firme adesão de CMMO definida pela contagem do número de CMMO marcadas que permaneciam estacionadas na superfície endotelial microvascular de um segmento de uma vênula pós-capilar, por pelo menos 30 segundos (expressa em células/mm² de superfície endotelial). Imediatamente após a infusão, o número de CMMO marcadas retidas na rede capilar do miocárdio foi avaliado, em 5 campos consecutivos contendo apenas capilares. Tal parâmetro foi denominado de “plugging cells” e foi expresso em número de células por campo de grande aumento (células/HMF).

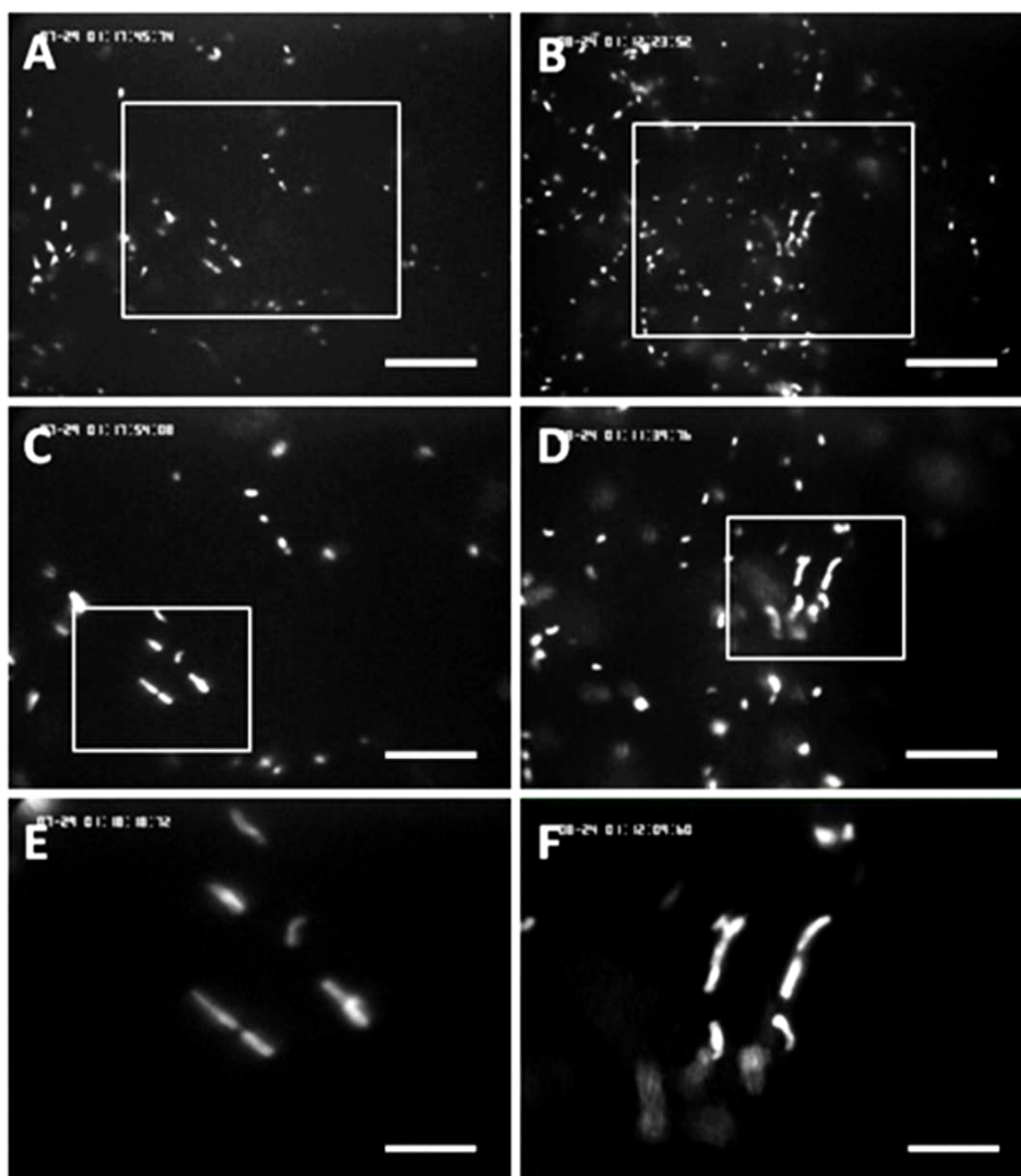


Figura 7: Visualização de CMMO marcadas na microcirculação coronariana. A e B - Visualização das CMMO com distribuição difusa mediante uso do filtro de luz verde com aumento de 10x. C e D - Mesmos campos salientados (retângulo branco) nas imagens A e B. Imagens utilizadas para a contagem do número de CMMO após injeção IC. E e F - Exatos campos salientados (retângulo branco) nas imagens C e D, demonstrando as CMMO individualmente, agrupadas, algumas alinhadas paralelamente. Barras brancas: A e B – 240 μm ; C e D – 130 μm ; E e F – 50 μm .

Todos os parâmetros microcirculatorios foram medidos em 3 a 5 áreas diferentes da microcirculação subepicárdica coronariana do VD do enxerto cardiaco. As medidas foram realizadas com análise das imagens com o programa CapImage (Zeintl, Heidelberg, Alemanha).

3.2.7 Histologia

Os animais foram sacrificados segundo as regras locais da comissão de cuidados animais. Em 4 animais (grupo1=1, grupo2=1, grupo3=1 e grupo4=1), espécimes do coração transplantado e do coração nativo do receptor, foram usados para avaliação histológica de rotina (coloração HE) e para identificação microscópica das células injetadas, imediatamente após a MIF.

3.2.8 Estudo ecocardiográfico do coração transplantado

As imagens do enxerto cardíaco foram obtidas com o animal sedado, posicionado em decúbito lateral esquerdo, após depilação química (Nair hair removal lotion, Church & Dwight Canada Corp., Mississauga, ON, Canada) da região cervical, utilizando-se o aparelho de ecocardiografia de alta resolução (VisualSonics, Toronto, ON, Canada) e uma sonda de microvisualização em tempo real (VisualSonics) com frequência central de 40Hz e profundidade focal de 6 mm. Foram realizadas 3 medidas consecutivas, a partir do traçado no modo M, do espessamento das paredes e do diâmetro interno cavitário (DIC), tanto no eixo curto quanto no longo. Dessas medidas foram calculadas a fração de encurtamento (FEnc) e a fração de ejeção (FE) do VD, ambas dadas em percentuais.

3.3 Protocolos de contagem, avaliação fenotípica e proliferação celular comparando CMMO de camundongos saudáveis com CMMO de camundongos ApoE^{-/-}

Para se avaliar o impacto da presença de aterosclerose em características quantitativas, funcionais e fenotípicas das CMMO, comparou-se 10 camundongos saudáveis com 10 animais ApoE^{-/-}.

3.3.1 Avaliação da recuperação celular após o gradiente de Ficoll

Foi realizada a contagem do número de CMMO obtidas após a separação em gradiente de Ficoll, tanto de camundongos Bl6 quanto de camundongos ApoE^{-/-}. Cerca de 40 µl da solução de CMMO ressuspendidas em PBS (2 x 10⁶ células/ml) foram utilizados para a contagem automatizada.

3.3.2 Caracterização fenotípica por citometria de fluxo

As características fenotípicas das CMMO foram avaliadas por citometria de fluxo, nos dois grupos visando a quantificação de diferentes subpopulações celulares. Utilizou-se o marcador CD45 para determinar a população de leucócitos (*leucogate*) e o percentual de progenitores hematopoiéticos (CD34+) com baixa expressão de CD45 (CD45Lo) foi quantificado utilizando-se o método de Ishage (13). Além disso, outros marcadores de superfície característicos de células tronco, de células progenitoras, além de relevantes moléculas de adesão celular foram pesquisados. As CMMO foram incubadas no escuro, por 30 minutos, com anticorpos contra os seguintes marcadores de superfície: CD45 (clone 30-F11, BD), CD34 (clone MEC14.7, BD), CD133 (clone 13A4, eBioscience), KDR (clone Avas 12α1, BD), Sca-1 (clone E13-161.7, BD), CD11a (clone M17/4, BD), CD11b (clone M1/70, eBioscience), CD62L (clone MEL-14, BD), CD31 (clone MEC13.3, BD), CD54 (clone 3E2, BD), CD162 (clone 2PH1, BD) e CXCR4 (clone 2B11/CXCR4, BD). Os leucócitos foram diferenciados segundo a avaliação do tamanho relativo da célula ("Forward scatter – FSC") e da granulosidade ou complexidade interna da célula ("Side Scatter – SSC") permitindo a classificação dos leucócitos em linfócitos, monócitos e granulócitos. Foram calculados tanto o percentual absoluto de células com os receptores quanto a intensidade média de fluorescência.

3.3.3 Ensaio clonogênico *in vitro*

Foram realizados ensaios clonogênicos *in vitro*, tanto com CMMO de camundongos Bl6 quanto de camundongos ApoE^{-/-}, para a avaliação da capacidade de proliferação e diferenciação de progenitores hematopoiéticos. Cerca de 2 x 10⁴

CMMO por placa (35 mm) foram semeadas em meio semi-sólido e na presença de fatores de crescimento (MethoCult® GF M3534, Stem Cell Technologies inc., Vacouver, Canadá). A contagem de unidades formadoras de colônias granulócitos-macrófagos (UFC-GM) se deu após 14 dias de incubação em atmosfera umedecida, a 37 °C e 5% de CO₂. As colônias foram contadas macroscopicamente e com um microscópio invertido (aumento de 25X). Os experimentos foram realizados em duplicata.

3.4 Análise estatística

Devido ao número reduzido de animais PECAM-1 KO no grupo 5 (n=2), não foram realizadas comparações estatísticas entre os seus dados e aqueles dos outros quatro grupos experimentais. Os dados foram apresentados como os valores médios \pm erro padrão da média e n representa o número de animais, conforme indicado. Diferenças estatísticas foram calculadas através da análise de variância seguida de apropriada análise *post hoc* incluindo a correção do erro tipo α de acordo com as probabilidades Bonferroni, visando a compensação por múltiplas comparações (Sigma Stat Software, Jandel Scientific, EUA). Diferenças foram consideradas significativas para valores de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação *in vivo* do transplante intracoronariano de CMMO marcadas na microcirculação cardíaca, após isquemia miocárdica global

A taxa de sucesso do procedimento de TCHSC singeneico foi superior a 90%.

4.1.1 Tempo de isquemia “fria” durante o transplante cardíaco

Nos grupos avaliados, não houve diferença nos tempos de isquemia “fria” do enxerto cardíaco (Gráfico 1), que ocorreu durante o procedimento do transplante cardíaco, com a infusão da solução de preservação fria para conservação do órgão, iniciada antes da explantação do mesmo.

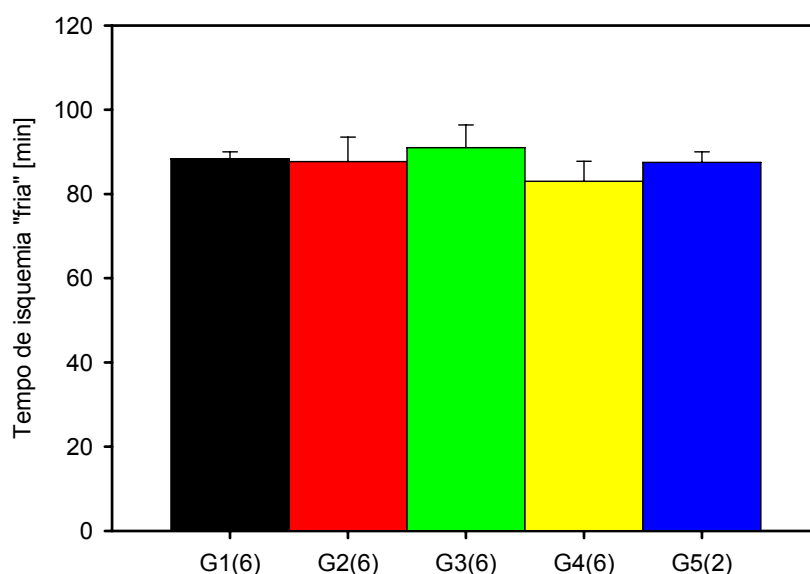


Gráfico 1: Tempo de isquemia “fria” do enxerto (em minutos) durante o procedimento de transplante cardíaco. Barra preta – grupo1(n=6), composto de camundongos B16 saudáveis, que não foram submetidos à isquemia miocárdica global (isquemia “quente”) e que receberam transplante de CMMO. Barra vermelha – grupo 2(n=6), composto de camundongos B16 saudáveis, que foram submetidos à isquemia miocárdica global e posterior transplante de CMMO. Barra verde – grupo 3(n=6), composto de camundongos com aterosclerose, que foram submetidos à isquemia miocárdica global e posterior transplante de CMMO. Barra amarela – grupo 4(n=6), composto de camundongos B16 saudáveis, que foram submetidos à isquemia miocárdica global e posterior transplante de meio com 20% de soro. Barra azul – grupo 5(n=2), composto de camundongos deficientes de Pecam-1, que foram submetidos à isquemia miocárdica global e posterior transplante de CMMO.

Tanto no final do período de isquemia “fria” (Figura 3), quanto no final do período de IMG (isquemia “quente”) (Figura 4), os enxertos cardíacos foram efetivamente reperfundidos, após a remoção dos microclamps colocados nas artérias carótidas dos animais receptores. Esse procedimento mudou-os macroscopicamente, de órgãos sem batimento, com miocárdio de coloração acinzentada, para corações de cor vermelha vívida e com batimentos regulares, iniciados até cerca de 2 minutos após a reperfusão.

4.1.2 Aquisição de imagens e avaliação dos parâmetros de MIF

Foi possível a visualização das arteríolas pré-capilares, das redes de capilares e das vênulas pós-capilares com sucesso, após a infusão de FITC-dextrana. Além disso, a aquisição de imagens antes e após os procedimentos de injeção, para posterior análise de parâmetros microcirculatórios, foi realizada com sucesso em todos os animais. Em alguns animais foi possível a identificação de vasos linfáticos cardíacos.

4.1.3 Influência da isquemia quente nos parâmetros microcirculatórios

Na avaliação do impacto da IMG nos parâmetros microcirculatórios, antes da infusão de CMMO marcadas observou-se uma redução significativa da densidade capilar funcional no grupo 2 (705 ± 31 cm/cm²) comparado ao grupo 1 (866 ± 51 cm/cm²) (Gráfico 2). A presença de aterosclerose pareceu estar relacionada a uma diminuição ainda maior da densidade capilar funcional após a IMG. Foram comparados os resultados dos grupos 2 e 3 e observou-se que, na presença de aterosclerose, comparada à ausência da mesma, houve uma redução significativa da densidade capilar funcional (593 ± 34 cm/cm²) (Gráfico 2). Os demais parâmetros de perfusão microvascular (velocidade de fluxo de hemácias nas venulas pós-capilares, velocidade de fluxo de hemácias nos capilares perfundidos e diâmetro capilar médio) e o parâmetro de inflamação (permeabilidade microvascular) foram semelhantes nos dois grupos, após a IMG (Tabela 2).

4.1.4 Influência da injeção de CMMO nos parâmetros microcirculatórios

Nos grupos 1, 2, 3 e 5 as CMMO foram injetadas rigorosamente 3 horas após o término do período de isquemia fria. No grupo 4, a injeção de meio com 20% de soro se deu também no mesmo momento. A influência da injeção de CMMO na microcirculação do miocárdio isquêmico, foi avaliada comparando-se os parâmetros microcirculatórios dos grupos 2 e 4. Nos dois grupos, os valores basais dos parâmetros microcirculatórios (pós isquemia e antes da injeção das células ou do meio) foram semelhantes e por tanto comparáveis ($p= 0,347$). Após a infusão de CMMO no grupo 2 e de meio no grupo 4 não houve alteração significativa em nenhum dos parâmetros microcirculatórios, quer seja na comparação entre os grupos, quer seja na comparação dos valores prévios à infusão com os valores obtidos após a infusão, dentro dos grupos individualmente. Os valores dos parâmetros microcirculatórios, tanto de perfusão microvascular quanto de inflamação, estão representados na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros microcirculatorios coronarianos avaliados na MIF

		Perfusão microvascular				Inflamação
		DCF	VFHC	DCM	VFHV	PM
		(cm/cm ²)	(mm/seg)	(µm)	(mm/seg)	(%)
Grupo 1 (n=6)	AI	866±51*	0,38±0,04	5,12±0,12	1,19±0,15	0,69±0,01
	DI	837±36	0,31±0,05	5,22±0,23	0,96±0,11	0,70±0,02
Grupo2 (n=6)	AI	705±31	0,39±0,07	4,97±0,23	1,5±0,21	0,73±0,04
	DI	660±19	0,24±0,06	5,05±0,34	1,66±0,21	0,76±0,04
Grupo3 (n=6)	AI	593±34*	0,47±0,14	5,01±0,21	1,56±0,22	0,81±0,10
	DI	655±42	0,30±0,04	4,64±0,29	1,64±0,21	0,73±0,04
Grupo4 (n=6)	AI	763±47	0,36±0,06	4,87±0,19	1,47±0,16	0,72±0,04
	DI	763±60	0,41±0,06	4,90±0,14	1,48±0,26	0,69±0,02
Grupo5 (n=2)	AI	833±22	0,44±0,09	4,74±0,19	1,16±0,02	0,84±0,07
	DI	749±15	0,28±0,01	5,23±0,07	1,30±0,42	0,82±0,22

A microcirculação subepicárdica foi avaliada por microscopia intravital de fluorescência. Parâmetros de perfusão microvascular e de inflamação foram determinados através de análise posterior das imagens gravadas, com uso de um programa específico. Dados apresentados sobre a forma de média±EPM. Foram avaliados animais saudáveis (grupos 1,2 e 4), animais com aterosclerose (grupo3) e animais com deficiência para Pecam-1(grupo 5). Nos 5 grupos foram realizadas avaliações antes (AI) e depois (DI) da injeção de CMMO (grupos 1,2 3 e 5) ou de meio com 20% de soro (grupo 4). Apenas o grupo 1 não foi submetido a 1 hora de isquemia miocárdica global (isquemia “quente”). *p<0,05 vs grupo 2. MIF, microscopia intravital de fluorescência; DCF, Densidade capilar funcional; VFHC, velocidade de fluxo de hemácias nos capilares perfundidos; DCM, diâmetro capilar médio; VFHV, Velocidade de fluxo de hemácias nas venulas pós-capilares; PM, Permeabilidade microvascular.

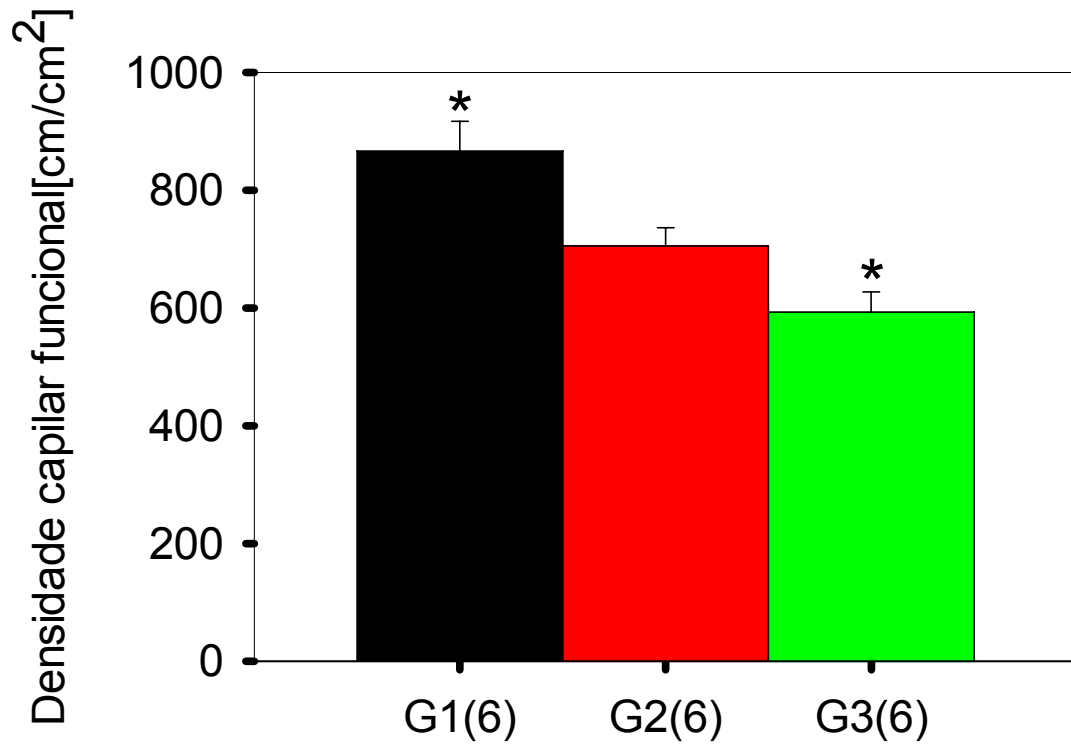


Gráfico 2: Influência da isquemia miocárdica global (isquemia “quente”) na densidade capilar funcional. Na mensuração da densidade capilar funcional, antes da infusão de CMMO marcadas observou-se uma redução significativa no grupo 2 ($705 \pm 31 \text{ cm/cm}^2$) composto de animais B16 ($n=6$) submetidos à 1 h de isquemia miocárdica global, comparado ao grupo 1 ($866 \pm 51 \text{ cm/cm}^2$), também composto de animais B16 ($n=6$), porém não submetidos à isquemia “quente”. A presença de aterosclerose no grupo 3, composto de animais ApoE^{-/-} ($n=6$), pareceu estar relacionada a uma ainda maior diminuição da densidade capilar funcional após a isquemia miocárdica global. Foram comparados os resultados dos grupos 2 e 3 ($593 \pm 34 \text{ cm/cm}^2$) e observou-se na presença de aterosclerose, comparada à ausência da mesma, uma redução significativa da densidade capilar funcional. * $p < 0,05$.

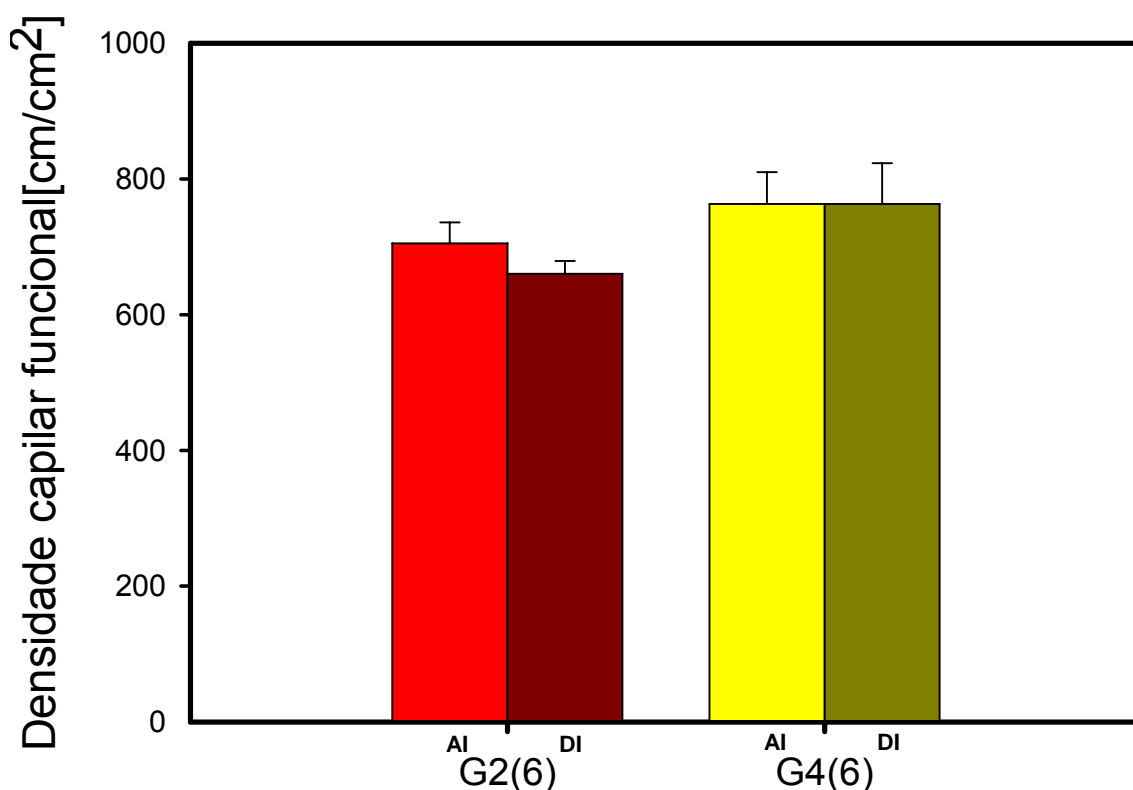


Gráfico 3: Influência da injeção de CMMO na densidade capilar funcional da microcirculação coronariana. Nos grupos 2 e 4 animais B16(n=6 em cada grupo) foram submetidos a 1h de isquemia miocárdica global. No grupo 2, CMMO foram injetadas 3 horas após o término do período de isquemia fria. No grupo 4, a injeção de meio com 20% de soro se deu no mesmo momento. A influência da injeção de CMMO na microcirculação do miocárdio isquêmico, foi avaliada comparando-se os parâmetros microcirculatórios dos grupos 2 e 4. Em ambos os grupos, os valores basais da densidade capilar funcional (pós isquemia “quente” e antes da injeção das células ou do meio) foram semelhantes e por tanto comparáveis ($p= 0,347$). Após a infusão de CMMO no grupo 2 e de meio no grupo 4 não houve alteração significativa da DCF, quer seja na comparação entre os grupos, quer seja na comparação dos valores prévios à infusão com os valores obtidos após a infusão, dentro dos grupos. *AI*, antes da injeção; *DI*, depois da injeção.

4.1.5 Visualização da cinética das CMMO injetadas na microcirculação

Durante a infusão das CMMO, diretamente nas artérias coronárias do coração transplantado, inicialmente não foi documentada nenhuma interação das mesmas com o endotélio das arteríolas pré-capilares.

A ocorrência da clássica e esperada seqüência de eventos de rolamento seguido de adesão celular ao endotélio das vênulas pós-capilares, não foi evidenciada, exceto em um animal do grupo 3. Ao invés disso, nos demais 19 animais que receberam as CMMO, ficou evidente o abrupto (sem prévio rolamento)

acúmulo de uma porção das células injetadas, mediante uma repentina firme adesão das mesmas na rede de capilares miocárdicos, enquanto que a grande maioria das células não ficou retida no coração, seguindo para a circulação sistêmica do animal receptor, através das vênulas pós capilares do enxerto cardíaco, em grande velocidade. As células retidas nos capilares exibiram freqüentemente aspecto de enfileiramento, onde em um único capilar, varias CMMO se acumularam em seqüência (Figura 8).

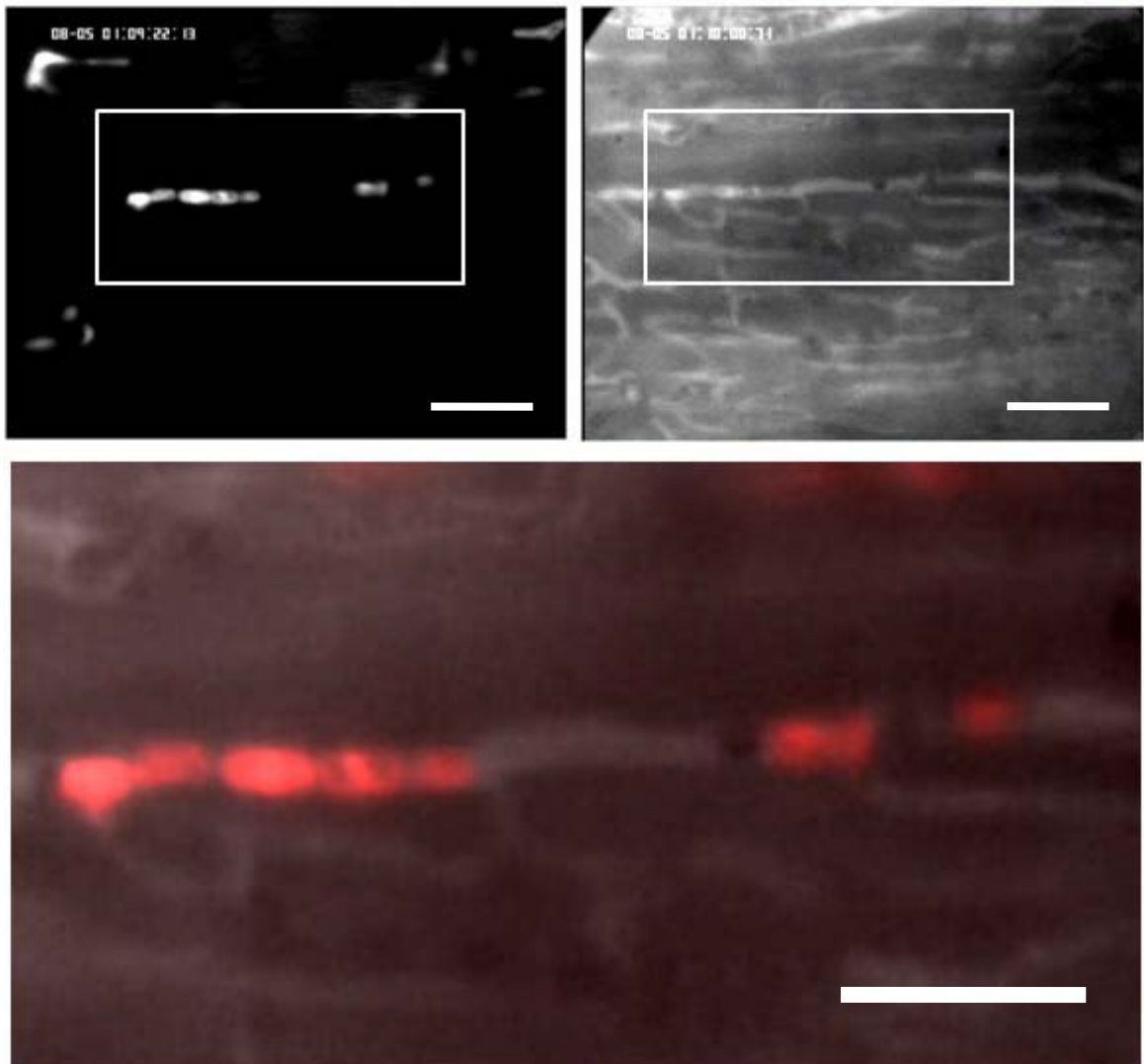


Figura 8: Retenção de varias CMMO em um único capilar ("plugging" microvascular). A - CMMO visualizadas com o uso do filtro verde durante microscopia intravital de fluorescência. B - Visualização da rede de capilares na mesma região em que se encontram as CMMO (retângulo azul). C - Fusão das imagens A e B, em maior aumento, possibilitando a identificação das células (em vermelho) exatamente na topografia do capilar. Barras brancas A, B e C - 50 μ m.

Outras vezes as células retidas, tanto individualmente quanto em grupos, apresentaram um formato semelhante à semente de um feijão (Figuras 7E e 7F). Algumas poucas CMMO exibiram durante sua passagem na rede capilar, uma diminuição da velocidade, chegando até a aderir por alguns segundos ao endotélio capilar, porém se desprendendo do mesmo e seguindo posteriormente, com uma maior velocidade, através das vênulas pós-capilares, sem que houvesse nenhuma interação subsequente, com as células endoteliais venulares.

Não houve diferença estatística no número de células retidas na rede capilar (células por campo) ao final da injeção intracoronariana na comparação entre os grupos 1 (47 ± 7), 2 (49 ± 8) e 3 (54 ± 8), (Gráfico 4).

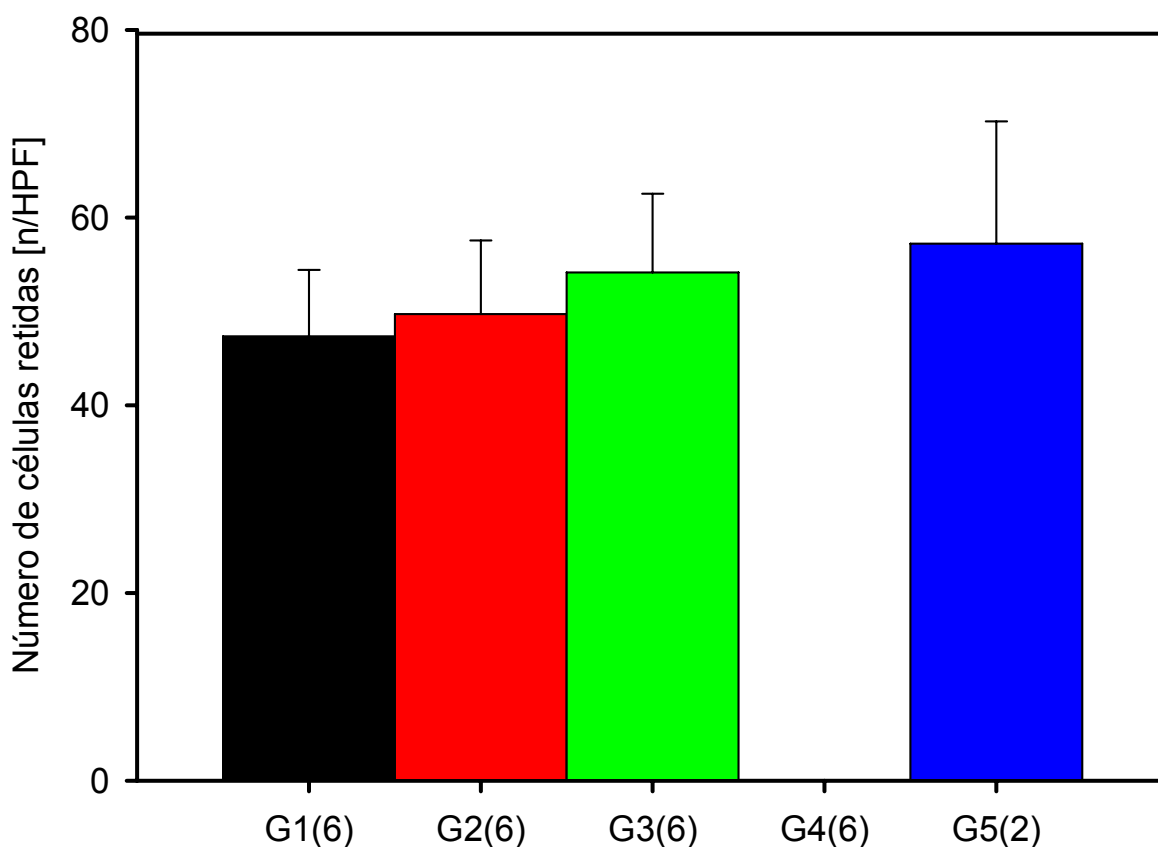


Gráfico 4: Número de células retidas por campo (“plugging cells”) nos diferentes grupos estudados. Contagem realizada após a injeção de CMMO (grupos 1,2,3 e 5) ou de meio (grupo 4). Após a injeção intracoronariana (2×10^6 células), não houve diferença no número de células retidas na rede capilar do enxerto cardíaco (grupo 1 (47 ± 7), grupo 2 (49 ± 8) e grupo 3 (54 ± 8); $p = \text{NS}$). Não foi realizada avaliação estatística comparando o grupo 5 com os demais grupos devido ao pequeno número de animais ($n = 2$).

4.1.6 Visualização *post mortem* das CMMO injetadas

Na avaliação histológica de rotina (coloração HE) foi possível identificar edema tecidual associado ao processo de isquemia nos animais submetidos à isquemia miocárdica global.

No coração transplantado e no coração de 3 animais (grupo1=1, grupo2=1 e grupo3=1), explantados imediatamente após a realização da MIF, foi possível a identificação das CMMO marcadas com rodamina e PKH, utilizando-se microscópio de fluorescência (BZ-8000, Kyence, Japão). No animal controle do grupo 4, a identificação foi negativa.

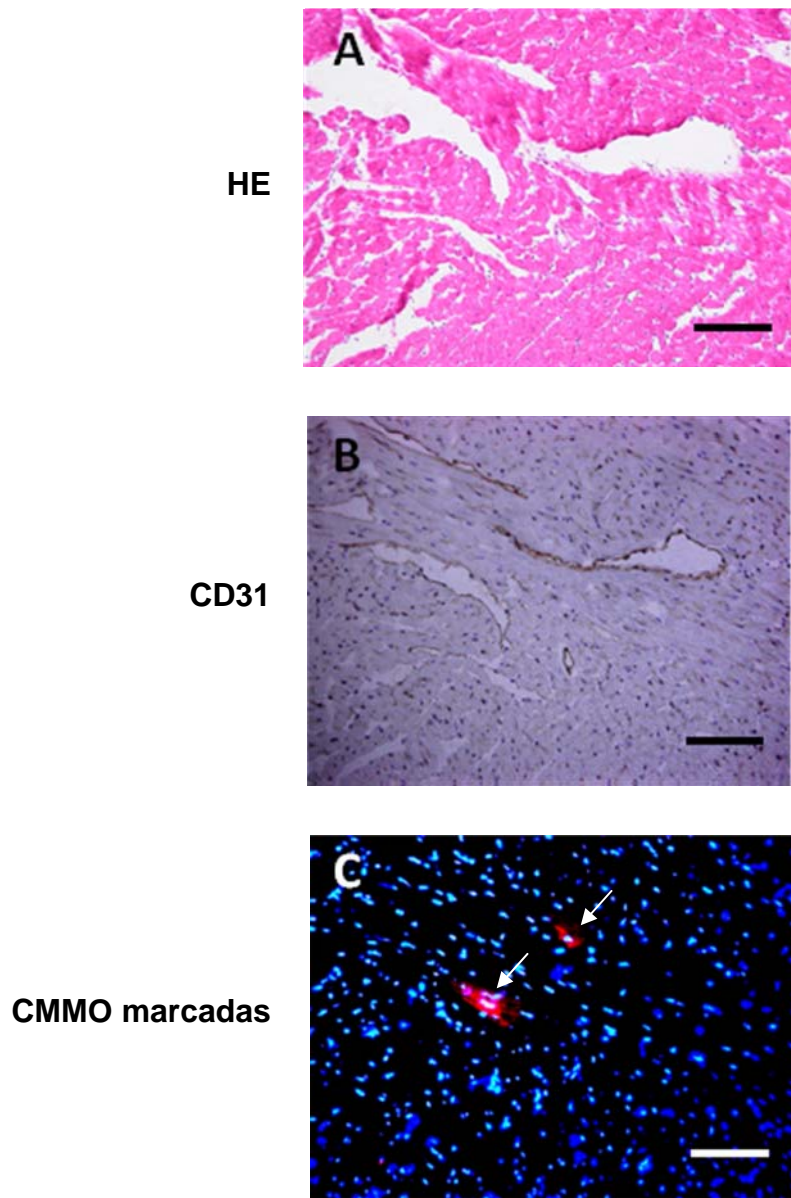


Figura 9 : Análise histológica de uma mesma região do miocárdio do enxerto cardíaco de um camundongo do grupo 2 (B16 submetido à isquemia “quente” e injeção de CMMO marcadas [setas brancas]). A - Coloração com Hematoxilina-eosina (HE). B - Imunohistoquímica com identificação de células com o marcador de superfície CD31. C - Identificação das CMMO marcadas com PKH e rodamina (vermelho), com concomitante identificação dos núcleos celulares por coloração com bisbenzimidida. Barras representam aproximadamente 150 μm .

4.1.7 Estudo ecocardiográfico do coração transplantado

No seguimento pós-injeção ICO de CMMO, a avaliação morfológica e funcional do coração transplantado foi realizada em um total de 12 animais (grupo 1, 2 animais; grupo 2, 3 animais; grupo 3, 4 animais; grupo 4, 2 animais e grupo 5, 1 animal). Mediante sedação com isoflurano 2% foi possível a realização de imagens do enxerto cervical com boa qualidade na maioria dos animais. Imagens no modo M foram usadas para a avaliação do espessamento do septo interventricular, diâmetro da cavidade ventricular direita e espessamento da parede posterior do VD, tanto no final da sístole quanto da diástole. Os volumes cavitários, a fração de encurtamento (FEnc) e a fração de ejeção foram estimados indiretamente. A frequência cardíaca também foi observada. Foram avaliados 4 tempos distintos após o transplante (1 - entre o primeiro e o terceiro dia, 2 - no sétimo dia, 3 - no décimo quarto dia e 4 - vigésimo oitavo dia), sendo realizadas três mensurações de cada parâmetro, tanto em imagens do eixo longo cardíaco quanto do eixo curto. A frequência cardíaca diminuiu, enquanto que a FEnc e a FE aumentaram gradativamente (Gráfico 5). Devido ao pequeno n de animais não foi possível análise estatística dos dados, entretanto a técnica se mostrou exequível (Figura 10).

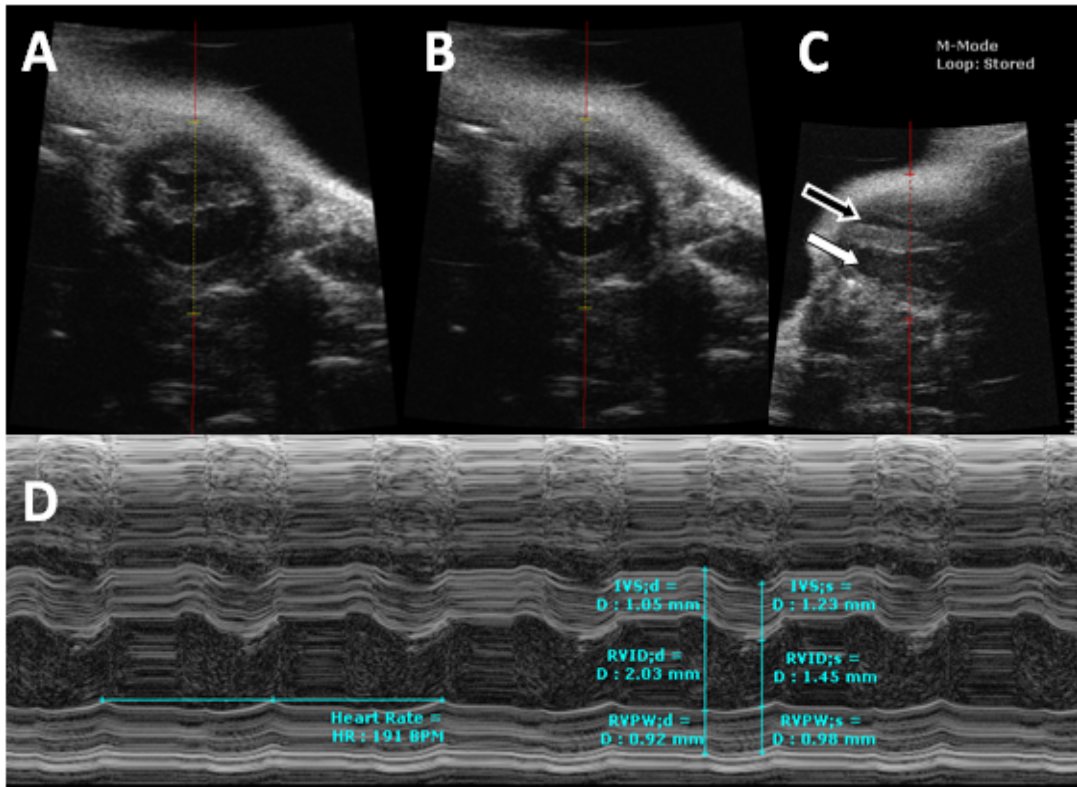


Figura 10. Imagens do enxerto cardíaco cervical por ecocardiografia. Imagens (modo B) do enxerto cardíaco cervical no eixo curto durante a diástole (A) e a sístole (B). Imagem no eixo longo, onde o ventrículo direito encontra-se com volumes aumentados e inferior (seta branca) em relação ao ventrículo esquerdo (seta escura). No modo M (D), foram avaliados o espessamento do septo interventricular e da parede posterior do ventrículo direito, além do diâmetro cavitário, tanto no final da diástole (no ponto de máximo diâmetro) quanto no final da sístole (no ponto de máxima excursão da parede posterior associado ao menor diâmetro interno cavitário). A frequência cardíaca também foi medida, usando-se o traçado do modo M. Todos os valores foram apresentados como a média de 3 mensurações, usando técnica e fórmulas convencionais para o cálculo da fração de encurtamento (FEnc) e da fração de ejeção (FE).

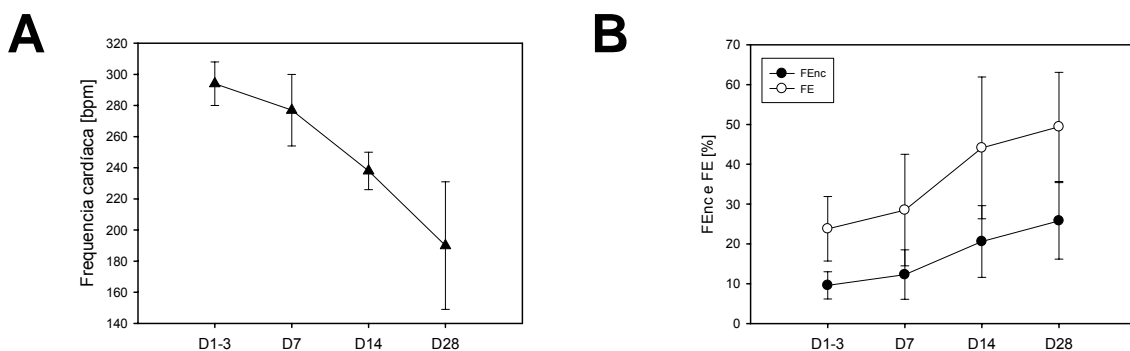


Gráfico 5: Avaliação do enxerto cardíaco cervical por ecocardiografia. Foram avaliados os animais do grupo 3 (n=4), formado por camundongos ApoE^{-/-} que foram submetidos à injeção de CMMO após isquemia global do enxerto cardíaco. Ao longo de quatro semanas houve uma gradativa diminuição da frequência cardíaca do enxerto (A). Tanto a FEnc (círculos pretos) quanto a FE (círculos brancos), aumentaram ao longo do primeiro mês após o transplante cardíaco e a injeção ICO de CMMO (B).

4.2 Recuperação celular da população mononuclear isolada da medula óssea de camundongos com e sem aterosclerose

Não houve diferença estatística no número de células recuperadas a partir do gradiente de Ficoll. (Gráfico 6).

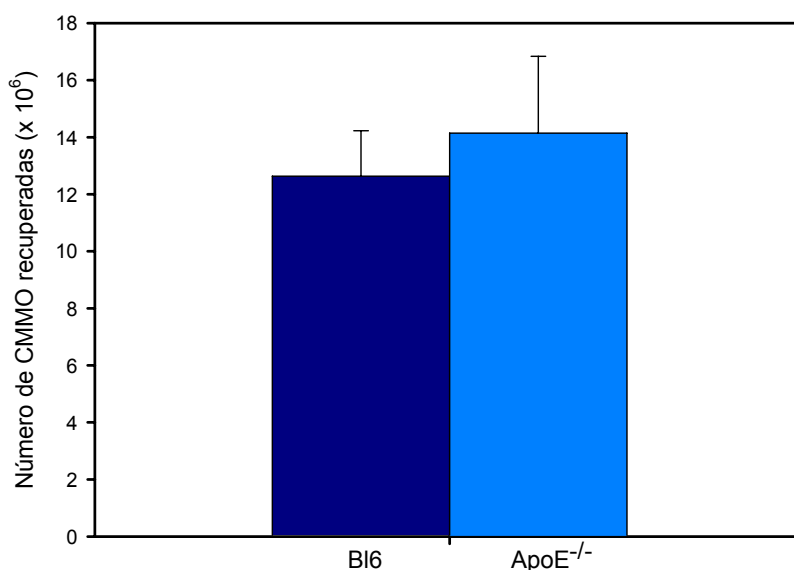


Gráfico 6: Recuperação celular após gradiente de Ficoll. Número de CMMO recuperadas em camundongos BI6 (n=10) sem aterosclerose (barra azul escuro) e em animais ApoE^{-/-} (n=10) com aterosclerose (barra azul claro). Não houve diferença na contagem do número de CMMO isoladas entre os grupos.

4.3 Caracterização fenotípica da população mononuclear isolada da medula óssea de camundongos com e sem aterosclerose

Quanto às características fenotípicas das CMMO isoladas em ambos os grupos não se observou diferença no percentual de células CD45lowCD34+ em relação ao total de CMMO obtidas segundo a metodologia ISHAGE (Gráfico 7).

Em relação ao total de CMMO, nem o percentual das células CD34+, nem a IFM das mesmas foram significativamente diferentes na comparação entre os grupos.

Ao avaliar-se as células CD45lowSca-1+ (segundo os mesmos passos do protocolo ISHAGE, avaliando o marcador Sca-1 ao invés do CD34), não se observou

diferenças nem no percentual de células com esse fenótipo, nem nos valores de IMF, na comparação de animais com e sem aterosclerose.

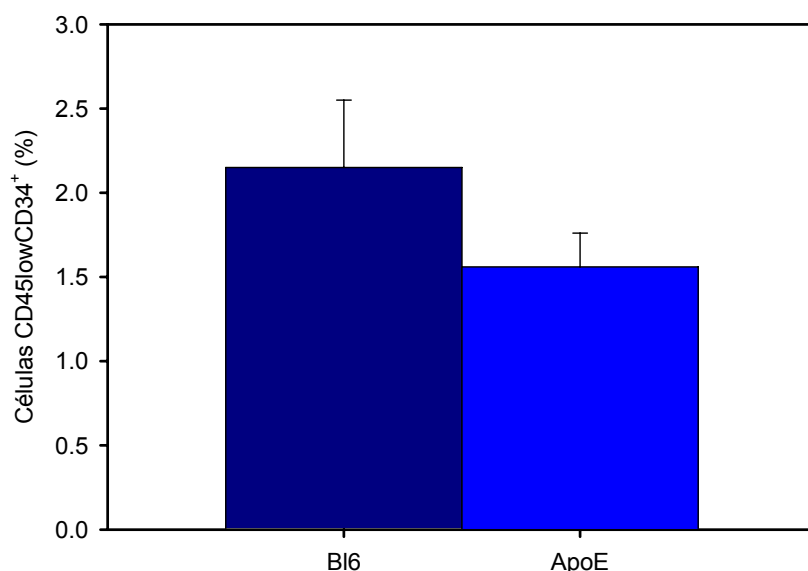


Gráfico 7: Avaliação de células CD45lowCD34+ (%) segundo o protocolo ISHAGE. Os valores percentuais de CMMO com o fenótipo CD45lowCD34+ foram semelhantes quando comparados em camundongos B16 (n=10) sem aterosclerose (barra azul escuro) e em animais ApoE^{-/-} (n=10) com aterosclerose (barra azul claro).

Quanto ao estudo das células CD133+ os percentuais e os valores de IMF das mesmas, em relação ao total de CMMO foram semelhantes em ambos os grupos. Também não houve diferença na comparação entre os animais com e sem aterosclerose, quanto aos valores percentuais de células Sca-1+/VEGRF2+, avaliados em relação ao total de CMMO. Quanto ao estudo de moléculas de adesão celular, observou-se um aumento significativo do percentual de células CD54+ em relação ao total de CMMO, no grupo de animais saudáveis comparado ao grupo de animais ApoE^{-/-} (81,44±2,29 vs. 74,37±3,10; p=0,018). Não houve diferenças estatísticas nas comparações realizadas para as demais moléculas de adesão (CD11a, CD11b, CD31, CD62L e CD162). Resultados semelhantes, sem diferença entre os grupos, foram observados para as células CXCR4+.

Tabela 3. Avaliação dos marcadores de superfície de células tronco/progenitoras por citometria de fluxo

	CD34+ (%)	Sca-1+ (%)	CD133+ (%)	CD45^{low}CD34+ (%)	CD45^{low}Sca-1+ (%)	Sca-1+KDR+ (%)
Bl6	23,5±3,6	19,0±1,8	48,6±3,7	2,15±0,4	0,62±0,05	2,0±0,4
ApoE	16,2±2,3	21,9±3,2	40,8±4,5	1,56±0,8	0,96±0,2	1,5±0,2
p	0,093	0,549	0,219	0,192	0,438	0,228
	CD34+ (IFM)	Sca-1+ (IFM)	CD133+ (IFM)	CD45^{low}CD34+ (IFM)	CD45^{low}Sca-1+ (IFM)	Sca-1+ KDR+ (IFM)
Bl6	22,9±3,1	20,2±1,0	147,9±16,0	NA	NA	NA
ApoE	15,2±2,3	28,9±4,4	132,2±11,8	NA	NA	NA
p	0,059	0,098	0,433	-	-	-

Na comparação entre animais com e sem aterosclerose, não houve diferença significativa entre os percentuais de CMMO positivas para marcadores de células-tronco / progenitoras. A intensidade de fluorescência média (IFM) também foi semelhante. NA - não avaliado.

Tabela 4. Avaliação das moléculas de adesão celular por citometria de fluxo.

	CD11a (%)	CD11b (%)	CD31 (%)	CD54 (%)	CD62L (%)	CD162 (%)
Bl6	88,7±1,4	64,9±2,5	39,4±3,5	81,4±2,3	31,6±4,1	91,0±1,8
ApoE	88,2±2,0	70,1±4,8	35,6±5,7	74,4±3,1	41,4±2,3	93,7±0,7
p	0,860	0,373	0,593	0,018	0,056	0,532
	CD11a (IFM)	CD11b (IFM)	CD31 (IFM)	CD54 (IFM)	CD62L (IFM)	CD162 (IFM)
Bl6	159,4±3,3	396,55±71,3	24,2±4,5	29,8±3,4	21,0±2,0	715,7±36,8
ApoE	164,3±3,8	433,74±53,3	27,7±4,6	27,5±3,2	29,0±3,5	709,3±49,4
p	0,359	0,554	0,593	0,622	0,066	0,919

Dentre as moléculas de adesão avaliadas na CMMO, tanto em camundongos Bl6 saudáveis quanto em animais com aterosclerose, apenas a expressão de CD54 (%) estava aumentada no grupo saudável. As demais moléculas apresentaram percentuais e intensidade de fluorescência média (IFM) semelhantes.

Nos experimentos *in vivo* o número de células retidas não se correlacionou nem com os parâmetros de MIF (perfusão microvascular e inflamação), nem com o tempo de isquemia “fria”.

Tabela 5. Correlação entre o número de células retidas e o tempo de isquemia “fria” / parâmetros microcirculatórios de MIF

		TIF	Perfusão microvascular				Inflamação
			DCF	VFHC	DCM	VFHV	PM
“Plugging cells”	r	0.0109	0.192	0.363	-0.269	-0.0482	0.206
	p	0.966	0.432	0.126	0.265	0.845	0.398

MIF, microscopia intravital de fluorescência; *TIF*, Tempo de isquemia “fria”; *DCF*, Densidade capilar funcional; *VFHC*, Velocidade de fluxo de hemácias nos capilares perfundidos; *DCM*, diâmetro capilar médio; *VFHV*, Velocidade de fluxo de hemácias nas venulas pós-capilares; *PM*, Permeabilidade microvascular. Coeficiente de Pearson (r). Valores significativos para $p < 0,05$.

Dos 20 animais usados como doadores de CMMO, 5 participaram dos protocolos *in vivo* de injeção intracoronariana (1 animal no grupo 1, 2 animais no grupo 2 e 2 animais no grupo 3) e também tiveram suas CMMO submetidas à análise por citometria de fluxo. A partir da avaliação dos dados desses animais observou-se uma forte correlação linear positiva entre a IMF de células CXCR4+ e o número de células retidas no miocárdio (coeficiente de correlação de Pearson $r = 0,972$; $p = 0,005$).

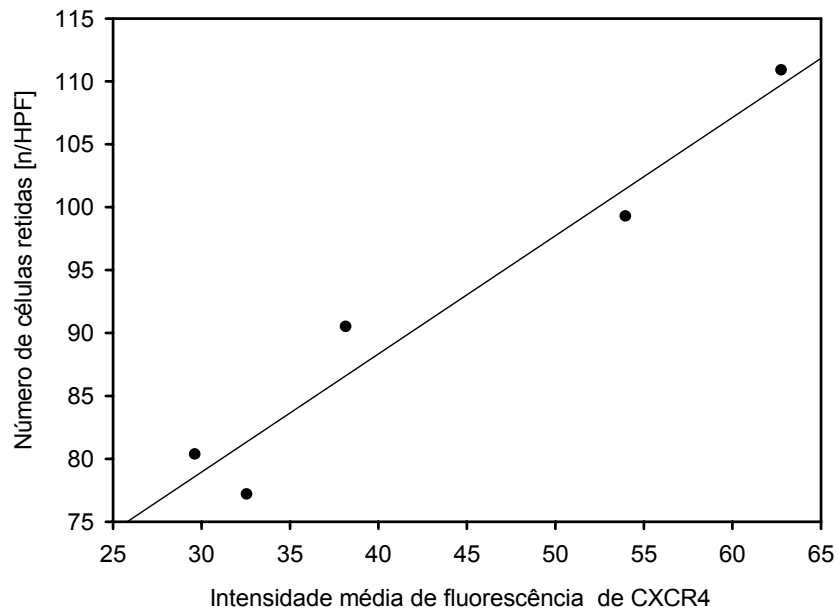


Gráfico 8: Correlação entre o número de células retidas e a expressão de CXCR4. Em cinco animais que participaram do projeto *in vivo*, foi realizada a avaliação por citometria de fluxo de marcadores de superfície celular. Houve forte correlação positiva entre o a expressão de CXCR4 nas CMMO injetadas e o número de células retidas na rede capilar do enxerto cardíaco cervical, após a injeção pela via intracoronariana (coeficiente de Pearson $r = 0,972$; $p = 0,005$).

4.4 - Avaliação funcional da população mononuclear isolada da medula óssea de camundongos com e sem aterosclerose

Na avaliação da capacidade de proliferação e diferenciação de progenitores hematopoiéticos observou-se um aumento significativo no número de colônias de granulócitos-macrófagos, obtidas a partir das CMMO de animais ApoE comparados aos B16 sem aterosclerose, tanto na avaliação macroscópica, quanto na contagem microscópica. Os resultados estão no Gráfico 9.

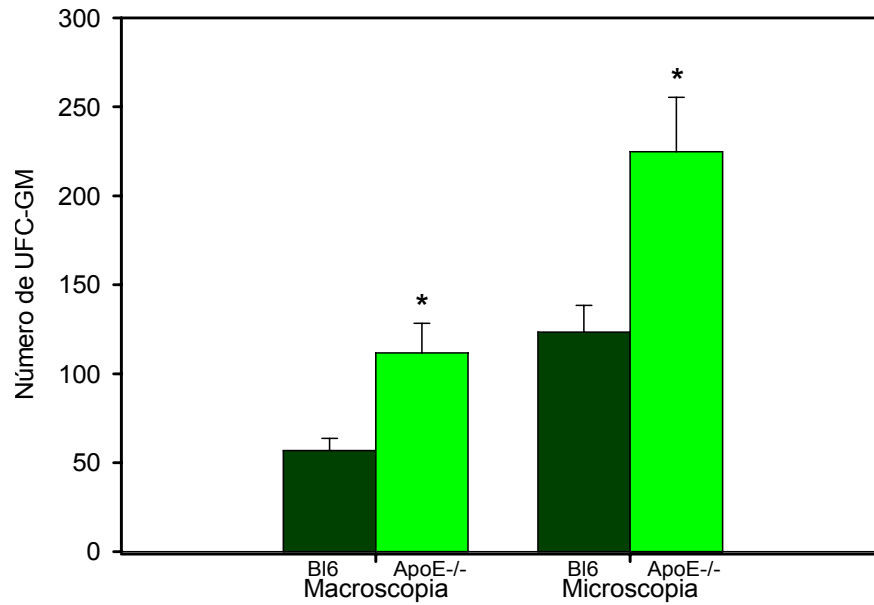


Gráfico 9: Ensaio clonogênico *in vitro*. CMMO (2×10^4) de camundongos BI6 e de camundongos ApoE^{-/-}, foram semeadas, na presença de fatores de crescimento, para a avaliação da capacidade de proliferação e diferenciação de progenitores hematopoiéticos. Após 14 dias as colônias foram contadas macroscopicamente e com um microscópio invertido (aumento de 25X). Animais com aterosclerose exibiram contagem de unidades formadoras de colônias granulócitos-macrófagos (UFC-GM) aumentada em relação aos camundongos BI6. *p<0,05 vs.BI6.

4.5 Enumeração dos principais resultados

1. A injeção de CMMO pela via ICO em camundongos, com posterior análise da cinética das células, na microcirculação cardíaca, após isquemia foi possível.
2. A isquemia miocárdica induziu redução da DCF, em camundongos sem aterosclerose.
3. Após isquemia miocárdica, a DCF foi ainda mais reduzida na presença de aterosclerose.
4. A injeção ICO de CMMO não alterou negativamente os parâmetros de perfusão ou de inflamação na microcirculação cardíaca.
5. As CMMO quando injetadas pela via ICO, não exibiram rolamento na superfície microvascular endotelial, ficando retidas nas redes de capilares miocárdicos e não em arteríolas pré-capilares ou em vênulas pós-capilares.
6. A indução de isquemia miocárdica não aumentou o número de CMMO retidas na microcirculação, na ausência de aterosclerose.
7. No miocárdio pós-isquemia, a presença de aterosclerose não aumentou o número de CMMO retidas na microcirculação, após injeção ICO.
8. O número de CMMO retidas não se correlacionou com parâmetros de perfusão microvascular ou de inflamação, avaliados previamente à injeção.
9. A expressão de CXCR4 nas CMMO injetadas se correlacionou fortemente com o número de células retidas nos capilares.
10. A aterosclerose não alterou o número de CMMO obtidas após gradiente de Ficoll.
11. A expressão de CD54 em CMMO diminuiu na presença de aterosclerose.
12. As CMMO na presença de aterosclerose aumentaram o potencial clonogênico *in vitro*.
13. A viabilidade funcional do enxerto cardíaco pode ser avaliada pela ecocardiografia, dentro do primeiro mês após o TCHC, em camundongos singeneicos.

5 DISCUSSÃO

A circulação coronariana, assim como todos os leitos vasculares, possui uma estrutura fractal. As duas maiores artérias coronárias, tronco comum esquerdo (que se divide em artéria descendente anterior e artéria circunflexa) e artéria coronária direita, são as primeiras ramificações da Aorta, que conduzem um grande volume de sangue para o coração e repousam sobre a superfície epicárdica. Seus ramos penetram o miocárdio, consistindo de vasos de resistência (pequenas artérias e arteríolas), com cerca de 75 a 200 μm de diâmetro e são os principais responsáveis pela regulação do fluxo sanguíneo local. A partir das arteríolas emerge uma série de redes densas de capilares, que se distribuem paralelamente aos cardiomiócitos e são responsáveis pelas trocas de nutrientes e de O_2 que ocorrem no coração. A microcirculação cardíaca é composta por vasos com diâmetro abaixo de 300 μm tais como as pequenas artérias, arteríolas, capilares e vênulas pós-capilares. O estudo *in vivo* da microcirculação cardíaca pode ser realizado tanto em humanos como em animais. No primeiro caso, técnicas não invasivas disponíveis, tais como a tomografia por emissão de pósitrons, a tomografia computadorizada, a ressonância magnética e a ultrasonografia, permitem avaliações indiretas da perfusão miocárdica, enquanto que métodos invasivos, tais como o Doppler intracoronariano permitem a avaliação de parâmetros de fluxo microvascular(41).

O impacto da infusão ICO de células progenitoras derivadas da medula óssea (CPDMO) na função microvascular miocárdica humana, após um IAM, foi avaliado no estudo REPAIR-AMI, através do uso de Doppler intracoronariano. O transplante ICO de CPDMO associou-se à normalização da reserva de fluxo coronariano e melhora na capacidade de condutância vascular máxima na artéria relacionada ao infarto, no acompanhamento de quatro meses (42). Além de parâmetros microcirculatórios, o grau de retenção de CMMO no miocárdio infartado, também pode ser avaliado por diferentes técnicas, tanto em animais quanto em humanos (43). Em estudos avaliando espécimes de tecido cardíaco, o uso de marcação celular direta permite a visualização das células injetadas pela via ICO, em nível individual no tecido miocárdico, porém sem a possibilidade de avaliação da dinâmica das células. Já os modelos *in vivo*, experimentais e clínicos, permitem a avaliação das células injetadas marcadas diretamente, de forma dinâmica, utilizando diversas

técnicas tais como ultrasonografia, RM e medicina nuclear. Por questões de segurança, a marcação celular indireta incluindo manipulação genética, é possível apenas em animais. Até o momento são escassas as informações referentes à quantificação das células injetadas pela via ICO que ficam retidas no miocárdio, principalmente em humanos, onde as técnicas de avaliação são mais limitadas. Em estudo realizado no Brasil, evidenciou-se que em pacientes com IAM, o grau de retenção de CMMO autólogas, nas primeiras 24 horas após injeção pela via ICO foi superior à técnica de injeção retrograda através do seio venoso coronariano (27). Ly e colaboradores utilizaram um modelo de IAM anterior em suínos, onde foi avaliada *in vivo*, a injeção ICO de diferentes populações de células progenitoras multipotentes marcadas, incluindo células mesenquimais, CMMO e células mononucleares do sangue periférico (44). Na primeira hora após a injeção, as células mesenquimais emitiram um sinal de maior intensidade em relação às outras populações(44). A cinética de células mesenquimais na microcirculação também já foi descrita. Toma e colaboradores utilizaram a técnica de MIF e observaram a microcirculação do músculo cremaster de ratos, para avaliar células mesenquimais marcadas injetadas pela artéria femoral, até 48 horas após a injeção. A injeção direta transepicárdica de cardiomiócitos fetais marcados com CM-DiL, na parede livre do ventrículo esquerdo e posterior avaliação por MIF, da retenção dessas células no músculo cardíaco, foi descrita por Ruhpawar e colaboradores em cães(45). Agnoletti e colaboradores descreveram uma técnica de infusão ICO de CMMO marcadas com PKH26, tanto em camundongos quanto em hamsters. Nesse estudo realizou-se a injeção de células pela artéria carótida (com concomitante clampeamento da aorta, para redirecionamento das células injetadas diretamente para o coração) e também pela veia jugular. Em alguns animais foi realizada isquemia miocárdica por ligadura temporária (30 minutos) da artéria coronária descendente anterior. A visualização das CMMO foi realizada imediatamente e um mês após a injeção, através de análise histológica.

Nosso modelo possibilitou a união, de uma só vez, de características metodológicas diferentes e relevantes dos estudos citados, possibilitando a visualização *in vivo* da cinética de CMMO marcadas, na microcirculação miocárdica, após a injeção ICO, mediante isquemia miocárdica, em camundongos. A utilização da técnica de TCHC singeneico como modelo básico para esse estudo incluiu uma

série de vantagens sobre os modelos até então descritos na literatura. Primeiramente, a análise por MIF da microcirculação do enxerto cardíaco não necessitou de toracotomia e nem de ventilação invasiva do animal, evitando a influência dos movimentos pulmonares que tornariam impossível a aquisição de imagens estáveis. A modificação da técnica de TCHC, com canulação prévia do tronco braquiocefálico, unida ao fechamento da válvula aórtica do enxerto pelo fluxo de sangue que chega ao enxerto cardíaco cervical retrogradamente, asseguraram uma injeção de CMMO diretamente nas artérias coronárias, sem perdas para a circulação sistêmica. A técnica de indução de IMG, por clampeamento da artéria carótida que irriga o enxerto cardíaco cervical, permitiu uma isquemia homogênea com reperfusão controlada, o que tem a vantagem de não depender da variação anatômica que ocorre quando se usa modelos tais como o de ligadura das artérias coronárias. A utilização do transplante singeneico (transplante realizado entre animais da mesma espécie) permitiu o estudo exclusivamente da fisiopatologia da lesão por isquemia e reperfusão miocárdica, sem influência de reações mediadas pelo sistema imune adaptativo. Isso é comprovado pelo fato de que corações murinos transplantados de forma singeneica não são rejeitados após o transplante, mantendo-se viáveis por pelo menos 120 dias(46).

Mesmo com atual conhecimento do substancial benefício clínico obtido com a restituição precoce do fluxo sanguíneo em artérias coronarianas relacionadas a eventos agudos, a fisiopatologia da injúria microvascular ocasionada pela isquemia e reperfusão (IR) miocárdica, representa talvez a atual fronteira do conhecimento nessa área. A IR miocárdica está associada clinicamente à necrose de cardiomiócitos, arritmias, diminuição do débito cardíaco e ao fenômeno de atordoamento miocárdico(47). Os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na IR incluem o comprometimento metabólico tecidual, geração de espécies reativas de O₂, sobrecarga de cálcio intracelular, rápida alteração do pH local e inflamação (com ativação do sistema complemento, aumento da expressão de moléculas de adesão endoteliais, secreção de citocinas inflamatórias e recrutamento local de leucócitos). Ocorrem ainda, injúria endotelial e miocitária, hipercontratura de cardiomiócitos, embolia aterotrombótica e/ou plaquetária, edema e espasmo microvascular. dano mitocondrial e finalmente necrose miocárdica e endotelial(48).

Vários estudos em animais já utilizaram a MIF para a visualização direta dos fenômenos microvasculares ocasionados por I/R em diferentes órgãos(49;50). Até recentemente a avaliação desse fenômeno na microcirculação cardíaca só era possível indiretamente, com estudos do coração isolado pelo método de Langendorff(51) ou extrapolando-se dados obtidos em estudos da microcirculação da musculatura esquelética(52). Schramm e colaboradores demonstraram a exequibilidade da avaliação *in vivo* por MIF da microcirculação cardíaca subepicárdica, em modelo murino do TCHC, após IR de forma acurada e reproduzível. Tempos prolongados de I/R relacionados ao TCHC (240 minutos) ocasionaram deterioração da perfusão miocárdica e aumento no recrutamento de leucócitos e na resposta inflamatória relacionada à injúria de reperfusão pós transplante(47). Em nosso estudo o tempo de isquemia relacionado ao TCHC foi inferior (em torno de 90 minutos) e não variou significativamente entre os grupos estudados. Sendo assim, é bem provável que as alterações de diminuição da DFC observadas no grupo 2 quando comparado ao grupo 1, sejam atribuídas preferencialmente à IMG (isquemia “quente”) e não à isquemia “fria”relacionada ao transplante cardíaco.

No presente estudo foi observada ainda uma DCF significativamente menor no grupo de camundongos com aterosclerose quando comparados aos animais sem aterosclerose, que também foram submetidos à IMG por uma hora. Devido à falta de um grupo controle com aterosclerose, não submetido à IMG não se pode afirmar que tal redução tenha sido exclusivamente relacionada à IMG, uma vez que os valores da DCF no grupo de camundongos ApoE^{-/-} poderia já estar diminuído previamente à indução de isquemia “quente”do enxerto cardíaco. Tal fato não diminui a importância da observação, uma vez que se constatando uma diferença na resposta à isquemia do coração na presença de aterosclerose, pode-se ter uma informação importante do ponto de vista translacional. A grande maioria dos estudos na literatura que avaliam a fisiopatologia da doença isquêmica miocárdica e da própria terapia celular nesse contexto utilizou animais sem aterosclerose. Pode ser que o uso de modelos experimentais com animais ateroscleróticos reflita mais fielmente o que acontece em humanos. De fato em camundongos ApoE^{-/-} as placas ateroscleróticas possuem similaridades com aquelas que se desenvolvem em humanos, apresentando em estágios iniciais grande conteúdo de células inflamatórias, mais especificamente

macrófagos com conteúdos ricos em lipídeos, formando células espumosas. Com a progressão da doença as lesões se tornam mais complexas, apresentando núcleo necrótico e capa fibrosa. Na análise histológica das artérias coronarianas de camundongos ApoE^{-/-} as lesões ateroscleróticas se concentram na região proximal das artérias, incluindo suas origens, poupando os primeiros segmentos e primeiros ramos vasculares, que são os sítios preferenciais de lesões em humanos. Lesões independentes também podem estar presentes nas artérias intramiocárdicas desses animais, chegando até a ocasionar oclusão total do vaso, sem evidências de IAM(53). Camundongos ApoE^{-/-} também podem desenvolver placas ateroscleróticas instáveis, principalmente no tronco braquiocefálico, inclusive com risco de ruptura(54). Foteinos e colaboradores demonstraram que células derivadas de MO participam do processo de reparo endotelial em áreas de disfunção endotelial mais propensas à formação de lesões ateroscleróticas nas aortas de camundongos ApoE^{-/-}(55). A infusão intravenosa de células progenitoras de MO foi testada em modelo de isquemia de membros inferiores em camundongos ApoE^{-/-} com e sem diabetes. Nos dois grupos houve evidência de melhora da perfusão microvascular e da densidade capilar com a terapia celular(56).

O processo de retenção de leucócitos em sítios inflamatórios, estudado amplamente por técnicas de MIF(38), já está bem descrito na literatura e se dá preferencialmente nas vênulas pós-capilares (36;37), enquanto que os mecanismos de recrutamento e retenção de células tronco e células progenitoras, tanto na MO, quanto em tecidos e órgãos submetidos à terapia celular, ainda são pouco conhecidos.

O modelo seqüencial de adesão de leucócitos envolve três etapas: 1-rolamento, mediado por selectinas; 2-ativação, desencadeado por quimiocinas; 3-firme adesão e retenção, mediados por integrinas. A transmigração endotelial compõe a quarta etapa dessa cascata inflamatória. Durante a fase inicial de rolamento, é comum a fraca e temporária adesão dos leucócitos às células endoteliais, devido à interação entre selectinas nas superfícies das células endoteliais e ligantes na superfície celular dos leucócitos. Nesse momento, mediante a exposição a diferentes quimiocinas(p. ex. TNF- α) aumentadas no microambiente local inflamado, os leucócitos se tornam ativados. Além disso as próprias células endoteliais passam a expressar importantes moléculas de adesão (p.ex. ICAM e

VCAM). Em paralelo, várias quimiocinas (p. ex. interleucina-8, MCP-1e SDF-1) produzidas ou apresentadas pelas células endoteliais, atraem os leucócitos em direção aos sítios inflamatórios. A ligação dessas quimiocinas aos receptores de superfície dos leucócitos resulta em rápida ativação de integrinas β -1 e β -2. A terceira etapa desse processo, a firme adesão, é promovida pela afinidade aumentada entre as integrinas da superfície leucocitária tais como α 4 β 1 (VLA-4), α L β 2 (LFA-2, CD11a/CD18) e α M β 2 (Mac-1, CD11b/CD18) e as moléculas de adesão da superfícies das células endoteliais (p. ex. VCAM e ICAM). Ao final do processo, após a firme adesão, inicia-se a diapedese ou transmigração endotelial dos leucócitos(36;37).

A cinética dos leucócitos após IR em diversos órgãos já foi descrita, inclusive no coração. Schramm e colaboradores demonstraram que após IR o número de leucócitos acumulados nas vênulas pós-capilares, após rolamento e firme adesão, era diretamente dependente do tempo de duração da isquemia miocárdica(47). A deposição de leucócitos na microcirculação coronariana é um dos primeiros eventos na injúria inflamatória após isquemia miocárdica e não se dá apenas nas vênulas pós-capilares, mas sim nas redes capilares. Tal acúmulo parece depender de vários fatores. Quando em contato com o ambiente inflamatório pós isquêmico, leucócitos sofrem diminuição da capacidade de deformidade, produzem substâncias vasoconstrictoras que atuam na microcirculação local e aumentam a agregação plaquetária(57). Ritter e colaboradores avaliaram a cinéticas na microcirculação coronariana de leucócitos nos primeiros minutos após a indução de isquemia e reperfusão de corações isolados de ratos. Nos primeiros cinco minutos, mesmo sem isquemia prévia, o “plugging”de leucócitos nos capilares foi observado, havendo adesão de leucócitos nas vênulas pós-capilares com e sem isquemia cardíaca prévia.

Após 35 minutos de perfusão as células permaneceram retidas nos capilares mais freqüentemente do que nas vênulas pós-capilares, onde houve um maior “washout” celular(58). Em nosso estudo as CMMO ficaram retidas no miocárdio pós isquêmico mediante o acúmulo na rede de capilares sem nenhuma interação do tipo rolamento seguido de firme adesão nas vênulas pós capilares. Apenas em um animal foi observado tal fenômeno. Mesmo nesse caso a grande maioria das CMMO exibiu retenção nos capilares e não nas vênulas pós capilares. Estudos prévios

avaliando a cinética na microcirculação de populações celulares derivadas de MO específicas, mediante MIF foram realizados. Rüster e colaboradores demonstraram em murinos, através de estudo *in vivo* da microcirculação da orelha com MIF, que CTM da MO são capazes de rolar no endotélio de vênulas pós capilares, dependendo da expressão de P-selectina e ainda aderir firmemente através da interação entre as moléculas VLA-4 e VCAM-1(59). A infusão sistêmica de CTM, em ratos submetidos a IAM, se acompanha de retenção dessas nas bordas do miocárdio infartado e ainda, nos pulmões, fígado e baço, provavelmente devido ao maior diâmetro dessas células(60). Quando avaliadas por MIF na microcirculação do músculo cremaster, CTM injetadas pela artéria femoral ocasionaram redução significativa do fluxo sanguíneo após retenção nos capilares(61). Há evidências de que a infusão intracoronariana de CTM, em modelo suíno de IAM, possa causar obstrução aguda microvascular e conseqüente interrupção do fluxo sanguíneo miocárdico (62).Vulliet e colaboradores observaram que a injeção IC de CTM em corações saudáveis de cães pode causar micro-obstrução aguda e até IAM(63). Porém em estudo comparando diferentes velocidades de infusão das CTM pela via IC após IAM em porcos, observou-se diminuição da mortalidade e melhora significativa da perfusão miocárdica, com velocidades de infusão maiores(64). De fato, em humanos após um IAM, a infusão IC de CTM derivadas de MO parece ser segura e provavelmente eficaz em termos de melhora da função miocárdica(65). Em nosso estudo não observamos diferenças nos parâmetros microcirculatórios (perfusão microvascular e inflamação) antes e após a infusão IC das CMMO, o que pelo menos demonstra a segurança da injeção na fase imediata após a reperfusão miocárdica. Quando comparadas às CMMO, as CTM permanecem retidas na microcirculação miocárdica pós-IAM, em numero significativamente maior, dentro da primeira hora após a injeção IC, que foi realizada 3 a 4 dias após o IAM e ainda, a observação de “plugging” microvascular se deu apenas em relação às CTM (44). Em nosso estudo, tal mecanismo de retenção de CMMO injetadas pela via IC, foi observado como o principal em todos os animais, inclusive naqueles com deficiência de PECAM-1, uma molécula importante no processo de adesão leucócitos durante processos inflamatórios(46).

Há evidências de que o microambiente do miocárdio isquêmico não seja apenas propício mas essencial para a retenção de células progenitoras. Em tese,

vários fatores podem influenciar uma maior ou menor retenção de CMMO injetadas pela via IC. Em nosso estudo a indução de isquemia do enxerto durante uma hora, com posterior injeção IC das CMMO, não aumentou o número de células retidas no miocárdio em relação à injeção sem indução de isquemia, mesmo com DCF diminuída (único parâmetro microvascular alterado pela indução de IMG). A micro-obstrução da microcirculação, muitas vezes relacionada à micro-trombose, consiste em um dos mecanismos responsáveis pela diminuição da DCF. De fato, nosso achado parece estar de acordo com estudo clínico que avaliou a injeção IC de CMMO em pacientes após um IAM, onde a presença de micro-obstrução nos capilares do miocárdio, avaliada por RM coronariana não se correlacionou com uma maior retenção de CMMO(27). A influência da isquemia propriamente dita, na retenção de células injetadas pela via ICO, também já foi avaliada em outros estudos. A indução de isquemia, através da técnica de insuflação de um balão, durante a infusão IC de CMMO no miocárdio pós- infartado foi avaliada em suínos. Tossios e colaboradores estudaram a infusão IC de CMMO com e sem a oclusão coronariana com a insuflação de um balão, em porcos, cinco dias após a indução de IAM por oclusão coronariana (por 4 horas). Não houve diferença no número de CMMO retidas na comparação das duas estratégias de infusão(66). Mais recentemente, Meluzin e colaboradores, também em porcos, avaliaram a retenção de CMMO mediante repetidas insuflações de um balão com interrupção do fluxo sanguíneo, durante o transplante IC, três dias após o IAM. Tal técnica demonstrou aumentar o número de células retidas quando comparada à infusão ICO contínua, sem oclusão coronariana concomitante(67). No nosso estudo a infusão das CMMO se deu de forma contínua, sem interrupção do fluxo sanguíneo durante a infusão e apenas 3 horas após a indução de injúria miocárdica global pelo período de uma hora com posterior reperfusão. É possível que após três horas o ambiente microvascular não tenha se alterado tanto ao ponto de se tornar mais propício ao aumento da retenção das CMMO. Tal suposição é corroborada por estudo recente que avaliou a expressão gênica no miocárdio infartado tanto de camundongos infartados quanto de animais submetidos à isquemia por 30 minutos seguida de reperfusão. Nas primeiras 6 horas após o insulto isquêmico a expressão de genes relacionados ao processo inflamatório estava aumentada enquanto que estava inalterada ou até diminuída a expressão de genes associados ao processo de

quimiotaxia (p. ex. SDF-1) de células tronco e progenitoras, juntamente com genes associados a angiogênese(68).

A relação entre a aterosclerose e a microcirculação é tema de intenso estudo. O paradigma de que a microcirculação coronariana não é afetada pela aterosclerose vem mudando. Recentes evidências demonstram disfunção endotelial e reduzida capacidade de vasodilatação da microcirculação coronariana em pacientes com fatores de risco cardiovascular e sem obstrução das artérias coronárias epicárdicas, sugerindo que o envolvimento da vasculatura coronariana na aterosclerose seja difuso, incluindo a microcirculação, provavelmente a partir de estágios precoces do continuum cardiovascular aterosclerótico(69). Em nosso estudo a avaliação de retenção das CMMO foi também testada no miocárdio submetido à isquemia “quente” em animais ateroscleróticos, mimetizando mais fielmente o contexto dos estudos clínicos da atualidade. Os fenômenos que envolvem a retenção de CMMO na microcirculação são complexos e dependem de características não só do ambiente microvascular coronariano mas provavelmente também das características inerentes às células injetadas e ainda à própria medula óssea, de onde as células são obtidas. Hokama e colaboradores demonstraram que o acúmulo de leucócitos nos capilares e nas vênulas pós-capilares em corações submetidos a I/R é mais intenso na presença de diabetes, provavelmente devido a uma maior expressão de CD11b nos leucócitos, menor taxa de cisalhamento nas vênulas pós-capilares e diminuição da produção de óxido nítrico pelas células endoteliais(70). Zhu e colaboradores demonstraram que em porcos, a exposição à HAS e hipercolesterolemia induziu, na fase inicial da aterosclerose, a proliferação de microvasos no coração e que em tais animais, quando submetidos à isquemia miocárdica aguda, a diminuição na perfusão miocárdica e o aumento na permeabilidade microvascular, eram atenuados, quando com parados a animais saudáveis(71).

Em nosso estudo avaliamos também a correlação entre parâmetros de microcirculação pré infusão IC das CMMO e o número de células retidas, não sendo evidenciada nenhuma correlação. Mesmo no grupo com aterosclerose, no qual a DCF prévia à infusão das CMMO era menor, quando comparada ao estudo em animais sem aterosclerose também submetidos à isquemia. É possível que o tempo decorrido entre o término da indução de isquemia e a injeção das CMMO não tenha

sido suficiente para alterar os parâmetros microcirculatórios, alterando o número de células retidas.

É possível ainda que no continuum cardiovascular aterosclerótico, a resposta local coronariana microvascular a isquemia curse com variações, onde em fases iniciais, a capacidade de retenção de CMMO injetadas pela via ICO seja diferente daquela em fases mais tardias. Em nosso estudo utilizamos animais com até um ano de vida, não tendo sido feita avaliação em animais mais idosos.

A quimiocina SDF-1 e seu receptor específico CXCR4 possuem importante papel no desenvolvimento cardiovascular normal assim como nos processos de neovascularização pós-natal(72). O SDF-1 é produzido em resposta a hipóxia e atua como um dos mais importante fatores de recrutamento de células que expressam o CXCR4 em locais de isquemia, incluindo o coração(73). Células progenitoras hematopoiéticas, células progenitoras endoteliais, células estromais, células endoteliais e linfócitos expressam o CXCR4, o qual possui importante papel nos processos de migração celular, retenção na MO e recrutamento de células pro angiogênicas(72). Recentemente foi demonstrado que aumento da expressão de CXCR4 induzida por hipóxia potencializa os efeitos benéficos da terapia celular(73). Ainda, células da MO que expressão o receptor CXCR4 possuem maior capacidade de migração, tanto basal quanto em resposta ao SDF-1, maior efetividade em neovascularização em modelo *in vivo* de isquemia de membros inferiores e maior produção citocinas pró angiogênicas(72). Em nosso estudo observamos uma forte correlação linear positiva entre a expressão de CXCR4 pelas CMMO e o número de células retidas nos capilares da microcirculação cardíaca após infusão IC, sendo bem provável que tal receptor participe desse processo de retenção celular, não sendo este apenas dependente de fatores reológicos ou de características físicas das células.

Devido à importância da MO no processo de reparo endógeno ao longo do continuum cardiovascular foram realizadas diferentes avaliações comparando as CMMO de animais com e sem aterosclerose. Na avaliação da recuperação de CMMO após o gradiente de Ficoll, não observamos diferença no número de células recuperadas o que pode indicar que a aterosclerose não afeta quantitativamente o conjunto total de células.

Avaliamos também a expressão de marcadores de superfície freqüentemente encontrados em células tronco e células progenitoras e também não foi encontrada nenhuma diferença entre os grupos. A idade avançada principalmente no curso do continuum aterosclerótico pode influenciar negativamente o potencial de reparo endógeno através da redução quantitativa de determinadas populações de células progenitoras(74).

É provável que as composições das MO de animais com aterosclerose não muito idosos, como os avaliados por nós, sejam semelhantes do ponto de vista fenotípico, sofrendo alteração de determinadas populações celulares apenas em fases mais tardias da vida. Apenas o número de unidades formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos foi superior na presença de aterosclerose, refletindo talvez o contínuo estímulo isquêmico e/ou inflamatório sobre a MO dos animais ApoE^{-/-}, onde a proliferação celular esteja aumentada em compensação a uma piora funcional das células do ponto de vista de reparo cardiovascular. De fato células originadas da MO de pacientes coronariopatas possuem um menor potencial regenerativo, quando comparadas a células da MO de controles saudáveis(75).

Por fim observamos a exeqüibilidade da avaliação por ecocardiografia do enxerto cardíaco após o TCHC. Embora a avaliação funcional propriamente dita do enxerto cardíaco cervical seja questionável, dado que a dinâmica de fluxo sanguíneo intracavitário não corresponde àquela fisiológica. Atualmente a técnica de avaliação de rejeição pós transplante em camundongos é subjetiva, mediante palpação direta do órgão transplantado(76). Em modelos de transplante do enxerto para a cavidade abdominal, estudos já demonstram a possibilidade de monitoramento com ecocardiografia. Sendo assim, é bem provável que se possa monitorar a viabilidade do enxerto em estudos de rejeição cardíaca pós transplante cervical, como o realizado em nosso estudo.

6 CONCLUSÃO

A injeção ICO direta e a visualização detalhada da cinética das CMMO na microcirculação coronária *in vivo* por MIF foi possível. A IRCG provocou redução da densidade capilar funcional, que se encontrou mais diminuída na vigência de aterosclerose. A retenção das CMMO após injeção ICO se deu nos capilares e provavelmente foi dependente da expressão de CXCR4. Após injeção ICO, as CMMO não demonstraram interação com as vênulas pós-capilares, como normalmente acontece com leucócitos. A aterosclerose afetou o fenótipo e função das CMMO. A análise da função miocárdica do enxerto cardíaco durante o TCHC pode ser realizada através de ecocardiografia.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Em tese, uma maior compreensão dos aspectos fundamentais da terapia celular em cardiopatias é possível, uma vez que podem ser realizados, tanto o estudo da injeção ICO de populações celulares específicas, permitindo a comparação direta da cinética das mesmas na microcirculação cardíaca, quanto o uso de enxertos obtidos a partir de animais com IAM prévio, por ligadura permanente da artéria coronária podem ser realizados ou ainda de animais com outros tipos de cardiopatias (p.ex. cardiopatia chagásica). Ainda, uma variação na duração do tempo de isquemia do enxerto, ou ainda do tempo entre a injeção ICO das células e o término da isquemia também são possíveis. Sendo assim, o uso da técnica de TCHC associada à injeção ICO de células e concomitante MIF pode vir a ser utilizada em diferentes contextos, não sendo restrito apenas ao modelo apresentado nesta tese.

REFERÊNCIAS

- 1 Zenovich AG, Taylor DA. Atherosclerosis as a disease of failed endogenous repair. *Front Biosci* 2008; 13:3621-3636.
- 2 Libby P, Okamoto Y, Rocha VZ, Folco E. Inflammation in Atherosclerosis. *Circ J* 2010.
- 3 Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54(23):2129-2138.
- 4 Schocken DD, Benjamin EJ, Fonarow GC, Krumholz HM, Levy D, Mensah GA et al. Prevention of heart failure: a scientific statement from the American Heart Association Councils on Epidemiology and Prevention, Clinical Cardiology, Cardiovascular Nursing, and High Blood Pressure Research; Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group; and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Group. *Circulation* 2008; 117(19):2544-2565.
- 5 Albanesi Filho FM. [What is the current scenario for heart failure in Brazil?]. *Arq Bras Cardiol* 2005; 85(3):155-156.
- 6 Gersh BJ, Simari RD, Behfar A, Terzic CM, Terzic A. Cardiac cell repair therapy: a clinical perspective. *Mayo Clin Proc* 2009; 84(10):876-892.
- 7 Taylor DA, Zenovich AG. Cardiovascular cell therapy and endogenous repair. *Diabetes Obes Metab* 2008; 10 Suppl 4:5-15.
- 8 Leone AM, Valgimigli M, Giannico MB, Zacccone V, Perfetti M, D'Amario D et al. From bone marrow to the arterial wall: the ongoing tale of endothelial progenitor cells. *Eur Heart J* 2009; 30(8):890-899.
- 9 Hristov M, Weber C. Ambivalence of progenitor cells in vascular repair and plaque stability. *Curr Opin Lipidol* 2008; 19(5):491-497.
- 10 Kawamoto A, Losordo DW. Endothelial progenitor cells for cardiovascular regeneration. *Trends Cardiovasc Med* 2008; 18(1):33-37.
- 11 Johnson KW, Dooner M, Quesenberry PJ. Fluorescence activated cell sorting: a window on the stem cell. *Curr Pharm Biotechnol* 2007; 8(3):133-139.
- 12 Gajkowska A, Oldak T, Jastrzevska M, Machaj EK, Walewski J, Kraszewska E et al. Flow cytometric enumeration of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells in leukapheresis product and bone marrow for clinical transplantation: a comparison of three methods. *Folia Histochem Cytobiol* 2006; 44(1):53-60.

- 13 Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. J Hematother* 1996; 5(3):213-226.
- 14 Hristov M, Zerneck A, Schober A, Weber C. Adult progenitor cells in vascular remodeling during atherosclerosis. *Biol Chem* 2008; 389(7):837-844.
- 15 Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der ZR, Li T et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275(5302):964-967.
- 16 Mobius-Winkler S, Hollriegel R, Schuler G, Adams V. Endothelial progenitor cells: implications for cardiovascular disease. *Cytometry A* 2009; 75(1):25-37.
- 17 Sieveking DP, Ng MK. Cell therapies for therapeutic angiogenesis: back to the bench. *Vasc Med* 2009; 14(2):153-166.
- 18 Hristov M, Weber C. Progenitor cell trafficking in the vascular wall. *J Thromb Haemost* 2009; 7 Suppl 1:31-34.
- 19 Gonzales C, Pedrazzini T. Progenitor cell therapy for heart disease. *Exp Cell Res* 2009; 315(18):3077-3085.
- 20 Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410(6829):701-705.
- 21 Burchfield JS, Dimmeler S. Role of paracrine factors in stem and progenitor cell mediated cardiac repair and tissue fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2008; 1(1):4.
- 22 Dohmann HF, Silva SA, Sousa AL, Braga AM, Branco RV, Haddad AF et al. Multicenter double blind trial of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation through intracoronary injection post acute myocardium infarction - MiHeart/AMI study. *Trials* 2008; 9:41.
- 23 Chavakis E, Koyanagi M, Dimmeler S. Enhancing the outcome of cell therapy for cardiac repair: progress from bench to bedside and back. *Circulation* 2010; 121(2):325-335.
- 24 Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Gattermann N, Hernandez A, Sorg RV et al. [Intracoronary, human autologous stem cell transplantation for myocardial regeneration following myocardial infarction]. *Dtsch Med Wochenschr* 2001; 126(34-35):932-938.
- 25 Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernandez A, Sorg RV et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear

- bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002; 106(15):1913-1918.
- 26 Abdel-Latif A, Bolli R, Tleyjeh IM, Montori VM, Perin EC, Hornung CA et al. Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med* 2007; 167(10):989-997.
- 27 Silva SA, Sousa AL, Haddad AF, Azevedo JC, Soares VE, Peixoto CM et al. Autologous bone-marrow mononuclear cell transplantation after acute myocardial infarction: comparison of two delivery techniques. *Cell Transplant* 2009; 18(3):343-352.
- 28 Kang S, Yang YJ, Li CJ, Gao RL. Effects of intracoronary autologous bone marrow cells on left ventricular function in acute myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis for randomized controlled trials. *Coron Artery Dis* 2008; 19(5):327-335.
- 29 Dill T, Schachinger V, Rolf A, Mollmann S, Thiele H, Tillmanns H et al. Intracoronary administration of bone marrow-derived progenitor cells improves left ventricular function in patients at risk for adverse remodeling after acute ST-segment elevation myocardial infarction: results of the Reinfusion of Enriched Progenitor cells And Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction study (REPAIR-AMI) cardiac magnetic resonance imaging substudy. *Am Heart J* 2009; 157(3):541-547.
- 30 Assmus B, Rolf A, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R et al. Clinical outcome 2 years after intracoronary administration of bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *Circ Heart Fail* 2010; 3(1):89-96.
- 31 Chen SL, Fang WW, Qian J, Ye F, Liu YH, Shan SJ et al. Improvement of cardiac function after transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in patients with acute myocardial infarction. *Chin Med J (Engl)* 2004; 117(10):1443-1448.
- 32 Tendera M, Wojakowski W, Ruzyllo W, Chojnowska L, Kepka C, Tracz W et al. Intracoronary infusion of bone marrow-derived selected CD34+CXCR4+ cells and non-selected mononuclear cells in patients with acute STEMI and reduced left ventricular ejection fraction: results of randomized, multicentre Myocardial Regeneration by Intracoronary Infusion of Selected Population of Stem Cells in Acute Myocardial Infarction (REGENT) Trial. *Eur Heart J* 2009; 30(11):1313-1321.
- 33 Ripa RS, Kastrup J. Stem cells: REGENT trial-the end of cell therapy for MI? *Nat Rev Cardiol* 2009; 6(9):567-568.
- 34 Ruhparwar A, Ghodsizad A, Lichtenberg A, Karck M. Visualization of transplanted cells within the myocardium. *Int J Cardiol* 2008; 124(1):22-26.

- 35 Beeres SL, Bengel FM, Bartunek J, Atsma DE, Hill JM, Vanderheyden M et al. Role of imaging in cardiac stem cell therapy. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49(11):1137-1148.
- 36 Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 2007; 7(9):678-689.
- 37 Wittchen ES. Endothelial signaling in paracellular and transcellular leukocyte transmigration. *Front Biosci* 2009; 14:2522-2545.
- 38 Mempel TR, Scimone ML, Mora JR, von Andrian UH. In vivo imaging of leukocyte trafficking in blood vessels and tissues. *Curr Opin Immunol* 2004; 16(4):406-417.
- 39 Huwer H, Nikoloudakis N, Rissland J, Vollmar B, Menger MD, Schafers HJ. In vivo analysis of microvascular injury after myocardial cryothermia. *J Surg Res* 1998; 79(1):1-7.
- 40 Jawien J, Nastalek P, Korbut R. Mouse models of experimental atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol* 2004; 55(3):503-517.
- 41 Pries AR, Habazettl H, Ambrosio G, Hansen PR, Kaski JC, Schachinger V et al. A review of methods for assessment of coronary microvascular disease in both clinical and experimental settings. *Cardiovasc Res* 2008; 80(2):165-174.
- 42 Erbs S, Linke A, Schachinger V, Assmus B, Thiele H, Diederich KW et al. Restoration of microvascular function in the infarct-related artery by intracoronary transplantation of bone marrow progenitor cells in patients with acute myocardial infarction: the Doppler Substudy of the Reinfusion of Enriched Progenitor Cells and Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction (REPAIR-AMI) trial. *Circulation* 2007; 116(4):366-374.
- 43 Wei H, Ooi TH, Tan G, Lim SY, Qian L, Wong P et al. Cell delivery and tracking in post-myocardial infarction cardiac stem cell therapy: an introduction for clinical researchers. *Heart Fail Rev* 2010; 15(1):1-14.
- 44 Ly HQ, Hoshino K, Pomerantseva I, Kawase Y, Yoneyama R, Takewa Y et al. In vivo myocardial distribution of multipotent progenitor cells following intracoronary delivery in a swine model of myocardial infarction. *Eur Heart J* 2009; 30(23):2861-2868.
- 45 Ruhparwar A, Kofidis T, Ruebesamen N, Karck M, Haverich A, Martin U. Intra-vital fluorescence microscopy for intra-myocardial graft detection following cell transplantation. *Int J Cardiovasc Imaging* 2005; 21(5):569-574.
- 46 Schramm R, Menger MD, Schmits R, Harder Y, Kirsch S, Meier C et al. Role of PECAM-1 in acute rejection of fully major histocompatibility complex class II-mismatched cardiac allografts in mice. *Transplantation* 2007; 84(4):555-558.

- 47 Schramm R, Menger MD, Kirsch S, Langer F, Harder Y, Hamacher J et al. The subepicardial microcirculation in heterotopically transplanted mouse hearts: an intravital multicolor fluorescence microscopy study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007; 134(1):210-7, 217.
- 48 Prasad A, Stone GW, Holmes DR, Gersh B. Reperfusion injury, microvascular dysfunction, and cardioprotection: the "dark side" of reperfusion. *Circulation* 2009; 120(21):2105-2112.
- 49 Menger MD, Laschke MW, Vollmar B. Viewing the microcirculation through the window: some twenty years experience with the hamster dorsal skinfold chamber. *Eur Surg Res* 2002; 34(1-2):83-91.
- 50 Bouskela E, Cyrino FZ, Lerond L. Effects of oral administration of different doses of purified micronized flavonoid fraction on microvascular reactivity after ischaemia/reperfusion in the hamster cheek pouch. *Br J Pharmacol* 1997; 122(8):1611-1616.
- 51 Kambe M, Bessho R, Fujii M, Ochi M, Shimizu K. Sivelestat reduces myocardial ischemia and reperfusion injury in rat hearts even when administered after onset of myocardial ischemia. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2009; 8(6):629-634.
- 52 Menger MD, Rucker M, Vollmar B. Capillary dysfunction in striated muscle ischemia/reperfusion: on the mechanisms of capillary "no-reflow". *Shock* 1997; 8(1):2-7.
- 53 Kolovou G, Anagnostopoulou K, Mikhailidis DP, Cokkinos DV. Apolipoprotein E knockout models. *Curr Pharm Des* 2008; 14(4):338-351.
- 54 Williams H, Johnson JL, Carson KG, Jackson CL. Characteristics of intact and ruptured atherosclerotic plaques in brachiocephalic arteries of apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22(5):788-792.
- 55 Foteinos G, Hu Y, Xiao Q, Metzler B, Xu Q. Rapid endothelial turnover in atherosclerosis-prone areas coincides with stem cell repair in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2008; 117(14):1856-1863.
- 56 Balestrieri ML, Lu SJ, de Nigris F, Giovane A, Williams-Ignarro S, D'Armiento FP et al. Therapeutic angiogenesis in diabetic apolipoprotein E-deficient mice using bone marrow cells, functional hemangioblasts and metabolic intervention. *Atherosclerosis* 2009.
- 57 Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2002; 53(1):31-47.
- 58 Ritter LS, Wilson DS, Williams SK, Copeland JG, McDonagh PF. Early in reperfusion following myocardial ischemia, leukocyte activation is necessary for venular adhesion but not capillary retention. *Microcirculation* 1995; 2(4):315-327.

- 59 Ruster B, Gottig S, Ludwig RJ, Bistran R, Muller S, Seifried E et al. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood* 2006; 108(12):3938-3944.
- 60 Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, Feinberg MS, Etzion S, Tessone A et al. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation* 2003; 108(7):863-868.
- 61 Furlani D, Ugurlucan M, Ong L, Bieback K, Pittermann E, Westien I et al. Is the intravascular administration of mesenchymal stem cells safe? Mesenchymal stem cells and intravital microscopy. *Microvasc Res* 2009; 77(3):370-376.
- 62 Freyman T, Polin G, Osman H, Crary J, Lu M, Cheng L et al. A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction. *Eur Heart J* 2006; 27(9):1114-1122.
- 63 Vulliet PR, Greeley M, Halloran SM, MacDonald KA, Kittleson MD. Intracoronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs. *Lancet* 2004; 363(9411):783-784.
- 64 Llano R, Epstein S, Zhou R, Zhang H, Hamamdzic D, Keane MG et al. Intracoronary delivery of mesenchymal stem cells at high flow rates after myocardial infarction improves distal coronary blood flow and decreases mortality in pigs. *Catheter Cardiovasc Interv* 2009; 73(2):251-257.
- 65 Chen SL, Fang WW, Ye F, Liu YH, Qian J, Shan SJ et al. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2004; 94(1):92-95.
- 66 Tossios P, Krausgrill B, Schmidt M, Fischer T, Halbach M, Fries JW et al. Role of balloon occlusion for mononuclear bone marrow cell deposition after intracoronary injection in pigs with reperfused myocardial infarction. *Eur Heart J* 2008; 29(15):1911-1921.
- 67 Meluzin J, Vlasin M, Groch L, Mayer J, Kren L, Rauser P et al. Intracoronary delivery of bone marrow cells to the acutely infarcted myocardium. Optimization of the delivery technique. *Cardiology* 2009; 112(2):98-106.
- 68 Vandervelde S, van Luyn MJ, Rozenbaum MH, Petersen AH, Tio RA, Harmsen MC. Stem cell-related cardiac gene expression early after murine myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2007; 73(4):783-793.
- 69 Panza JA. Coronary atherosclerosis: extending to the microcirculation? *Eur Heart J* 2010.

- 70 Hokama JY, Ritter LS, Davis-Gorman G, Cimetta AD, Copeland JG, McDonagh PF. Diabetes enhances leukocyte accumulation in the coronary microcirculation early in reperfusion following ischemia. *J Diabetes Complications* 2000; 14(2):96-107.
- 71 Zhu XY, Daghini E, Chade AR, Versari D, Krier JD, Textor KB et al. Myocardial microvascular function during acute coronary artery stenosis: effect of hypertension and hypercholesterolaemia. *Cardiovasc Res* 2009; 83(2):371-380.
- 72 Seeger FH, Rasper T, Koyanagi M, Fox H, Zeiher AM, Dimmeler S. CXCR4 expression determines functional activity of bone marrow-derived mononuclear cells for therapeutic neovascularization in acute ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29(11):1802-1809.
- 73 Penn MS. Importance of the SDF-1: CXCR4 axis in myocardial repair. *Circ Res* 2009; 104(10):1133-1135.
- 74 Zhu S, Liu X, Li Y, Goldschmidt-Clermont PJ, Dong C. Aging in the atherosclerosis milieu may accelerate the consumption of bone marrow endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27(1):113-119.
- 75 Walter DH, Haendeler J, Reinhold J, Rochwalsky U, Seeger F, Honold J et al. Impaired CXCR4 signaling contributes to the reduced neovascularization capacity of endothelial progenitor cells from patients with coronary artery disease. *Circ Res* 2005; 97(11):1142-1151.
- 76 Scherrer-Crosbie M, Glysing-Jensen T, Fry SJ, Vancon AC, Gadiraju S, Picard MH et al. Echocardiography improves detection of rejection after heterotopic mouse cardiac transplantation. *J Am Soc Echocardiogr* 2002; 15(10 Pt 2):1315-1320.