UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

KARINA DUTRA ASENSI

ALTA RESISTÊNCIA AO ESTRESSE OXIDATIVO: POSSÍVEL VANTAGEM TERAPÊUTICA DAS CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS DERIVADAS DO SANGUE MENSTRUAL NO INFARTO DO MIOCÁRDIO

RIO DE JANEIRO 2016 Karina Dutra Asensi

ALTA RESISTÊNCIA AO ESTRESSE OXIDATIVO: POSSÍVEL VANTAGEM TERAPÊUTICA DAS CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS DERIVADAS DO SANGUE MENSTRUAL NO INFARTO DO MIOCÁRDIO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia) do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas (Fisiologia).

Orientadores:

- Prof. Dra. Regina Coeli dos Santos Goldenberg
- Prof. Dra. Adriana Bastos Carvalho

Rio de Janeiro 2016 Asensi, Karina Dutra

Alta resistência ao estresse oxidativo: possível vantagem terapêutica das células estromais mesenquimais derivadas do sangue menstrual no infarto do miocárdio / Karina Dutra Asensi. – Rio de Janeiro: UFRJ / IBCCF, 2016.

141 f. : il. ; 31 cm.

Orientadores: Regina Coeli dos Santos Goldenberg, Adriana Bastos Carvalho.

Tese (doutorado) -- UFRJ, IBCCF, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Fisiologia, 2016.

Referências bibliográficas: f. 113-129.

1. Células Mesenquimais Estromais. 2. Menstruação - sangue. 3. Estresse Oxidativo. 4. Terapia Baseada em Transplante de Células e Tecidos. 5. Infarto do Miocárdio – terapia. 6. Traumatismo por Reperfusão Miocárdica - terapia. 7. Fisiologia - Tese. I. Goldenberg, Regina Coeli dos Santos. II. Carvalho, Adriana Bastos. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, IBCCF, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Fisiologia. IV. Título.

"ALTA RESISTÊNCIA AO ESTRESSE OXIDATIVO: POSSÍVEL VANTAGEM TERAPÊUTICA DAS CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS DERIVADAS DO SANGUE MENSTRUAL NO INFARTO DO MIOCÁRDIO"

KARINA DUTRA ASENSI

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENCÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS.

APROVADA POR:

Rio de Janeiro, 29 de junho de 2016.

DRA. CARMEN CABANELAS PAZOS DE MOURA (DOUTOR - UFRJ) COORDENADORA DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS -FISIOLOGIA

MGRO LEUDIS. DRA. REGINA COELI DOS SANTOS GOLDENBERG (DOUTOR - UFRJ) - ORIENTADOR

adrama Bastos Carrallo

DRA, ADRIANA BASTOS CARVALHO (DOUTOR - UFRJ) - 2º ORIENTADOR

Andrea C.F. Ferreina

DRA. ANDREA CLAUDIA FREITAS FERREIRA (DOUTOR – UFRJ) - REVISOR

DRA. DEBORA SOUZA AFFE (DOUTOR - UFRJ)

DR. PAULO HENRIQUE ROSADO DE CASTRO (DOUTOR - UFRJ)

DRA. TATIANA LOBO COELHO DE SAMPAIO (DOUTOR - UFRJ)

À minha amada mãe Marise

Agradecimentos

À minha mãe Marise, que dedicou a sua vida para criar seus filhos, abdicou de muito tempo e de projetos pessoais para que nada nos faltasse. Uma mãe incansável que sempre trabalhou e batalhou todos os dias para que seus filhos pudessem estudar e alcançar tudo o que desejassem. Eu dedico este título à você, que sempre segurou a minha mão ao longo de todos esse anos.

Ao meu pai Alberto, que mesmo morando a mais de 900 km de distância é presente e desperta em mim um grande orgulho pelo seu caráter. Ensinou-me a ser digna, honesta e batalhar muito pelos meus sonhos. Obrigada por todo o seu carinho e amor durante toda a minha vida.

Ao meu irmão Felipe, que esteve ao meu lado durante toda a minha vida, implicando bastante comigo, mas também sempre me amparando e ajudando diante de qualquer problema. Tenho um orgulho imenso do grande homem e profissional que você se tornou. Além disso, torço pela sua felicidade e sucesso diariamente. Amo você demais meu irmão, espero tê-lo ao meu lado para sempre. Obrigado pelo meu sobrinho Bernardo e pela minha cunhada Giselle, que são muito importantes e especiais para mim.

Ao meu noivo e grande amor da minha vida Gabriel, que fez os meus dias mais suaves, felizes e cheios de amor. Agradeço não só pelo carinho e dedicação à nossa vida, mas também pelas inúmeras vezes que me acompanhou ao fundão, bem como me ajudou realizando alguns experimentos. Agradeço todos os dias à Deus por você no meu caminho. Te amo com todas as forças do meu coração.

À minha Orientadora Prof.^a Regina Coeli dos Santos Goldenberg pela amizade, simpatia, incentivo e auxílio ao longo de toda a minha formação. Agradeço por todos os ensinamentos e discussões não só no âmbito acadêmico, mas também no pessoal.

À minha Orientadora Prof.^a Adriana Bastos Carvalho, pelo seu espírito inovador, pela sua disciplina e pela oportunidade de participação em publicações desde o início. Obrigado também pelas inúmeras discussões de dados e desenhos experimentais ao longo de todos esses anos.

Ao Prof. Antonio Carlos Campos de Carvalho, pelo grande apoio científico, pela oportunidade que me foi dada e por acreditar em meu crescimento profissional.

Ao Prof. Rodrigo Soares Fortunato, pelo seu incentivo, amizade, colaborações, ensinamentos, discussões. Sempre disponível e disposto à me ajudar, bem como abriu as portas do seu laboratório, permitindo a realização de diversos experimentos. Obrigado à todos do laboratório RadMol, pela ajuda com os reagentes, protocolos e equipamentos.

À Prof.^a Denise Pires Carvalho por ter aberto as portas do seu laboratório para que essa pesquisa fosse desenvolvida, permitindo livre acesso aos equipamentos. Agradeço em especial a todos do LFEDR que sempre me trataram como se eu fosse de casa, me ajudando com qualquer dúvida que surgisse.

Às minhas grandes amigas do LCCM, Lanuza e Débora pelas intermináveis conversas, almoços, chopps, risos, choros, desabafos, confissões. Sem dúvidas sem vocês ao meu lado esse caminho teria sido bem mais difícil e muito menos divertido.

À minha amiga Grazi, mãe da princesa Alice, que foi fundamental no desenvolvimento desse projeto, que não mediu esforços para me ajudar diversas vezes, vindo de São Paulo, não só pelo nome no trabalho, mas principalmente pela amizade e carinho que construímos ao longo desses anos.

As minhas colaboradores Rosana e Júlia, que foram indispensáveis nesse último ano de doutorado.

Aos colegas do LCCM, que conviveram comigo ao longo desses 9 anos de laboratório, sendo fundamentais no meu aprendizado profissional, bem como tornaram essa trajetória menos árida.

Ao bioterista Carlos, que cuidou dos animais com maior carinho e atenção, sendo um excelente profissional que foi muito importante para o desenvolvimento dessa tese.

As doadoras do sangue menstrual que não pouparam esforços para que este tipo celular fosse estudado.

Às agências de fomento FAPERJ, CNPq, CAPES, INCT que foram fundamentais para a realização deste projeto.

À Deus, pela minha saúde, pela oportunidade e pelo privilégio que me foi realizar esse grande feito em minha vida.

"Feliz é aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina"

Cora Coralina

Resumo

ASENSI, Karina Dutra. Alta resistência ao estresse oxidativo: possível vantagem terapêutica das células estromais mesenquimais derivadas do sangue menstrual no infarto do miocárdio. Tese apresentada como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas – Fisiologia – Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

A doença isquêmica do coração é a principal causa de morte no mundo e o seu tratamento consiste na restauração do fluxo sanguíneo no miocárdio isquêmico. Entretanto, a reperfusão coronariana também pode causar danos teciduais, uma vez que aumenta o estresse oxidativo, devido a um desequilíbrio entre a formação e remoção de espécies reativas de oxigênio (ERO). Uma das grandes responsáveis por essa produção exacerbada de ERO, no coração, são as enzimas NADPH oxidases. Na tentativa de atenuar o remodelamento cardíaco, vários tipos celulares têm sido empregados na área da terapia celular. No entanto, a maior parte das células injetadas em tecidos que sofreram isquemia e reperfusão morre em poucos dias, devido ao microambiente tecidual hostil. Neste contexto, testamos as células estromais mesenquimais derivadas do sangue menstrual (CeSaM) que são resistentes ao estresse oxidativo, devido à elevada atividade de suas enzimas antioxidantes, o que permitiria maior chance de sobrevivência nesse ambiente. Portanto, nossos objetivos foram analisar, in vitro, o impacto do microambiente isquêmico sobre as CeSaM e testar o efeito terapêutico, in vivo, no modelo de infarto do miocárdio por isquemia e reperfusão em ratos. Para tal, as CeSaM foram cultivadas in vitro, submetidas a diferentes concentrações de oxigênio (21, 5 e 1%), na presença ou ausência de soro fetal bovino (SFB), por 48 horas e 7 dias. As CeSaM aderiram e mantiveram o mesmo percentual de células viáveis em todas as condições. Entretanto, a privação de soro, em longo prazo, reduziu o número de células em 60%, uma vez que essa condição impactou negativamente na proliferação das CeSaM. independente da concentração oxigênio. de Adicionalmente, a hipóxia com 1% de O₂ reduziu modestamente a atividade das enzimas antioxidantes. In vivo, o infarto do miocárdio foi induzido em ratos fêmeas da linhagem Wistar por meio da oclusão transitória da artéria coronária descendente

anterior por 90 minutos e foram eutanasiados 1, 2, 6 e 24 horas pós reperfusão. Foi observado, em todos os tempos, que a geração de ERO pelas NADPH oxidases havia dobrado, tanto na borda quanto na área infartada, quando comparada aos falso-operados. Portanto, a terapia celular foi realizada no momento da reperfusão, injetando 5x10⁵ CeSaM na borda e na área infartada. Após 2 horas e 24 horas, não foram encontradas diferenças significativas na produção de ERO e nas atividades das enzimas antioxidantes comparando os animais infartados tratados com célula ou com o veículo, em ambas as regiões analisadas. Nossos resultados mostraram que, *in vitro,* as CeSaM apresentaram elevada viabilidade, capacidade de adesão, proliferação e elevada atividade antioxidante em condições de hipóxia e privação de SFB. Entretanto, não atenuaram *in vivo,* a produção de ERO gerada pelas NADPH oxidases, assim como não melhoraram o potencial antioxidante cardíaco no nosso modelo de isquemia e reperfusão do miocárdio.

Palavras-chave: Células estromais mesenquimais derivadas do sangue menstrual, hipóxia, infarto do miocárdio, estresse oxidativo.

Abstract

ASENSI, Karina Dutra. **High resistance to oxidative stress: possible therapeutic advantage of mesenchymal stromal cells derived from menstrual blood in myocardial infarction.** Tese apresentada como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas – Fisiologia – Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Ischemic heart disease is the leading cause of death in the world and its treatment consists in restoration of blood flow to the ischemic myocardium. However, coronary reperfusion can also generate tissue damage, since it generates oxidative stress, due to an imbalance between reactive oxygen species (ROS) formation and removal. One of the key proteins responsible for this heightened production of ROS, in the heart, are the NADPH oxidase enzymes. In an attempt to attenuate cardiac remodeling, several cell types have been tested in cell therapy. However, most of the injected cells in tissues which underwent ischemia and reperfusion die in a few days, due to the hostile tissue microenvironment. In this context, we tested mesenchymal stromal cells derived from menstrual blood (mbMSC), that are resistant to oxidative stress due to the high activity of its antioxidant enzymes, allowing for a greater chance of survival in this hostile environment. The aim of this work was to investigate the impact of ischemic microenvironment in vitro, and also the effect of mbMSC therapy in the myocardial infarction model by ischemia and reperfusion in rats. For this purpose, mbMSC were cultured in vitro in different oxygen concentrations (21, 5 and 1%) and in the presence or absence of fetal bovine serum (FBS), for 48 hours and 7 days. mbMSC adhered and maintained the same percentage of viable cells in all the different culture conditions. However, serum deprivation for a long period reduced the cell number by 60%, since this condition negativily impacted the mbMSC proliferation, regardless of the oxygen concentration. Additionally, 1% hypoxia modestly reduced antioxidant enzyme activities. For in vivo experiments, females Wistar rats were submitted to transient occlusion of the anterior descending coronary artery for 90 minutes. Animals were euthanized at different times after reperfusion and at 1, 2, 6 and 24 hours there was about 2-fold increase of ROS production by NADPH oxidase in the border and infarcted area compared to sham-operated rats.

Then, cell therapy was performed at the time of reperfusion, injecting 5x10⁵ mbMSC in both areas. After 2 hours and 24 hours, no significant difference was found in ROS production, comparing the infarcted animals treated with cells or vehicle, in both regions analyzed. Additionally, no significant difference was found in antioxidant enzyme activities in the cardiac tissue, due to the treatment with the cells. In conclusion, mbMSC exposed to hypoxic environment and serum deprivation mainteined adhesion, viability, proliferation and high antioxidant activity. However, they did not attenuate ROS production by NADPH oxidases *in vivo* and did not improve cardiac antioxidant potential in our model of myocardial ischemia and reperfusion.

Keywords: mesenchymal stromal cells derived from menstrual blood, hypoxia, myocardial infarction, oxidative stress.

Lista de llustrações

Figura 1.	Protocolo experimental in vitro (Parte I)	46
Figura 2.	Etapas do protocolo experimental in vivo (Parte II)	52
Figura 3.	Microscopia óptica de contraste de fase das células humanas derivadas do sangue menstrual em cultura	64
Figura 4.	Ensaio de adesão celular na presença (20%) ou ausência de soro e nas diferentes concentrações de O ₂	65
Figura 5.	Microscopia óptica de contraste de fase das CeSaM após 7 dias em cultivo nas diferentes concentrações de oxigênio e privação de soro	66
Figura 6.	Ensaio de viabilidade celular com azul de Trypan na presença (20%) ou ausência de soro e nas diferentes concentrações de O ₂	67
Figura 7.	Ensaio de apoptose com anexina V/ 7AAD na presença (20%) ou ausência de soro e nas diferentes concentrações de O ₂	68
Figura 8.	Ensaio de ciclo celular com iodeto de propídeo na presença (20%) ou ausência de soro e nas diferentes concentrações de O ₂	70
Figura 9.	Atividade das enzimas antioxidantes das CeSaM nas diferentes concentrações de oxigênio e privação de soro	72
Figura 10.	Curva de sobrevivência pós-cirúrgica	73
Figura 11.	llustração representativa dos registros eletrocardiográficos	74
Figura 12.	Análises ecocardiográficas no 28º dia do protocolo experimental	75
Figura 13.	Análises das pressões sistólicas, diastólicas e desenvolvidas em determinados volumes, no 28º dia do protocolo experimental	77
Figura 14.	Coloração de picrosirus dos ventrículo esquerdo cardíaco	78
Figura 15.	Atividade da geração de espécies reativas de oxigênio pelas NADPH oxidases	80

- Figura 16. Avaliação da expressão das diferentes NADPH oxidases 2 horas 81 após reperfusão e terapia celular
- **Figura 17.** Avaliação da expressão das diferentes NADPH oxidases 24 horas 82 após reperfusão e terapia celular
- **Figura 18.** Atividade da geração de espécies reativas de oxigênio pelas 83 NADPH oxidases 2 e 24 horas após reperfusão e terapia celular
- Figura 19. Expressão das diferentes enzimas antioxidantes na borda do 85 infarto 2 horas após reperfusão e terapia celular
- Figura 20. Expressão das diferentes enzimas antioxidantes na área infartada 87 2 horas após reperfusão e terapia celular
- Figura 21. Expressão das diferentes enzimas antioxidantes na borda do 89 infarto 24 horas após reperfusão e terapia celular
- Figura 22.Expressão das diferentes enzimas antioxidantes na área infartada9124 horas após reperfusão e terapia celular
- Figura 23. Atividade das enzimas antioxidantes na borda do infarto e na área 93 infartada 24 horas após reperfusão e terapia celular

Lista de Tabelas

- **Tabela 1.**Sequência de *primers* que foram utilizados para detecção dos 60transcritos das NADPH oxidases e controle endógeno (GAPDH)
- **Tabela 2.**Sequência de *primers* que foram utilizados para detecção dos 61transcritos das enzimas antioxidantes

Lista de Abreviaturas e Siglas

7-AAD	7-amino-actinomicina D
ΑΤΡ	Trifosfato de adenosina (do inglês adenosine triphosphate)
BI	Borda do Infarto
BH4	Tretahidrobiopterina
BSS	Solução salina balanceada (do inglês balanced salt solution)
CAT	Catalase
cDNA	DNA complementar
CeSaM	Células estromais mesenquimais derivadas do sangue menstrual
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês deoxyribonucleic acid)
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco (do inglês Dulbecco's Modified
	Eagle Medium)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DS	Débito sistólico
DTT	Ditiotreitol
ECG	Eletrocardiograma
ECO	Ecocardiograma
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês ethylenediamine
	tetraacetic acid).
EGTA	Ácido tetra-acético etileno glicol (do inglês ethylene glycol tetraacetic
	acid)
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial (do inglês endothelial nitric oxide
	synthase)
EO	Estresse oxidativo
ER	Retículo Endoplasmático (do inglês endoplasmatic reticulum)
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ESC	Células-tronco embrionária (do inglês embryonic stem cells)
FC	Frequência cardíaca
FE	Frequência cardíaca
FSC	do inglês forward scatter
GAPDH	Gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase (do inglês Glyceraldehyde -3
	phosphate dehydrogenase)
GPX	Glutationa peroxidase

GR	Glutationa redutase
• • • •	

GSH Glutationa reduzida

GSSG Glutationa oxidada

- hMSC-AT Células estromais mesenquimais humanas derivadas do tecido adiposo (do inglês human mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue)
- **HEPES** Ácido N-2-hidroxietilpipezarina N'-2'etanossulfônico (do inglês *N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2'-ethanesulfonic acid*)
- **HIF-1α** Ácido N-2-hidroxietilpipezarina N'-2'etanossulfônico (do inglês *N-2hydroxyethylpiperazine-N-2'-ethanesulfonic acid*)

HRP Peroxidase de raiz forte (do inglês *horseradish peroxidase*)

- IC Insuficiência Cardíaca
- IM Infarto do miocárdio
- I/R Isquemia e Reperfusão
- **INF** Área infartada
- **INF-CeSaM** Infartado tratado com células estromais mesenquimais derivadas do sangue menstrual
- **INF-P** Infartado tratado com placebo
- **iPSC** Células-tronco pluripotentes induzidas (do inglês *induced pluripotent stem cells*)
- iPSC– Células-tronco pluripotentes induzidas derivadas das célulasCeSaM estromais mesenquimais derivadas do sangue menstrual
- **ISCT** Sociedade Internacional de Terapia Celular (do inglês International Society for Cellular Therapy)
- KHB Solução de Krebs-Henseleit (do inglês Krebs-Henseleit-Buffer)

LANG Técnica de Langerdorff

MSC Células-tronco/estromais mesenquimais (do inglês mesenchymal stem/stromal cells)

- MPTP
 Células-tronco/estromais
 mesenquimais
 (do inglês
 mesenchymal

 stem/stromal cells)
 stem/stromal cells)
 stem/stromal cells)
 stem/stromal cells)
- NADP Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (do inglês *nicotinamide* adenine dinucleotide phosphate)
- NADPH Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (do inglês nicotinamide

	adenine dinucleotide phosphate)
NIH	Instituto nacional de saúde (do inglês National Institutes of Health)
NO	Óxido nítrico (do inglês <i>nitric oxide</i>)
NOX	NADPH oxidase
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Salina tamponada com fosfato (do inglês Phosphate buffered saline)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês Polimerase Chain
	Reaction)
PE	Ficoeritrina (do inglês phycoerythrin)
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase (do inglês phosphoinositide 3-kinase)
PFA	Paraformaldeído
PMSF	Fenilmetanosulfonilfluoreto (do ingles phenylmethylsulphonyl
	fluoride)
PO ₂	Pressão parcial de O ₂
Prx	Peroxirredoxinas
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês Ribonucleic acid)
RT	Transcriptase reversa (do inglês Reverse Transcriptase)
SFB	Soro Fetal Bovino
SOD 1	Superóxido dismutase 1
SOD 2	Superóxido dismutase 2
SOD 3	Superóxido dismutase 3
SSC	do inglês side scatter
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
VDF	Volume diastólico final
VE	Ventrículo esquerdo
VSF	Volume sistólico final
X-XO	Xantina-Xantina Oxidase
хо	Xantina Oxidase

Sumário

	2
1.1. Epidemiologia das doenças cardiovasculares 2	2
1.2. Infarto do miocárdio e suas implicações clínicas	3
1.3. Alternativas terapêuticas para o tratamento da isquemia miocárdica 24	4
1.4. Biologia celular e bioquímica da lesão miocárdica provocada pela isquemia	e
reperfusão (I/R) 2	6
1.5. Espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo	9
1.6. Estresse oxidativo no infarto do miocárdio 3	1
1.7. Terapia celular no infarto do miocárdio e problemas gerados pelo estress	е
oxidativo	5
1.8. Hipótese do trabalho 4	1
2. Objetivos	2
2.1. Objetivo geral	2
2.2. Objetivos específicos parte I	2
2.3. Objetivos específicos parte II	3
3 Materiais e Métodos	1
3.1 Isolamento e cultivo das células estromais mesenguimais derivadas do sangu	- -
5.1. Isolamento e cultivo das celulas estromais mesenguimais derivadas do sangu	6
monstrual	1
menstrual	4
menstrual	4 4
menstrual	4 4 11
menstrual	4 4 1 4 6
menstrual	4 4 1 4 6 7
menstrual	4 4 1 4 6 7 7
menstrual	4 4 1 4 6 7 8
menstrual	4 4 4 6 7 8 8
menstrual	4 4 4 6 7 8 8 9.
menstrual	4 4 4 6 7 8 8 , 9
menstrual	4 4 4 6 7 7 8 8 , 9 9
menstrual	4 4 4 4 6 7 7 8 8 9 9 0
menstrual. 4 3.1.1. Coleta das células humanas derivadas do sangue menstrual. 4 3.1.2. Isolamento e cultivo das células aderentes presentes no sangue menstrua 4 3.2. Ensaio de adesão celular. 4 3.3. Viabilidade celular com azul de Trypan. 4 3.4. Ensaio de Apoptose: Anexina V e 7AAD. 4 3.5. Ensaio de ciclo celular: lodeto de Propídeo 4 3.6. Atividade das enzimas antioxidantes 4 3.6.1. Preparação do homogenato Erro! Indicador não definido 3.6.2. Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD). 4 3.6.4. Determinação da atividade da glutationa peroxidase (GPX). 5 3.7. Animais experimentais. 5	4 4 4 6 7 7 8 8 8) 9 9 0 0
menstrual 4 3.1.1. Coleta das células humanas derivadas do sangue menstrual 4 3.1.2. Isolamento e cultivo das células aderentes presentes no sangue menstrua 4 3.2. Ensaio de adesão celular 4 3.3. Viabilidade celular com azul de Trypan 4 3.4. Ensaio de Apoptose: Anexina V e 7AAD 4 3.5. Ensaio de ciclo celular: lodeto de Propídeo 4 3.6. Atividade das enzimas antioxidantes 4 3.6.1. Preparação do homogenato Erro! Indicador não definido 3.6.2. Determinação da atividade da catalase 4 3.6.3. Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD) 4 3.6.4. Determinação da atividade da glutationa peroxidase (GPX) 5 3.7. Animais experimentais 5 3.8. Desenho do estudo <i>in vivo</i> 5	4 4 4 6 7 7 8 8 8). 9 9 9 0 0

3.10. Eletrocardiograma (ECG) 5	4
3.11. Ecocardiografia (ECO) 5	5
3.12. Técnica de Langendorff 5	6
3.13. Preparação histológica 5	7
3.14. Morfometria 5	7
3.15. Preparação do homogenato do tecido cardíaco para posterior avaliação d	a
produção de ERO 5	7
3.16. Dosagem da atividade geradora de H ₂ O ₂ 5	8
3.17. Viabilidade e injeção das CeSaM 5	8
3.18. Níveis de RNA mensageiro das NADPH oxidases e enzimas antioxidantes 5	9
3.18.1. Extração do RNA total5	9
3.18.2. Reação da transcrição reversa5	9
3.18.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real	9
3.19. Análise estatística 6	;1
4. Resultados 6	3
4.1. Isolamento e cultivo das células estromais mesenquimais derivadas do sangu	e
menstrual	3
4.2. Avaliação da adesão celular nas diferentes condições de cultivo 6	4
4.3. Avaliação da susceptibilidade à morte nas diferentes condições de cultivo 6	7
4.4. Quantificação do percentual de células apoptóticas nas diferentes condições d	le
cultivo 6	8
4.5. Avaliação do ciclo celular nas diferentes condições cultivo	9
4.6. Ensaio de atividade das enzimas antioxidantes nas diferentes condições d	le
cultivo7	'1
4.7. Estabelecimento do modelo animal de infarto do miocárdio7	3
4.7.1. Mortalidade cirúgica e pós-cirúrgica7	3'
4.7.2. Avaliação da atividade elétrica cardíaca7	'4
4.7.3. Avaliação da função cardíaca7	5'
4.7.4. Avaliação da mecânica cardíaca7	6'
4.7.5. Avaliação área infartada do ventrículo esquerdo	'8
4.8. Estabelecimento do ponto de maior produção de espécies reativas de oxigêni	0
após isquemia e reperfusão do miocárdio7	8
4.9. Impacto da terapia celular na produção de ERO e na defesa antioxidante	1
4.9.1. Níveis de RNA mensageiro das diferentes NADPH oxidases no tecid	0
cardíaco	1
4.9.2. Produção de espécies reativas de oxigênio após a terapia celular n	0
coração dos animais infartados 8	3

4.9.3. Níveis de RNA mensageiro das enzimas antioxidantes no tecido cardíaco. 84
4.9.4. Análise da atividade das enzimas antioxidantes no tecido cardíaco
5. Discussão
6. Conclusão 112
Referências Bibliográficas
Anexo A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa
Anexo B – Aprovação da Comissão de Ética de Uso de Animais em Experimentação
Científica
Anexo C – Tabelas de Resultados dos Experimentos <i>in vitro</i>
Anexo D – Tabelas de Resultados dos Experimentos <i>in vivo</i>

1. Introdução

1.1. Epidemiologia das doenças cardiovasculares

Ao longo das últimas décadas, ocorreu uma mudança no perfil de mortalidade da população, com grande predomínio das doenças e mortes devidas às doenças não comunicáveis, dentre elas câncer, acidente vascular cerebral, diabetes, hipertensão e infarto do miocárdio (IM) (BUTLER, 2011).

As doenças cardiovasculares, que constituem o grupo de doenças que envolvem o coração e os vasos sanguíneos, são as principais causas de morte no mundo, sendo consideradas um grave problema no sistema de saúde pública (MURRAY, LOPEZ,1997). Conforme os dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), as enfermidades cardiovasculares atingiram elevados índices de morbidade e mortalidade em todo o mundo (30,5% e 17,5 milhões de mortes em 2008 e 2012 (BUTLER, 2011; OMS, 2016), podendo atingir 22 milhões em 2030 (OMS, 2016). No Brasil, em 2014, dados da OMS indicaram que as doenças cardiovasculares foram responsáveis por 31% dos óbitos (OMS, 2016).

Adicionalmente, a doença isquêmica do coração, que é um tipo de doença cardiovascular, é a principal causa de morte no mundo (Site da OMS – acesso 08/05/2016), levando cerca de 7,4 milhões de pessoas ao óbito, que representa 13,2% das mortes em 2012. Segundo o DATASUS, dentre as doenças do aparelho circulatório, as doenças isquêmicas do coração apresentaram uma elevada taxa de mortalidade em torno de 53%, ocasionando o óbito de 103.000 pessoas em 2011 e sendo responsáveis por 12% das internações em 2012 no Brasil (Portal Saúde/ Ministério da Saúde, 2016).

1.2. Infarto do miocárdio e suas implicações clínicas

Dentre as doenças isquêmicas do coração, a forma mais grave é o infarto do miocárdio (IM), o qual se refere à morte de parte do músculo cardíaco (miocárdio), que ocorre de forma rápida (ou aguda) devido à obstrução do fluxo sanguíneo das artérias coronárias para o coração. A obstrução é causada mais frequentemente pela formação de um trombo sanguíneo sobre uma placa aterosclerótica no interior de uma das artérias coronárias (BRAUNERSREUTHER *et al.*, 2013).

A extensão do infarto depende da área de miocárdio irrigada pela artéria coronária ocluída, do tempo para realização de uma terapia de reperfusão eficaz, do consumo de energia do miocárdio durante a oclusão da coronária, da presença de circulação colateral e se a terapia de reperfusão foi realizada (FRANTZ *et al.*, 2009).

A partir do momento em que o fluxo sanguíneo é interrompido, ocorre uma redução do aporte de O₂ e nutrientes, bem como uma remoção inadequada de metabólitos, gerando morte celular. A morte, principalmente dos cardiomiócitos, provoca perda de miocárdio contrátil, comprometendo a função sistólica regional e desencadeando uma cascata de respostas imuno-inflamatórias. Essas respostas promovem o acúmulo de células inflamatórias no local e edema, que irão remover as células mortas. Essa área, chamada de necrótica, é circundada por região conhecida como borda do infarto ou zona marginal, que pode recuperar a função, mas é susceptível a danos irreversíveis (SUTTON; SHARPE, 2000).

Em torno de 5 dias após o infarto, inicia-se a proliferação e ativação de fibroblastos, que secretam colágeno e outros componentes de matriz extracelular, substituindo o tecido necrótico por tecido fibroso, formando uma cicatriz rígida. Esse processo de cicatrização do infarto resulta em um padrão único de remodelamento estrutural cardíaco, envolvendo a região infartada e o miocárdio residual viável, a fim de se adaptarem à nova estrutura formada (FRANTZ *et al.*, 2009; FRANGOGIANNIS *et al.*, 2002; DOBACZEWSKI *et al.*, 2010).

Considerando áreas de infarto pequenas, as respostas compensatórias do miocárdio viável são suficientes para compensar a perda de miócitos e manter o desempenho ventricular global e a geometria (PFEFFER; BRAUNWALD, 1991). No entanto, em infartos mais extensos, diferentes fatores contribuirão para o remodelamento cardíaco, tais como ausência de contração na área infartada,

expansão da cicatriz fibrótica e sobrecarga de volume na cavidade ventricular (OPIE *et al.*, 2006).

A fase inicial do remodelamento cardíaco após o infarto é caracterizada pela expansão do infarto, que é um processo no qual a região atingida afina e distende, devido aos danos na unidade sarcomérica e reestruturação dos filamentos de matriz extracelular. Mais tardiamente, o remodelamento é secundário ao rearranjo arquitetônico do miocárdio sobrevivente e envolve hipertrofia dos miócitos, com adição de sarcômeros em série, fibrose intersticial e dilatação do ventrículo esquerdo (PFEFFER e BRAUNWALD, 1991; OPIE *et al.*, 2006), a fim de acomodar a sobrecarga de volume presente no coração.

O tecido infartado não contribui para a geração de pressão durante a sístole, levando a um comprometimento da função cardíaca, aumento do trabalho e consumo de energia na região ainda viável. O grau de dilatação ventricular após o infarto está relacionado com a magnitude do dano inicial ao miocárdio e, apesar do aumento no tamanho da cavidade tender a restaurar o débito cardíaco, o percentual de sangue ejetado a cada sístole permanece persistentemente reduzido. Assim, a função cardíaca avaliada pela fração de ejeção (FE) diminui em uma relação direta com a extensão do dano tecidual (FLETCHER *et al.*, 1981; HORI *et al.*,1977, OPIE *et al.*, 2006).

Uma das possíveis consequências em longo prazo para os pacientes que sobrevivem ao insulto isquêmico é o desenvolvimento do quadro clínico conhecido como insuficiência cardíaca (IC), caracterizado pela insuficiência do coração em atender às necessidades metabólicas do organismo devido à capacidade de ejeção deficiente. Atualmente, a prevelência mundial desse quadro é de 38 milhões de pessoas (BRAUNWALD, 2015).

1.3. Alternativas terapêuticas para o tratamento da isquemia miocárdica

Os avanços da terapia farmacológica e cirúrgica nas últimas décadas, sem dúvida, foram importantes para redução do número de óbitos causados por infarto agudo do miocárdio. Essas terapias, em sua maioria, impactam na perfusão coronariana, atenuando ou revertendo a redução do fluxo sanguíneo, promovendo a

reperfusão do tecido isquêmico. Por consequência, os cardiomiócitos ainda viáveis terão maiores chances de sobrevivência, reduzindo a perda de músculo contrátil (MAROKO *et al.*, 1972; GINKS *et al.*, 1972).

No coração, tanto em humanos como em modelos animais, ocorrem danos irreversíveis aos cardiomiócitos após cerca de 20 minutos de isquemia. Portanto, o rápido restabelecimento do fluxo sanguíneo é vital para a sobrevivência do indivíduo e resgate de miocárdio ainda viável. A intervenção realizada nas primeiras duas horas de isquemia é a melhor opção (BOERSMA *et al.*, 1996), apesar de dados mostrarem que mesmo depois de doze horas, a reabertura das artérias coronárias ocluídas oferece ainda benefícios (LATE_Study_Group, 1993).

Inicialmente, ferramentas farmacológicas podem ser utilizadas, tais como, antiagregantes plaquetários (clopidogrel, aspirina), drogas fibrinolíticas (estreptoquinase), anticoagulantes (heparina), beta-bloqueadores e inibidores da enzima conversora de angiotensina. Adicionalmente, podem ser realizadas intervenções cirúrgicas, tais como a revasculacularização miocárdica e a angioplastia coronariana. Apesar dos avanços na terapia farmacológica e/ou cirúrgica, essas abordagens terapêuticas não são curativas e pode-se evoluir para disfunção cardíaca progressiva, resultando na insuficiência cardíaca, cuja única alternativa é o transplante cardíaco (RUSSO *et al.,* 2014).

O tempo de espera por um transplante depende de diversos fatores, como a disponibilidade do órgão a ser transplantado, das características genéticas do potencial receptor e do seu estado de saúde. No Brasil, o tempo de espera para o transplante é geralmente de 6 meses, totalizando 309 transplantes realizados no ano de 2014 (Portal Saúde/ Ministério da Saúde – Acesso em 01/05/2016). O transplante apresenta complicações que devem ser levadas em consideração, tais como baixa relação doador/receptor e rejeição imunológica. Além disso, a realização de um transplante cardíaco tem um alto custo, que compreende desde o procedimento cirúrgico, até o acompanhamento do paciente transplantado. Outro fator limitante e um dos mais complexos é necessidade de realização desta cirurgia em um tempo bastante curto. O tempo máximo de isquemia do coração, prazo entre a retirada do órgão do doador e o seu implante no receptor, é de apenas quatro horas (Portal Saúde/ Ministério da Saúde – Acesso em 17/03/2016). Todos estes impedimentos fazem com que o transplante seja uma alternativa razoável, porém, insuficiente para suprir as necessidades da sociedade.

Diante das considerações descritas acima e da limitada capacidade de regeneração do coração, surge na década de 90 uma opção terapêutica inovadora: a terapia celular (CHIU *et al.*, 1995). Essa abordagem baseada em células visa promover a restauração do tecido cardíaco funcional após necrose isquêmica, substituindo cardiomiócitos danificados, promovendo a revascularização, reduzindo a fibrose, melhorando a complacência ventricular, pressão e hemodinâmica. Além disso, podem ser utilizados fatores de proliferação e diferenciação celulares, bem como biomateriais que auxiliam no reparo de tecidos e órgãos lesados (RUSSO *et al.,* 2014).

1.4. Biologia celular e bioquímica da lesão miocárdica provocada pela isquemia e reperfusão (I/R)

Em pacientes com infarto do miocárdio, o tratamento de escolha para reduzir a lesão isquêmica aguda e limitar o tamanho da infarto é realizar de forma eficaz a reperfusão miocárdica através da terapia trombolítica ou intervenção coronariana. No entanto, o processo de reperfusão em si pode induzir a morte de cardiomiócitos, conhecido como lesão de reperfusão do miocárdio, para a qual ainda não há uma terapia eficaz (BRAUNWALD e KLONER, 1985; PIPER *et al.*, 1998; YELLON e HAUSENLOY, 2007).

Inicialmente, a oclusão aguda da artéria coronária compromete o miocárdio irrigado por aquele vaso durante a isquemia miocárdica aguda, demarcando assim a área em risco que potencialmente pode resultar no infarto do miocárdio, se a oclusão coronariana for sustentada ou permanente. Se o período de isquemia miocárdica aguda é prolongado, mais de 20 minutos, começa uma "onda" de morte de cardiomiócitos no subendocárdio e estende-se transmuralmente ao longo do tempo para o epicárdio (REIMER *et al.*, 1977).

Durante a isquemia, a privação de oxigênio e nutrientes resulta em uma série de alterações bioquímicas e metabólicas abruptas no miocárdio. A ausência de O₂ favorece a prevalência do metabolismo anaeróbico glicolítico, o que produz queda do pH intracelular devido ao aumento da produção de ácido lático. Para atenuar esse acúmulo de íons de hidrogênio, o trocador Na⁺/H⁺ excreta os íons hidrogênio em excesso, o que produz grande influxo de íons de sódio (BAINES, 2009a, b; BAINES, 2010; MURPHY e STEENBERGEN, 2009; SANADA *et al.*, 2011;

KALOGERIS *et al.*, 2012). Entretanto, esse excesso de Na⁺ intracelular não é externalizado de forma eficiente, uma vez que a isquemia também esgota o trifosfato de adenosina (ATP), inibindo as ATPases (como por exemplo, Na⁺ / K⁺ ATPase e a Ca²⁺ ATPase). Além da inatividade da Ca²⁺ ATPase presente na membrana citoplasmática devido falta de ATP, outros mecanismos promovem acúmulo de cálcio intracelular. Um deles é a redução de sua recaptação pelo retículo sarcoplasmático através da SERCA e o aumento da liberação do mesmo pelo receptor de rianodina, bem como o bloqueio de seu efluxo pela bomba Ca²⁺ ATPase na membrana citoplasmática, agravando a sobrecarga de cálcio na célula (SANADA *et al.*, 2011; KALOGERIS *et al.*, 2012; SZYDLOWSKA e TYMIANSKI, 2010; TALUKDER, 2009). Adicionalmente, ocorre redução da atividade do trocador Na⁺/Ca²⁺ na membrana do sarcolema, dificultando o escoamento de cálcio, favorecendo o acúmulo intracelular desse íon. Por consequência, a sobrecarga de cálcio gera uma desorganização estrutural, bem como a morte por apoptose e necrose (YELLON e HAUSENLOY, 2007; KLEIKER *et al.*, 2012)

Após o início da isquemia miocárdica aguda, a intervenção para reperfusão desse tecido é oportuna e essencial para salvar miocárdio viável, limitar o tamanho do infarto, preservar a função sistólica e prevenir o desenvolvimento de insuficiência cardíaca (BULKLEY, 1987). No entanto, embora a reperfusão restaure o fornecimento de oxigênio, nutrientes e substratos necessários para a geração de ATP pela via aeróbica, bem como normalize pH extracelular, removendo os ions H⁺ acumulados, a própria reperfusão gera consequências prejudiciais ao miocárdio. Este conceito surgiu originalmente há mais de 50 anos, quando foi observado pela primeira vez que a reperfusão parecia acelerar o desenvolvimento de necrose nos corações submetidos a oclusão coronariana (JENNINGS *et al.*, 1960). Essa foi denominada lesão de reperfusão, que descreve os eventos associados ao restabelecimento do fluxo sanguíneo, que não tinham ocorrido durante o período isquêmico anterior (YELLON e HAUSENLOY, 2007).

Com o restabelecimento do fluxo sanguíneo, o trocador Na⁺/Ca²⁺ na membrana do sarcolema, que normalmente faz a extrusão de Ca²⁺ a partir da célula, inverte sua atividade passando a excretar Na⁺ e promovendo o influxo de Ca²⁺, elevando sua concentração intracelular. Estas mudanças no cálcio intracelular podem contribuir para a morte da célula, uma vez que esse íon é direcionado para dentro da mitocôndria através do transportador mitocondrial de Ca²⁺ uniporte

(CONTRERAS *et al.*, 2010; SZYDŁOWSKA e TYMIANSKI, 2010; TALUKDER *et al.*, 2009). Elevações excessivas de Ca²⁺ mitocondrial podem desencadear a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (MPTP). O MPTP é um canal não seletivo da membrana mitocondrial interna e sua abertura resulta em despolarização da membrana mitocondrial e desacoplamento de fosforilação oxidativa, o que leva à depleção de ATP e à morte celular (HAUSENLOY *et al.*, 2003; HEUSCH *et al.*, 2010). No infarto agudo do miocárdio, foi demonstrado que o MPTP permanece fechado durante a isquemia, entretanto, na reperfusão, sua abertura ocorre apenas em resposta à sobrecarga mitocondrial de Ca²⁺, estresse oxidativo e rápida correção do pH. No coração, estas alterações celulares devidas à elevação de Ca²⁺ intracelular também ativam proteases intracelulares (por exemplo, calpaína) que danificam miofibrilas, produzem hipercontratura do miocárdio e necrose da banda contrátil (CROALL e ERSFELD, 2007).

Além disso, logo nos primeiros minutos de reperfusão do miocárdio, há uma elevação abrupta do estresse oxidativo (ZWEIER *et al.*, 1987; HAUSENLOY e YELLON, 2013), devido à geração excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO) produzido por uma variedade de fontes, mediando lesões no miocárdio e morte de cardiomiócitos por meio de diferentes mecanismos. Durante a reperfusão, a produção de ERO também induz a rápida abertura do MPTP, a qual, se prolongada, resulta em mudanças celulares irreversíveis e morte celular devido à liberação de fatores pró-apoptóticos, como por exemplo o citocromo c (KALOGERIS; BAO; KORTHUIS, 2014). Além disso, outras consequências diretas da geração de ERO nas células cardíacas são a peroxidação lipídica, a ativação de metaloproteases de matriz e oxidação do ácido desoxirribonucléico (DNA). Logo, as características morfológicas típicas do infarto do miocárdio que passou pelo processo de reperfusão são as bandas de contração, desregulação da homeostase mitocondrial, ruptura da membrana de cardiomiócitos, acompanhada pela destruição microvascular, hemorragia intersticial e inflamação.

Os agentes previamente descritos, que participam do desenvolvimento da lesão de reperfusão do miocárdio, parecem operar nos primeiros minutos da reperfusão miocárdica, proporcionando uma janela estreita para reduzir o tamanho do infarto em pacientes que sofreram intervenção farmacológica ou cirúrgica. No entanto, vários outros processos importantes, tais como a apoptose, necrose e inflamação, os quais também são iniciados durante a isquemia e continuam ao longo

de várias horas de reperfusão, podem contribuir para o desenvolvimento da lesão de reperfusão do miocárdio. (HAUSENLOY e YELLON, 2013)

Clinicamente, existem diversas consequências associadas à lesão de reperfusão. Embora a homeostase celular seja restabelecida após a reperfusão, a disfunção contrátil reversível pode passar a ser persistente e esta consequência é atribuída a vários mecanismos, tal como a diminuição da síntese de ATP (ELTZSCHIG; COLLARD, 2004). As alterações repentinas nas concentrações dos íons após a reperfusão podem induzir arritmias de reperfusão, uma condição frequentemente observada em pacientes submetidos à revascularização cirúrgica. Essas arritmias, tais como fibrilação ventricular e taquicardia ventricular, são as principais responsáveis pela morte repentina após a restauração do fluxo sanguíneo (ELTZSCHIG; COLLARD, 2004; IBÁÑEZ *et al.*, 2015). Além disso, a obstrução da microvasculatura pode ser observada após a reperfusão. Nesta condição, o sangue não reperfunde completamente a região isquêmica após a liberação da oclusão (IBÁÑEZ *et al.*, 2015).

Por fim, é evidente que a lesão tecidual total representa a soma dos danos atribuídos à isquemia e à reperfusão. Além disso, é importante destacar que a morte progressiva das células pode perdurar por até 3 dias após o início da reperfusão (ZHAO *et al.*, 2000). Assim, a compreensão dos mecanismos envolvidos abre o caminho para o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas que não só reduzam a extensão da lesão induzida pela I/R, mas também que possam estender o tempo que um tecido suportaria a isquemia antes de ocorrer lesão irreversível.

1.5. Espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo

No infarto agudo do miocárdio, a lesão de reperfusão cursa com elevação de espécies reativas de oxigênio (OSHIMA *et al.,* 2005; ANGELOS *et al.,* 2006; HORI e NISHIDA *et al.,* 2009).

O oxigênio é fundamental para a sobrevivência de organismos aeróbios, sendo utilizado na produção de energia na mitocôndria dos eucariotos e em diversas vias metabólicas. No entanto, o mesmo é capaz de gerar substâncias tóxicas tanto no meio intracelular quanto extracelular. Essas substâncias ou espécies químicas são geradas durante o transporte de elétrons, reações de auto-oxidação, reações

enzimáticas e são comumente chamadas de espécies reativas de oxigênio (OGA, 2003; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). A homeostase é mantida pelo balanço adequado entre a produção e remoção das ERO.

A maioria das ERO são radicais livres, por possuírem um ou mais elétrons não-pareados em seus orbitais externos, como o ânion superóxido e o radical hidroxila. Isso as torna altamente reativas e capazes de se combinar inespecificamente com diversas moléculas integrantes das estruturas celulares (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Além disso, outras moléculas que não são radicais também são consideradas ERO, como por exemplo, o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Estas espécies químicas têm grande capacidade reativa devido à sua instabilidade, apresentando meia-vida curta. A fim de captar um elétron para sua estabilização, estes radicais podem reagir com qualquer composto celular (HALLIWELL, 2007). Além disso, as ERO também modulam a atividade de diversas vias de sinalização intracelular envolvidas na sobrevivência, crescimento, migração e diferenciação celular (DIKALOV *et al.*, 2007; FINKEL, 2003; GRIENDLING *et al.*, 2000), bem como desencadeiam a liberação de citocinas e quimiocinas (FRANTZ *et al.*, 2009).

Todos os tipos celulares presentes no coração, tais como os cardiomiócitos, células endoteliais, células musculares lisas dos vasos, fibroblastos e células inflamatórias, são capazes de produzir ERO por meio de diferentes fontes (BEDARD e KRAUSE, 2007).

Contrabalanceando a formação de espécies reativas de oxigênio no nosso organismo, temos a defesa antioxidante, que pode atuar por meio de vários mecanismos, tais como: eliminando ERO ou seus precursores, inibindo a formação de ERO, atenuando a catálise de geração de ERO se ligando a ions metálicos, aumentando a geração de antioxidantes endógenos e reduzindo a morte celular por apoptose e pela regulação positiva do gene Bcl-2 (MAULIK *et al.*, 1999). Os antioxidantes são geralmente classificados como antioxidantes endógenos e raduzindo endógenos e antioxidantes endógenos e neclas endógenos e natioxidantes endó

O componente antioxidante enzimático está envolvido na proteção primária do organismo. As enzimas atuam contra as ERO como detoxificadoras, mantendo a concentração de ERO dentro de limites fisiológicos. Esse sistema é composto por diferentes enzimas, tais como: a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD),

glutationa peroxidase (GPX), glutationa redutase (GR), peroxirredoxinas (Prx), dentre outras (NORDBERG e ARNÉR, 2001).

A GPX funciona como mecanismo de proteção contra o estresse oxidativo, uma vez que oxida a glutationa reduzida (GSH) em glutationa oxidada (GSSG), convertendo o H₂O₂ em água. Já a catalase também desempenha importante papel na eliminação do H₂O₂, convertendo-o em água e oxigênio molecular, entretanto a sua reação não é acoplada a nenhuma outra. A superóxido dismutase catalisa a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio. Dessa forma, essas enzimas evitam o acúmulo de radical superóxido e de peróxido de hidrogênio, evitando que haja produção de radical hidroxila, contra o qual não existe sistema enzimático de defesa. (DHALLA *et al*, 2000).

O desequilíbrio entre a formação e a remoção dos radicais livres no organismo, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou do aumento da geração de espécies oxidantes, gera um estado que favorece a ocorrência de lesões oxidativas, definida como estresse oxidativo (EO). A citotoxicidade do estresse oxidativo está relacionada ao potencial das ERO em oxidar os constituintes celulares, incluindo proteínas, lipídios e DNA, os quais levam à deterioração da estrutura e função, podendo culminar com morte celular (HALLIWELL, 2007; WEN *et al.*, 2004; ZACKS *et al.*, 2005; VALKO *et al.*, 2006).

1.6. Estresse oxidativo no infarto do miocárdio

O estresse oxidativo gerado após o infarto do miocárdio produz disfunção contrátil do músculo e danos estruturais, além disso, tem sido implicado no desenvolvimento de insuficiência cardíaca e no remodelamento ventricular esquerdo após o infarto (JOSEPHSON *et al.*, 1991; GRIEVE *et al.*, 2003; BYRNE *et al.*, 2003). Curiosamente, o tecido cardíaco em si é uma fonte rica de ERO, uma vez que NADPH oxidases (NOX), xantina oxidases (XO), óxido nítrico sintase (eNOS) e mitocôndrias são determinantes críticos na geração de ERO no miocárdio (HEYMES *et al.*, 2003; FRANTZ *et al.*, 2006).

Em condições patológicas, as mitocôndrias podem gerar ERO excessivamente, como subproduto da fosforilação oxidativa, uma vez que ocorre um desacoplamento da cadeia transportadora de elétrons que resulta em uma produção

exacerbada do ânion superóxido a partir do O₂ durante a reperfusão, o qual não é mais eliminado de forma eficiente pela superóxido dismutase mitocondrial (GRIEVE *et al.*, 2004; MURPHY, 2009).

A hipoxantina é formada em excesso durante a isquemia devido à degradação do ATP. Durante a reperfusão, a xantina desidrogenase é oxidada formando xantina oxidase, que catalisa a conversão da hipoxantina em xantina e, posteriormente, da xantina em ácido úrico. Além disso, o ânion superóxido pode ser formado como um subproduto desta reação. Com relação às xantina oxidases, já foi demonstrado que ocorre um aumento da expressão e atividade dessas enzimas após o infarto, resultando em maior formação de ânion superóxido no tecido cardíaco (EKELUND *et al.*, 1999; RAEDSCHELDER *et al.*, 2012). Estudos avaliando o alopurinol, um inibidor potente XO, têm gerado resultados positivos na redução da geração de ERO e inibindo a apoptose de cardiomiócitos em modelos de infarto do miocárdio (XIAO *et al.*, 2009).

O desacoplamento da eNOS por redução da disponibilidade de substratos e co-fatores, tais como tretahidrobiopterina (BH₄) e L-arginina, resulta no aumento da produção de O₂•- e redução de óxido nítrico (NO) (PACHER; BECKMAN; LIAUDET, 2007). O peroxinitrito (ONOO⁻), formado pela reação de NO com O₂•⁻, por sua vez é um potente agente oxidante, que contribui ainda mais para o desacoplamento da eNOS e oxidação da BH₄ aumentando a produção de ERO (LANDMESSER *et al.*, 2003). Além disso, o peroxinitrito produz danos celulares através de peroxidação lipídica e fragmentação do DNA no coração, bem como induz a depleção dos agentes antioxidantes (MA *et al.*, 1997; RADI *et al.*, 1991).

Outras proteínas de extrema importância para a produção de ERO durante a lesão de reperfusão são as NADPH oxidases, que constituem uma família de enzimas associadas às membranas celulares que catalisam a redução de oxigênio molecular utilizando a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) como um doador de elétrons. A família NOX é composta por 7 isoformas diferentes na sua subunidade catalítica, NOX1-5 e DUOX1 / 2, cada uma delas apresenta dois grupos heme, assim como sítios de ligação para FAD e NADPH. A função primária das NOX é produzir ânion superóxido por uma única redução de elétrons. No entanto, no caso da NOX4 e das DUOXes, o H₂O₂ é o principal produto (BRANDES; WEISSMANN; SCHRODER, 2009).

As principais fontes de O_2^- e H_2O_2 no coração são NOX2 e 4, que desempenham um papel crucial na regulação do remodelamento e morte de cardiomiócitos, apesar de NOX1 e NOX5 também estarem presentes no tecido cardiovascular. A lesão por isquemia e reperfusão regula positivamente NOX2 e NOX4, aumentando sua expressão e atividade, e portanto contribuindo significativamente para a produção de ERO e consequente lesão do miocárdio (MAEJIMA *et al.*, 2011).

A NOX2 está predominantemente localizada na membrana plasmática e a sua atividade é regulada por fatores citosólicos, incluindo p47phox, p67phox, p40phox e Rac. A NOX4 está predominantemente localizada nas membranas de organelas intracelulares, incluindo o núcleo, mitocôndria e o retículo endoplasmático (ER). Diferentemente da NOX2, acredita-se que NOX4 seja constitutivamente ativa e a sua atividade controlada principalmente pelos seus níveis de expressão (MATSUSHIMA; TSUTSUI; SADOSHIMA, 2014).

Em animais NOX2^{-/-}, já foi demonstrado que o efeito prejudicial das ERO ocorre durante a fase de reperfusão, em vez de durante a fase isquêmica, pois não foi observado qualquer efeito protetor *in vivo,* na ausência de reperfusão, após 24 horas de isquemia. Este resultado é consistente com o conceito de que o fornecimento de oxigênio durante a reperfusão é o substrato para a geração de ERO (BRAUNERSREUTHER *et al.*, 2013). Além disso, já se sabe que animais NOX2 ^{-/-}, quando infartados, apresentam redução da morte celular dos cardiomiócitos, melhora da sobrevivência dos animais, bem como redução significativa da área do infarto (AKKI *et al.*, 2009; MATSUSHIMA *et al.*, 2013; BRAUNERSREUTHER *et al.*, 2013).

Outros fatores extremamente importantes durante a fase aguda são os danos teciduais e as lesões vasculares causadas pelo infarto do miocárdio que resultam no recrutamento de células inflamatórias para a região infartada, aumentando a inflamação local e gerando aumento do estresse oxidativo. Os neutrófilos e macrófagos, que são células primárias inflamatórias de combate do sistema imune, elevam a expressão de NADPH oxidases diante de um quadro inflamatório (FUKIU *et al.*, 2001). Este é considerado um importante elo entre a inflamação e estresse oxidativo após o IM. Embora a inflamação promova o estresse oxidativo, as espécies reativas de oxigênio também podem aumentar a inflamação, estimulando a produção de TNF-α no tecido cardíaco (KABE *et al.*, 2005) e ativando o NF-kB, que

é um mediador importante da inflamação por aumentar a expressão de várias moléculas de adesão, proteínas quimiotáticas e citocinas pró-inflamatórias (SCHOONBROODT e PIETTE, 2000).

Estudos mostraram que os aumentos na produção de ERO e nos níveis de citocinas inflamatórias após IM não estão limitados à fase de reperfusão ou às fases iniciais do infarto. Tais aumentos podem continuar durante as fases tardias do remodelamento cardíaco e na insuficiência cardíaca. Por exemplo, os corações humanos com insuficiência cardíaca exibem tropomiosinas com dimerizações e nitrosilações, bem como um aumento da carbonilação de actina e tropomiosina, que são modificações proteicas mediadas pelas ERO (CANTON *et al.*, 2011).

Além dos efeitos prejudiciais da oxidação em si, as ERO também podem promover o desenvolvimento de fibrose intersticial e mudanças na matriz extracelular, em parte por meio da ativação de metaloproteinases de matriz.

Contrabalanceando o estresse gerado, o coração normal possui uma capacidade substancial para neutralizar as espécies reativas de oxigênio que estão sendo geradas em condições basais. Os antioxidantes são definidos como substâncias que inibem ou retardam o dano oxidativo a proteínas celulares, lípidos e DNA. No entanto, no coração lesado, a defesa antioxidante está sobrecarregada, resultando na permanência dessas espécies em excesso (HILL e SINGAL, 1996). Além disso, existem evidências de diminuição da capacidade antioxidante, bem como da expressão do gene e da proteína superóxido dismutase, as quais contribuem para o aumento do estresse oxidativo no miocárdio infartado (SUN, 2009). Em corações de ratos, foi demonstrado que os níveis de superóxido dismutase, catalase, glutationa peroxidase estavam diminuídos após IM (HILL e SINGAL, 1997).

Com base nestas observações, a terapia antioxidante foi naturalmente considerada uma opção adequada para evitar tal prejuízo. Entretanto, diversos estudos clínicos investigaram o papel dos antioxidantes em lesões de reperfusão mediadas por ERO pela administração de drogas antioxidantes, antes da intervenção coronariana ou após trombólise. Infelizmente, os resultados não mostraram redução do tamanho do infarto ou melhora da função cardíaca (YELLON e HAUSENLOY, 2007).

Assim, a administração de antioxidantes não foi promissora, possivelmente devido à necessidade absorção intestinal, ao metabolismo de primeira passagem no

fígado e à meia vida curta dessas moléculas. Logo, novas terapias são necessárias a fim de reduzir o estresse oxidativo tecidual, visando à preservação da função cardíaca.

1.7. Terapia celular no infarto do miocárdio e problemas gerados pelo estresse oxidativo

Nos últimos 15 anos, vários ensaios pré-clínicos e clínicos foram realizados a fim de avaliar o potencial da terapia celular, com o uso de células-tronco, na regeneração tecidual e na atenuação do remodelamento ventricular esquerdo. Diante dos resultados, obtidos as células-tronco e seus derivados vem sendo considerados uma ferramenta promissora para regeneração e reparo dos cardiomiócitos e para a restauração da função cardíaca (WILLIAMS e HARE, 2011; KRAUSE *et al.*, 2010).

As células-tronco são caracterizadas como células indiferenciadas (sem especialização funcional e marcadores de diferenciação tecido-específicos), com capacidade de proliferação, auto-renovação e plasticidade (capacidade de se diferenciar em vários tipos celulares distintos) (COWAN *et al.*, 2004).

De acordo com esse conceito, uma variedade de tipos celulares têm sido explorados com a finalidade de proporcionar o reparo cardíaco, podendo ser agrupadas em relação à sua origem.

As células-tronco embrionárias (ESC), derivadas da massa interna dos blastocistos de mamíferos (JOHNSON *et al.*, 2004), são uma das candidatas mais promissoras para a terapia celular em cardiopatias. Este tipo celular é capaz de se diferenciar em qualquer tipo celular encontrado nas três camadas germinativas. Assim, podemos obter a partir das ESC cardiomiócitos funcionais e células endoteliais (XU *et al.*, 2002; ABDUL *et al.*, 2009; WINKLER *et al.*, 2005) para serem utilizadas em transplantes clínicos. Entretanto, a utilização deste tipo celular desperta uma grande preocupação para sua utilização clínica, que é a formação de teratomas em modelo animais (LEE *et al.*, 2009).

Outro grande avanço no campo das células-tronco surgiu quando Takahashi e Yamanaka (2006) descobriram que a superexpressão de quatro genes (*Oct 3/4, Sox2, c-Myc,* e *Klf4*) a partir de transduções retrovirais em uma população de fibroblastos de camundongo poderia gerar o aparecimento de algumas células com características de células-tronco embrionárias. Após seleção pela expressão dos quatro genes supracitados, as células-tronco resultantes foram capazes de originar células dos três folhetos embrionários quando transplantadas em embriões hospedeiros imunodeficientes (GURDON e MELTON, 2008). Devido às suas propriedades pluripotentes, estas células foram nomeadas de células de pluripotência induzida (iPSC). Cardiomiócitos funcionais já foram produzidos a partir das iPSC, demonstrando seu potencial, *in vitro e in vivo*, para uma possível terapia cardiovascular, embora persistam preocupações relativas à gênese de tumores (YU *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2009).

Outros tipos de células-tronco com menor plasticidade já foram descritos na literatura, como por exemplo as células-tronco adultas, que estão livres dos riscos de formação de teratomas. As células-tronco adultas são encontradas em diversos tecidos do organismo e organizadas em nichos (SUJATA *et al.*, 2008). Algumas delas já estão sendo utilizadas em ensaios clínicos como, por exemplo, as células-tronco derivadas da medula óssea, cordão umbilical e tecido adiposo (NIH, 2009).

Em 1976, Friedenstein e colaboradores foram os primeiros a descrever a existência de uma célula-tronco adulta não hematopoiética no estroma da medula óssea. Eles observaram que estas células eram aderentes ao frasco de cultura e exibiam um formato fibroblastóide (FRIEDENSTEIN *et al.*, 1976). A partir desse momento, surgiram diversos estudos demonstrando que as células aderentes do estroma da medula óssea são capazes de se diferenciar em várias linhagens celulares (PITTENGER *et al.*, 1999).

Em 1991, Caplan sugeriu que essas células deveriam ser nomeadas como "células-tronco mesenquimais" (MSC) (CAPLAN, 1991). Entretanto, nos últimos anos essa nomenclatura tem sido questionada uma vez que o potencial de autorenovação e diferenciação em múltiplas linhagens, duas características que definem uma célula-tronco, não foi provado ainda para todas as células estromais obtidas apenas por aderência ao plástico (BIANCO, 2008). Neste contexto, a sigla MSC é usada para designar as células-tronco/estromais mesenquimais.

Desde então, outros grupos demonstraram a existência de células com características mesenquimais em diversos tecidos do organismo humano (CAMPAGNOLI *et al.*, 2001), bem como em anexos extra-embrionários (PAPPA e ANAGNOU, 2009; MARCUS e WOODBURY, 2008).
O transplante de células estromais mesenquimais (MSC) é uma abordagem promissora para o tratamento de doenças isquêmicas do coração. Estudos têm demonstrado a capacidade das MSC transplantadas para enxertar e secretar uma grande variedade de fatores parácrinos pró-angiogênicos e pró-sobrevivência (WILLIAMS e HARE, 2011; CHEN *et al.*, 2004; RUAN *et al.*, 2005).

Em 2014, Passipieri *et al.* avaliou a eficácia de células estromais mesenquimais derivadas da placenta, no modelo de rato de infarto do miocárdio. O grupo que recebeu as MSC apresentaram uma melhora na fração de ejeção, após um mês de tratamento, quando comparado ao grupo placebo. Apesar de seus efeitos benéficos, o sinal bioluminescente das MSC desapareceu em 3 dias.

Outro estudo pré-clinico (RICHARDSON *et al.*, 2013) administrou as MSC de medula óssea em duas quantidade diferentes e observaram que ambas reduziram a cavidade ventricular, tanto ao final da diástole quanto ao final da sístole, quando comparado ao grupo controle. Além disso, animais transplantados com a dose mais alta de células, tiveram redução do percentual de fibrose da parede livre do ventrículo esquerdo.

Adicionalmente, Gandia *et al.*, 2008 também demonstrou um efeito benéfico nos animais infartados porém tratados com MSC da polpa de dente, observando diminuição da cicatriz do infarto e o aumento da densidade vascular.

Considerando os ensaios clínicos, Bartunek *et al.* (2013) administraram MSC derivadas da medula óssea, 100 dias após infarto. Seis meses após o tratamento com as células, os autores observaram aumento significativo da fração de ejeção nos pacientes tratados quando comparados aos pacientes que não receberam células. Adicionalmente, o tratamento aumentou significativamente a distância percorrida pelos pacientes.

Já foi observado que o tratamento com as células do estroma cardíaco, por via intracoronariana, aumentou o percentual de massa viável do músculo cardíaco e reduziu a fibrose, após um ano de tratamento (MALLIARAS *et al.*, 2014).

Outro trabalho também demostrou aumento significativo da fração de ejeção ao utilizarem MSC do cordão umbilical (GAO *et al.*, 2015). Entretanto, alguns trabalhos não mostraram alterou desse parâmetro devido ao tratamento com diferentes MSC (RODRIGO *et al.*, 2013; CHULLIKANA *et al.*, 2014; MALLIARAS *et al.*, 2014).

Infelizmente, os benefícios terapêuticos da terapia com MSC parecem ser relativamente modestos e não são observadas em todos os pacientes transplantados. Assim, o desafio de buscar uma nova abordagem, visando o aumento do potencial terapêutico das MSC é claro e urgente.

A baixa relação entre o número de células que sobrevivem e de células transplantadas continua sendo o maior obstáculo da terapia celular. Muitas células transplantadas em áreas isquêmicas morrem, além disso, os efeitos terapêuticos que as células-tronco poderiam exercer são substancialmente reduzidos (TOMA *et al.*, 2002). Inúmeras razões podem explicar esse fato, incluindo a resposta inflamatória do hospedeiro, a lesão mecânica, a isquemia reduzindo o aporte de sangue, bem como a ativação de receptores de morte. Além disso, a integridade dessas células-tronco depende da adesão célula-célula e célula-matriz, a qual pode ser inibida pelas espécies reativas de oxigênio geradas na região isquêmica após o infarto do miocárdio (SONG *et al.*, 2010), culminando ou não em morte celular.

Estudos desenvolvidos por Valle-Prieto e colaboradores, em 2010, mostrou a capacidade das células estromais mesenquimais derivadas da medula óssea de manejar o estresse oxidativo *in vitro*. Os autores observaram que elas apresentavam elevada expressão de glutationa peroxidase, e por consequência exibiam alta resistência à morte induzida pelo peróxido de hidrogênio quando comparadas aos fibroblastos dermais humanos. Uma vez que a GPX era depletada, a viabilidade celular era significativamente reduzida.

Entretanto, outro estudo demonstrou que as MSC de medula óssea, quando tratadas com baixas doses de H_2O_2 (20 μ M) *in vitro*, reduziam significativamente a adesão, o espraiamento celular e a expressão de moléculas relacionadas à adesão focal e integrinas. Além disso, quando essas MSC foram injetadas *in vivo*, em modelo de infarto do miocárdio, sobreviveram por pouco tempo no tecido cardíaco, diferentemente do que aconteceu quando foi administrado um antioxidante juntamente com as células (SONG *et al.*, 2010).

Considerando então que as ERO geradas podem induzir morte celular nas células transplantadas, torna-se indispensável a busca por células resistentes ao estresse oxidativo, as quais consigam sobreviver melhor neste ambiente hostil para que possam se diferenciar ou, pelo efeito parácrino, estimular a recuperação do tecido lesado.

Diante desse panorama, o sangue menstrual constitui uma fonte de células estromais mesenquimais amplamente disponíveis e pode ser facilmente obtida (CUI et al, 2007; MENG et al, 2007; PATEL et al 2008; HIDA et al, 2008; ZHONG et al, 2009; BORLONGAN et al, 2010). Além disso, uma característica notável destas células é que elas sobrevivem ao processo de intensa isquemia e reperfusão sofrido pelo endométrio durante o ciclo menstrual, o que sugere resistência ao EO. O fenômeno da menstruação é iniciado a partir da redução brusca das concentrações estrogênio e progesterona, com uma fase isquêmica. Nesta fase, as artérias espiraladas e as arteríolas vasocontraem, 4 a 24 horas antes do início do sangramento. Em seguida, há o relaxamento desses vasos e reperfusão do endométrio, gerando uma lesão por isquemia e reperfusão e uma maciça infiltração de leucócitos. Logo, ocorre um remodelamento da matriz endometrial, com formação de hematomas, apoptose e necrose celular, aumento do estresse oxidativo tecidual levando ao descolamento e fragmentação do tecido (MELMED et al, 2011). Sendo assim, essas MSC sobrevivem a esse fenômeno já que elas reconstituem todo o endométrio mensalmente, bem como as que foram obtidas a partir do sangue menstrual crescem normalmente em cultura. Entretanto, ainda há possibilidade que essas células sejam de origem perivascular in vivo.

De fato, já foi demonstrado que as células estromais mesenquimais derivadas do sangue mestrual (CeSaM) sobrevivem a altas concentrações de peróxido de hidrogênio *in vitro*. Adicionalmente, apresentam elevada atividade das enzimas antioxidantes em comparação com as células-tronco embrionárias e as células-tronco pluripotentes induzidas geradas a partir CeSaM (ASENSI *et al.*, 2014). Além disso, já foi demonstrado que as CeSaM apresentam efeitos promissores em alguns modelos pré-clínicos que apresentam aumento do estresse oxidativo devido à elevada produção de ERO, tais como: infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, isquemia de membro e diabetes.

Utilizando o modelo de infarto do miocárdio já foi demonstrado que as células derivadas do sangue menstrual tinham um forte potencial cardiomiogênico para se transdiferenciarem *in vitro* e *in vivo*. *In vivo*, as CeSaM transplantadas em ratos submetidos ao infarto restauraram a função cardíaca, reduzindo a área infartada (HIDA *et al., 2008*). Assim, foi demonstrado um possível benefício terapêutico que essas células poderiam exercer no tratamento de doenças isquêmicas do coração.

No mesmo ano, o grupo de Murphy administrou as CeSaM pela via intramuscular em camundongos imunocompetentes imediatamente após a ligação da artéria femoral para indução da isquemia do membro. A injeção dessas células foi realizada por mais dois dias, logo abaixo da ligadura da artéria, resultando na preservação do membro íntegro nos animais tratados, enquanto que os controles evoluíram para a necrose do membro (MURPHY *et al.*, 2008). Este dado sugere a possibilidade de as CeSaM estimularem a angiogênese que é um fenômeno importante para atuar na sobrevivência dos cardiomiócitos que estão localizados na região que sofreu isquemia no coração.

Considerando as doenças neurodegenerativas, Borlongan e cols (2010) utilizaram um modelo de acidente vascular cerebral isquêmico *in vivo* e observaram aumento da sobrevivência das células neurais e melhora comportamental dos animais, quando CeSaM foram transplantadas 2 horas após a lesão. Adicionalmente, mostraram que células transplantadas ainda estavam presentes na área de penumbra após 14 dias.

Em 2014, foi demonstrado por Wu e colaboradores que as CeSaM reverteram a hiperglicemia, o peso corporal, prolongaram o tempo de vida, aumentaram a produção de insulina em ratos diabéticos, bem como recuperaram estruturas de ilhotas e estimularam a regeneração das células β endógenas.

Existem poucos trabalhos na literatura que envolvem as células estromais mesenquimais derivadas do sangue menstrual, principalmente avaliando seu potencial terapêutico *in vivo*, e os que estão descritos não avaliaram o mecanismo pelo qual estas células apresentaram o efeito benéfico. Portanto, é necessário que mais estudos de grupos independentes sejam feitos com este tipo celular para comprovar a sua eficácia, benefício terapêutico e mecanismo de ação.

1.8. Hipótese do trabalho

Diante deste cenário, a hipótese deste trabalho é que as CeSaM podem ser resistentes ao estresse oxidativo gerado durante o processo de isquemia e reperfusão miocárdica, uma vez que estas células são provenientes de um ambiente submetido à intensa necrose e reperfusão.

Adicionalmente, durante o meu mestrado comprovei que as CeSaM apresentam elevada sobrevivência e aderência na presença de altas concentrações de peróxido de hidrogênio. Também observamos grande atividade das enzimas antioxidantes, além da manutenção dos mesmos níveis de ERO intracelulares na presença de H2O2 exógeno. Com essas informações em mãos, os desafios propostos na minha tese de doutorado foram divididos em duas partes. A primeira consistiu em avaliar o impacto do ambiente isquêmico na adesão, viabilidade, proliferação e potencial antioxidade das CeSaM, mediante a privação de soro e oxigênio. Já a segunda parte deste trabalho consiste em estudar o efeito das CeSaM, quando injetadas no infarto do miocárdio, já que neste modelo de doença ocorre elevação do estresse oxidativo. Julgamos que essas células, por serem mais resistentes e possuírem uma maior defesa antioxidante, sejam capazes de sobreviver no ambiente hostil do infarto, exercendo por mais tempo o seu efeito parácrino, aumentando as chances de sobrevivência dos cardiomiócitos remanescentes, estimulando a recuperação do miocárdio que sofreu lesão por isquemia e reperfusão. A terapia celular será realizada, por via intramiocárdica, quando ocorrer a maior produção de ERO após a isquemia e reperfusão da artéria coronária esquerda. Assim, saberemos se essas células são capazes de diminuir essa produção de ERO, bem como modular a defesa antioxidante, reduzindo o dano às células locais.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Levando-se em consideração a importância mundial das doenças isquêmicas e de suas alternativas terapêuticas para a população geral, tanto no aspecto de saúde pública quanto no seu impacto econômico, e considerando as perspectivas recentes de emprego da terapia celular, o presente trabalho tem como objetivos principais:

- Avaliar o efeito da privação de soro e redução das concentrações de oxigênio nas células estromais mesenquimais derivadas do sangue menstrual (CeSaM) como forma de mimetizar os efeitos da isquemia *in vitro*.
- Estudar o impacto do transplante de células estromais mesenquimais derivadas do sangue menstrual no modelo de infarto do miocárdio por isquemia e reperfusão em ratos.

2.2. Objetivos Específicos Parte I:

Expor as CeSaM a diferentes condições de concentração de oxigênio e privação de soro e avaliar:

2.2.1. A adesão celular;

2.2.2. A susceptibilidade à morte por meio da quantificação da viabilidade celular;

2.2.3. A presença de células apoptóticas;

2.2.4. As fases do ciclo celular;

2.2.5. A atividade das enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase e glutationa peroxidase.

2.3. Objetivos Específicos Parte II

2.3.1. Reproduzir o modelo de infarto do miocárdio por isquemia e reperfusão em ratos.

2.3.2. Analisar a produção de espécies reativas de oxigênio ao longo de diferentes tempos após isquemia e reperfusão.

2.3.3. Em animais infartados tratados ou não com as CeSaM, analisar:

2.3.3.1. Os níveis de RNA mensageiro para as diferentes NADPH oxidases nos corações;

2.3.3.2. O efeito da terapia celular na produção de espécies reativas de oxigênio no coração;

2.3.3.3. Os níveis de RNA mensageiro para as diferentes enzimas antioxidantes nos corações;

2.3.3.4 O efeito da terapia celular na atividade das enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase e glutationa peroxidase nos corações.

3. Materiais e Métodos

3.1. Isolamento e cultivo das células estromais mesenquimais derivadas do sangue menstrual

3.1.1. Coleta das células humanas derivadas do sangue menstrual

O protocolo abaixo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF), sob o número de registro 056/09 (Anexo A).

O sangue menstrual foi coletado de jovens voluntárias saudáveis (n=12), com idade entre 18 e 32 anos, no dia de maior fluxo menstrual, geralmente 24 horas após início da menstruação. Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), as voluntárias receberam instruções quanto ao procedimento de coleta. A coleta foi feita em um coletor de urina contendo 5 mL de uma solução salina sem cálcio e magnésio, suplementada com penicilina 100 IU/mL e estreptomicina 100 mg/mL para evitar contaminação bacteriana.

Os critérios de exclusão da pesquisa foram: mulheres com histórico de qualquer enfermidade ou que já estão na menopausa.

3.1.2. Isolamento e cultivo das células aderentes presentes no sangue menstrual

O material coletado foi diluído em solução salina tamponada com fosfato (PBS) de sódio e potássio, na proporção 1:2, homogeneizado e centrifugado 300 x g por 5 minutos. O sedimento de células foi ressuspendido novamente em PBS e centrifugado a 300 x g durante 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado, as células foram contadas em câmara de Neubauer (Hausser Scientific) e a viabilidade foi analisada com azul de Trypan 0,4% (Trypan Blue, Sigma-Aldrich). Por fim, as células obtidas após as lavagens foram ressuspendidas em DMEM-High Glicose (4,5 g/L) suplementado com 20% de soro fetal bovino (Gibco), 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich), antibióticos (penicilina 50 U/mL e estreptomicina 50 µg/mL - Gibco) e plaqueadas em placas de cultura de 35 mm.

Após o plaqueamento, as culturas foram mantidas em estufa a 37ºC, com atmosfera úmida, na presença de 5% de CO₂ e 21% de O₂, caracterizando um

cultivo em normóxia. A primeira troca do meio de cultura ocorreu dois dias após o plaqueamento. As células e debris celulares que ainda estavam no sobrenadante foram descartados.

O meio de cultura foi trocado regularmente de acordo com o consumo dos nutrientes pelas células, ocorrendo, geralmente, duas vezes por semana. Quando as culturas atingiram a confluência de área de 80%, foram dissociadas com solução de tripsina-EDTA 0,25% (Gibco) e expandidas. As culturas foram acompanhadas periodicamente para observação da morfologia, confluência celular e possíveis contaminações. Todos os experimentos a seguir foram realizados entre a 4ª e 5ª passagens.

Os experimentos *in vitro* a seguir foram realizados na presença e na ausência de soro, bem como em diferentes concentrações de oxigênio (21%, 5% e 1%), por 48 horas e 7 dias, totalizando 12 condições de cultivo diferentes por amostra (Figura 1).



Figura 1: Protocolo experimental *in vitro* (Parte I): A fim de mimetizar o ambiente isquêmico, as CeSaM foram cultivadas na ausência ou presença de 20% de soro e em concentrações normais (21%) ou reduzidas de oxigênio (hipóxia 5% e 1%), por 48 horas e 7 dias.

3.2. Ensaio de adesão celular

A metodologia adotada para a realização desse experimento foi a mesma descrita por Asensi e colaboradores (2014). Para tal, as CeSaM foram dissociadas, contadas e 1x10⁵ células foram replaqueadas, em triplicata. Após 2 horas, 48 horas e 7 dias de cultivo a 37°C, as células cultivadas com e sem soro, nas diferentes concentrações de O₂, foram lavadas três vezes com PBS e fixadas com etanol. Depois da fixação, as células foram coradas com cristal violeta 0,05% (w/v) diluído em metanol. Alíquotas de 150 µL foram transferidas para uma placa de 96 poços e a

absorbância mensurada em 570 nm (A570) usando o leitor de microplacas Victor[™]X5. A absorbância é diretamente proporcional à quantidade de células aderidas no momento da fixação. Logo, a adesão celular corresponde a razão entre A570 na condição experimental e na condição controle (normóxia com soro) multiplicado por 100.

3.3. Viabilidade Celular com azul de Trypan

Após o cultivo nas diferentes condições de oxigênio e soro, por 48 horas e 7 dias, as CeSaM no sobrenadante foram descartadas e as aderentes foram retiradas da placa com a tripsina-EDTA 0,25% (Sigma). O teste de viabilidade por exclusão das células coradas foi realizado com azul de Trypan 0,4%. As células foram contadas no microscópio em câmara de Neubauer (Hausser Scientific) após a diluição 1:1 no corante citado.

3.4. Ensaio de Apoptose: Anexina V e 7AAD

Neste ensaio, foi utilizado o protocolo e o Kit de Anexina V PE (BD Pharmingen, catálogo 559763). A marcação com Anexina V-PE e 7-aminoactinomicina D (7-AAD) permite identificar e quantificar as células viáveis (anexina V-/ 7-ADD-), as células apoptóticas em estágio inicial (anexina V+/ 7-ADD-) e as células apoptóticas em estágio final ou céulas mortas (anexina V+/ 7-ADD+).

A fim de quantificar o percentual de células apoptóticas, após o cultivo nas diferentes condições de oxigênio e soro, por 48 horas e 7 dias, as células não aderentes foram descartadas e as aderentes foram tripsinizadas, lavadas e centrifugadas 300 x g por 5 minutos. Para cada situação, $3x10^5$ células obtidas foram ressuspendidas em 300 µL de tampão de ligação e divididas da seguinte forma: $1x10^5$ CeSaM não foram marcadas (Branco), $1x10^5$ CeSaM foram marcadas somente com 5 µL de Anexina V-PE e, por fim, $1x10^5$ CeSaM foram marcadas com 5 µL de 7-AAD e 5 µL de Anexina V-PE durante 20 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, mais 300 µL de tampão de ligação foram adicionados à cada condição de marcação e as células foram analisadas em até uma hora.

A aquisição das células (50000 eventos) foi realizada no citômetro de fluxo BD Accuri C6 (BD Biosciences). Os detectores *forward scatter* (FSC) e *side scatter* (SSC) foram colocados em escala linear, enquanto os detectores de fluorescência FL-2 e FL-3 foram colocados em escala logarítmica. Para cada experimento, foram efetuadas as compensações necessárias. Após a aquisição, a análise dos resultados obtidos foi realizada usando o software Flow Jo 4.1.

3.5. Ensaio de Ciclo Celular: lodeto de Propídeo

Após o cultivo nas diferentes condições de oxigênio e soro, por 48 horas e 7 dias, as CeSaM foram retiradas da placa com a tripsina-EDTA 0,25% (Sigma). Em seguida, 10^5 células foram incubadas e permebilizadas por 20 minutos em temperatura ambiente em uma solução com Triton X-100 0,1%, 10 µg/mL de RNAse A (Sigma-Aldrich) e 50 µg/mL de iodeto de propídeo (Sigma-Aldrich). A RNAse A cliva as moléculas de RNA presentes na célula, permitindo assim que a fluorescência obtida seja devida somente ao DNA.

A aquisição das células (50000 eventos) foi realizada no citômetro de fluxo BD Accuri C6 (BD BIOSCIENCES). Os detectores *forward scatter* (FSC), *side scatter* (SSC) foram colocados em escala linear, enquanto os detectores de fluorescência FL-2 e FL-3 foram colocados em escala logarítmica. Para cada experimento, foram efetuadas as compensações necessárias. Após a aquisição, a análise dos resultados obtidos foi realizada usando o software Flow Jo 4.1. Inicialmente, os eventos foram selecionados no gráfico FL2-H (em escala logarítmica) x FL2-A (em escala linear) e, em seguida, avaliados em um histograma que analisou o canal FL2-A (em escala linear) pelo número de eventos. O cálculo do número de células em cada uma das fases do ciclo celular foi realizado pelo próprio programa de análise, a partir do gráfico de histograma, utilizando o teste Dean-Jett-Fox.

3.6. Atividade das enzimas antioxidantes

3.6.1. Preparação do homogenato

Em torno de 30 mg de tecido ou 3x10⁶ células foram lisados com tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,6) contendo: EDTA 5 mM; ditiotreitol (DTT) 0,01 mM; aprotinina 0,01 mg/mL e Fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 0,2 mM, para lise celular e preservação das proteínas. O homogenato foi centrifugado a 3000 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e utilizado para a medida das atividades enzimáticas no espectrofotômetro UV/VIS Lambda 35 (Perkin Elmer). O conteúdo de proteína foi determinado pelo método de Bradford (Bradford, 1976) no leitor Victor[™]X5.

3.6.2. Determinação da Atividade da Catalase

A atividade da catalase foi mensurada através do desaparecimento do peróxido de hidrogênio (H₂O₂), formando água e oxigênio, conforme descrito por Aebi (1984). O controle experimental consiste na avaliação da diminuição da absorção de luz em 240 nm do meio de reação (tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0; Triton X-100 0,002%; EDTA 0,1 mM; peróxido de hidrogênio 15 mM, o volume final da reação foi de 1 mL) durante cerca de 1 minuto. Em seguida, foram adicionados cerca de 30 mg do homogenato celular e a absorção de luz continuou sendo acompanhada por mais 2 minutos. A atividade da catalase foi obtida através da diferença entre a taxa de diminuição da absorbância com e sem homogenato. A atividade foi calculada através da quantidade de H₂O₂ consumido por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar do H₂O₂ (43,6 M⁻¹.cm⁻¹). A atividade da enzima foi expressa em unidades (µmols de H₂O₂ consumido por minuto) por miligrama de proteína.

3.6.3. Determinação da atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade total da SOD foi determinada conforme o método descrito por Crapo *et al*, 1977. Neste método, o superóxido (O₂•-) gerado a partir de um sistema xantina-xantina oxidase (X-XO) reduz o citocromo C, gerando um aumento na absorção de luz em 550 nm. A adição de um homogenato contendo SOD dismuta o O₂•⁻ em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) impedindo que o citocromo C seja reduzido. O meio de reação foi composto por tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 8,0) contendo: EDTA 0,1 mM; cianeto de potássio 0,01 mM; citocromo C 0,02 mM e xantina 0,05 mM, o volume final da reação foi de 1 mL. A reação do controle foi disparada adicionando xantina oxidase (concentração final de 8 mU/mL) ao meio de reação, avaliando a redução do citocromo C através do aumento da absorção de luz em 550 nm por cerca de 2 minutos. Em seguida, foram adicionados cerca de 60 µg de proteína do homogenato celular e a redução do citocromo C continuou sendo mensurada por mais 2 minutos. A atividade da SOD foi obtida através da diferença da diminuição da redução de citocromo C, observada quando o homogenato é adicionado ao sistema X-XO. A diminuição de 50% da taxa de redução do citocromo C representa uma unidade de SOD. A atividade total da SOD foi expressa em unidades por miligrama de proteína.

3.6.4. Determinação da Atividade da Glutationa Peroxidase (GPX)

A atividade da GPX foi mensurada conforme o método descrito por Flohé e Günzler (1984). Neste método, a GPX converte o tert-butil hidroperóxido em água, oxidando a glutationa reduzida (GSH) em glutationa oxidada (GSSG). A GSSG é reduzida a GSH pela enzima glutationa redutase (GR), às custas da oxidação do NADPH em NADP.

A diminuição da absorção de luz em 340 nm, promovida pela oxidação do NADPH, foi avaliada durante 3 minutos a 37 °C no meio de reação, que serviu como controle do experimento (composição do meio de reação: tampão fosfato de potássio 100 mM; EDTA 1 mM (pH 7,0); NADPH 0,15 mM, glutationa reduzida 0,5 mM, GR 240 mU/ml e tert-butyl hidroperóxido 1,2 mM, o volume de cada reação foi 1 mL). Em seguida, foram adicionados 60 µg de homogenato celular e a oxidação do NADPH continuou sendo monitorada por mais 3 minutos. A atividade da GPx foi calculada subtraindo a taxa de oxidação do NADPH obtida com e sem homogenato (através de regressão linear). O coeficiente de extinção milimolar do NADPH (6,22 mM⁻¹) foi utilizado na determinação da atividade da GPX e esta foi expressa em unidades por miligrama de proteína. Uma unidade representará 1 µmol de NADPH oxidado por minuto.

3.7. Animais Experimentais

O estudo foi realizado utilizando fêmeas da espécie *Rattus norvegicus* da linhagem *Wistar* com 10 semanas de idade, pesando entre 200 g e 250 g, obtidos do Biotério Multiusuário de Pequenos Roedores alocado no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – UFRJ. Os animais foram mantidos no biotério em ambiente com temperatura controlada (23°C) e exposição diária a um ciclo claro-escuro de 12 em 12 horas sem restrição de água e ração.

Este estudo foi realizado em conformidade com o Guia de Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (DHHS Publicação No. (NIH) 85-23, revisado em 1996, Office of Science and Health Reports, Bethesda, MD 20892) e aprovado pela Comissão de Ética de Uso de Animais em Experimentação Científica (Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro) sob o número de referência IBCCF 022/14 (Anexo B).

Os grupos experimentais foram montados de acordo com os diferentes objetivos deste trabalho e encontram-se definidos abaixo:

- Grupo Sham: falso-operado. Submetidos ao procedimento cirúrgico sem a ligadura da artéria coronária descendente anterior e não receberam tratamento com células ou veículo.
- Grupo INF-Placebo: infartado tratado com veículo (40 μL de soro fisiológico, contendo 25% de matrigel administrados por via intramiocárdica).
- Grupo INF-CeSaM: infartado e tratado com células estromais mesenquimais derivadas do sangue menstrual (40 µL de soro fisiológico, contendo 25% de matrigel e 5x10⁵ CeSaM administrados por via intramiocárdica).

3.8. Desenho do estudo in vivo

O estudo *in vivo* foi dividido em 3 etapas: a primeira etapa visou estabelecer o modelo de isquemia e reperfusão em ratos por oclusão transitória da artéria coronária descendente anterior (Figura 2A). Em seguida, a segunda etapa avaliou a produção de espécies reativas de oxigênio em diferentes tempos após isquemia e reperfusão, definindo quando ocorre a maior produção de ERO (Figura 2B).

Por fim, na terceira etapa, as CeSaM foram injetadas tanto na borda quanto na região infartada do miocárdio no momento em foi observado a maior produção de ERO. Duas e 24 horas depois os animais foram eutanasiados e o coração removido para análise da produção das espécies reativas de oxigênio, bem como para avaliação da atividade antioxidante (Figura 2C).

(A) 1ª Etapa da Parte II: Estabelecimento do Modelo de Isquemia e Reperfusão em Ratos.



(B)

2ª Etapa da Parte II: Avaliação do ponto de maior produção de ERO pós Isquemia e Reperfusão.





3ª Etapa da Parte II: Terapia Celular: Impacto sobre produção de ERO e defesa antioxidante.

CEUA-CSS: 022/14

(C)

Figura 2. Etapas do protocolo experimental *in vivo* (Parte II): O estudo iniciou-se com o estabelecimento do modelo de indução de infarto por isquemia e reperfusão (A), seguido da avaliação do tempo pós reperfusão com maior produção ERO (B). Por fim, foi realizada a terapia celular a fim de analisar o seu impacto sobre a produção e remoção de ERO no tecido cardíaco (C). ECG - eletrocardiograma, ECO – ecocardiograma, Anti Oxi – enzimas antioxidantes.

3.9. Procedimento cirúrgico para realização do infarto do miocárdio em ratos

O procedimento de infarto do miocárdio foi realizado a partir de modificações de dois diferentes protocolos (PASSIPIERI *et al.*, 2014; KLOCKE *et al.*, 2007).

Inicialmente, o animal foi anestesiado, por via intraperitoneal, utilizando-se cloridrato de xilasina (Syntec), na dose de 20 mg/kg e cloridrato de quetamina (Syntec), na dose de 80 mg/kg. Após a perda do reflexo postural, este foi fixado na mesa cirúrgica em decúbito dorsal.

Em seguida, o animal foi submetido a incisão de 1 cm acima da fúrcula esternal e as estruturas anatômicas foram divulsionadas a fim de acessar a traquéia. Utilizando jelco de calibre 16G (Solidor), a região acima da cartilagem cricotireóide foi puncionada, possiblitando o acoplamento ao ventilador mecânico (Harvard

Apparatus; Holliston, MA), cujo volume corrente aplicado foi de 2,5 mL e frequência de 90 até 100 incursões respiratórias por minuto.

O acesso à cavidade torácica foi realizado na região paraesternal na altura do 4º espaço intercostal esquerdo. Após divulsionar a musculatura torácica, que inclui os músculos peitoral maior e menor, o 4º e 5º espaços intercostais à esquerda foram visualizados. Com auxílio de uma tesoura, o acesso foi realizado acima do espaço intercostal em que se observou o ictus cordis, região da parede torácica em que se pode palpar o batimento do coração. A região da incisão foi alargada de forma a visualizar o coração. Para externalização do coração, um fio prolene 6-0 foi passado pelo ápice do coração. A oclusão temporária foi feita mediante a instalação de um ponto cirúrgico sobre uma cânula de polietileno (PE10) na artéria descendente anterior, ligada na altura da junção átrio-ventricular com fio prolene 6-0, o que facilitou a remoção da sutura após 90 minutos de isquemia. O tempo de isquemia foi escolhido baseado em resultados prévios do laboratório (ESPORCATTE et al., 2010) que observaram que as alterações teciduais acarretaram em disfunção cardíaca. Em seguida, a musculatura peitoral foi suturada com o ponto chuleio simples e o acesso da pele fechado com o ponto "boca de saco" previamente preparado. O suporte ventilatório foi retirado entre 1 a 5 minutos após a cirurgia.

3.10. Eletrocardiograma (ECG)

O eletrocardiograma foi realizado a partir do protocolo descrito por Passipieri e colaboradores (2014).

As avaliações eletrocardiográficas foram realizadas na derivação bipolar D1, uma ou 24 horas após a intervenção cirúrgica, com o animal fora ou dentro do plano anestésico, dependendo grupo experimental (estabelecimento do modelo ou análise de produção de ERO e terapia celular). Para realização dessa derivação implantamos três eletrodos de aço inoxidável no tecido subcutâneo dos animais, em três regiões distintas: na região glútea esquerda, linha axilar média esquerda (pólo positivo) e linha axilar média direita (Pólo negativo) com o auxílio de uma agulha de 21G (Descarpack). Logo, a partir desta distribuição dos eletrodos forma-se um triângulo (conhecido como triângulo de Einthoven) que é o número mínimo de pontos de aquisição para ser possível obter o sinal ECG.

O eletrocardiograma foi realizado utilizando o aparelho Axon CNS Digidata 1440A da Molecular Devices, calibrado para a velocidade de 50 mm/s e voltagem de 1 mV (20 mm). As análises foram efetuadas através do programa LabChart7 (ADInstruments) e Clampfit 10.2 (Molecular Devices).

3.11. Ecocardiografia (ECO)

Os ecocardiogramas foram realizados 28 dias após o infarto do miocárdio por isquemia e reperfusão a partir do protocolo descrito por Passipieri e colaboradores (2014), a fim de caracterizar o modelo. Os animais foram fixados à plataforma após a perda do reflexo postural no aparelho VEVO 770 (VisualSonics). A análise ecocardiográfica foi realizada sob anestesia com isoflurano 1,5% (Cristália[®]) e 100% de O₂. Na região precordial, foi realizada uma tricotomia da objetivando melhorar a janela acústica. Em seguida, foi aplicado o gel de ultra-som (Carbogel[®]) para estabelecer o acoplamento acústico entre o transdutor e o tecido cardíaco, além de manter o foco do feixe ultrassônico na profundidade desejada, a fim de obter imagens com boa resolução.

O exame foi realizado utilizando um transdutor de 17,5 MHz. A frequência cardíaca (FC) foi monitorada com ECG contínuo, sendo o exame realizado entre 300 e 350 batimentos por minutos (bpm).

As imagens do eixo longo do coração foram obtidas com o transdutor posicionado na região paraesternal com uma angulação de 45° em relação ao esterno. O eixo longo compreende a distância entre a via de saída da aorta e o ápice do coração.

Para a obtenção das imagens de eixo curto, iniciando-se da base do coração e seguindo em direção ao ápice do órgão, o transdutor foi posicionado transversalmente ao tórax na região paraesternal, permitindo a captação das imagens nas posições 1, 2, 3 e 4. A imagem referente ao eixo curto 1 incluiu o ventrículo esquerdo (paredes anterior e posterior), parede septal interventricular e parte do ventrículo direito, como referência utilizamos a válvula mitral. Com relação ao eixo curto 2, a visualização dos músculos papilares foi utilizada como orientação. A aquisição do eixo curto 3 foi realizada posicionando-se o transdutor logo abaixo do eixo curto 2, próximo à ponta do coração. A imagem do eixo curto 4 compreendeu a porção mais distal do órgão.

Os parâmetros avaliados compreenderam análise da anatomia cardíaca e da função sistólica do ventrículo esquerdo (VE). O mesmo operador realizou todos os

exames em um mesmo dia, desconhecendo os grupos experimentais aos quais os animais pertenciam.

As medidas de volume diastólico final (VDF), volume sistólico final (VSF), débito sistólico (DS) e fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FE) foram realizadas em modo bidimensional pelo método de Simpson.

3.12. Técnica de Langendorff

Para a realização do estudo em corações isolados foi utilizado o protocolo descrito por Bell e colaboradores (2011). Para tal, os animais foram heparinizados com injeção intraperitoneal (5 UI/g de peso do animal) e sacrificados por inalação de CO₂ seguida de deslocamento cervical. Os corações foram removidos rapidamente e colocados em solução salina fisiológica [Krebs- Henseleit (KHB): NaCl 118 mM, KCl 4,7 mM, NaHCO₃ 25 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, MgSO₄ 1,2 mM, glicose 11 mM, e CaCl₂ 1,25 mM]. A fim de se obter uma solução de KHB oxigenada e com pH em 7,4, essa foi aquecida a 37°C e saturada com mistura gasosa carbogênica (95% O₂ / 5% CO₂).

Sequencialmente, a artéria aorta ascendente foi canulada e conectada a um Sistema de *Langendorff* modificado. Após a canulação, os corações foram mantidos imersos em solução KHB no interior de um recipiente.

A perfusão do coração isolado com solução KHB a um fluxo constante de 10 mL/min, mantido por uma bomba peristáltica (Gilson Minipuls 3, Villiers le Bel, France), preservou a função mecânica do orgão. A perfusão iniciada pela artéria aorta chega à rede coronariana uma vez que folhetos da válvula aórtica estão fechados, em função do fluxo retrógrado. A drenagem do fluxo foi feita através da artéria pulmonar seccionada.

Um pequeno balão de látex conectado por uma cânula a um transdutor de pressão foi inserido no ventrículo esquerdo através do átrio esquerdo. O volume do balão, preenchido com água, foi ajustado para uma pressão diastólica inicial de 0 mmHg. O transdutor conectado a um amplificador ML110 (ADInstruments) permitia o registro da pressão intraventricular esquerda. A cada 2 minutos, foram acrescidos ao balão 20 µL de água e os registros de pressão sistólica e diastólica foram digitalizados através de uma interface analógico-digital (PowerLab 400, ADInstruments) e armazenados em computador para posterior análise com o programa LabChart7 (ADInstruments).

A fim de analisar estatisticamente os dados funcionais obtidos através da técnica de *Langendorff*, calculou-se a integral da curva de pressão vs. volume que corresponde à área sob a curva, por meio do programa MATLAB 7.0. Os valores de volume foram padronizados para variar de 0 a 1 para todos os animais e os valores de pressão foram mantidos.

3.13. Preparação histológica

Ao final do protocolo experimental os animais foram eutanasiados e seus corações foram parados em diástole, com a infusão de cloreto de potássio (40 mM). O coração foi cortado transversalmente em duas porções (base e ápice) e foi fixado com uma solução de paraformaldeído 4%. Em seguida, o tecido foi emblocado em parafina, cortada em micrótomo (6 µm) e corado com picrosírius para avaliação da fibrose na área infartada.

3.14. Morfometria

A coloração de picrosírius foi utilizada para marcar as fibras colágenas viabilizando a delimitação da cicatriz fibrótica.

As lâminas coradas foram digitalizadas com resolução de 2400 pixels e analisadas no programa *Image-Pro Plus 7.0.1*. A coloração da área infartada foi quantificada, assim como a área total do ventrículo esquerdo na seção transversal analisada. Desta forma, o percentual de área de infarto pode ser calculado. As análises foram realizadas desconsiderando a parede livre do ventrículo direito.

3.15. Preparação do homogenato do tecido cardíaco para posterior avaliação da produção de ERO

A fim de quantificar a produção de ERO, a borda do infarto e área infartada foram homogeneizadas com o auxílio do Tissue Ruptor (Qiagen), em 1,5 mL de tampão H [tampão fosfato de sódio 50 mM; pH 7,2 contendo sacarose 0,25 M; ditiotreitol 0,1 mM; EGTA 1 mM; aprotinina 0,01 mg/mL e fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 0,2 mM]. O homogenato foi centrifugado a 3000 x g, por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e centrifugado novamente a 46000 rpm (aproximadamente 100000 x g) por 35 minutos a 4°C na ultracentrífuga Optima XE-90 (Beckman Coulter, USA), utilizando o rotor 70 Ti (Beckman Coulter). O precipitado foi ressuspenso em 1,5 mL de tampão A2 (tampão fosfato de sódio 50 mM; pH 7,2, contendo sacarose 0,25 M; MgCl₂ 1 mM; aprotinina 0,01 mg/mL e PMSF 0,2 mM) e centrifugado novamente como da última vez. O precipitado foi ressuspenso em 300 µL de tampão A2 e as amostras obtidas foram armazenadas a -70°C para posterior medida da atividade de geração de H₂O₂.

3.16. Dosagem da atividade geradora de H₂O₂

A geração de H_2O_2 foi quantificada pelo método Amplex Red / HRP (Molecular Probes), que detecta o acúmulo de produtos oxidados fluorescentes. As frações particuladas dos tecidos foram incubadas com tampão fosfato de sódio 0,3 M, pH 7,2; EGTA 1 mM, superóxido dismutase (100 U/mL; Sigma), peroxidase de raiz forte (0,5 U/mL; Roche), Amplex red (50 μ M; Molecular Probes), NADPH (1 mM; Sigma), na ausência de cloreto de cálcio e a fluorescência emitida foi medida imediatamente no leitor de microplacas (VictorX5, Perkin Elmer) utilizando os comprimentos de onda de excitação em 530 nm e emissão em 595 nm. Para determinação da atividade específica das NADPH oxidases, a atividade geradora de H₂O₂ obtida na presença de NADPH foi subtraída da atividade na ausência de proteína na amostra (FORTUNATO *et al*, 2010).

3.17. Viabilidade e injeção das CeSaM

No dia da injeção intramiocárdica, as CeSaM foram removidas da placa com a tripsina-EDTA 0,25% (Sigma). Uma alíquota foi separada para o teste de viabilidade por exclusão das células coradas com azul de Trypan. Em cada animal experimental, foram administradas 5x10⁵ CeSaM na borda do infarto e na área infartada. As células foram ressuspensas em uma mistura de soro fisiológico estéril com 25% de Matrigel[™] Matrix (Corning Life Sciences) e injetadas com auxílio de uma seringa de insulina com agulha de 30G (Becton Dickinson) em um volume final de 40 µL em cada região.

3.18. Níveis de RNA mensageiro das NADPH oxidases e enzimas antioxidantes

3.18.1. Extração do RNA total

O ácido ribonucleico (RNA) total do tecido cardíaco foi extraído utilizando o kit RNeasy Fibrous Tissue (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente, 15 - 30 mg de tecido foram lisados e homogeneizados em tampão desnaturante e o lisado foi filtrado, centrifugado e aplicado em uma microcoluna contendo uma membrana de sílica. A coluna foi lavada 3 vezes, com posterior eluição do RNA com água livre de RNAse.

Em seguida, o RNA total foi quantificado por espectrofotometria no aparelho NanoDrop (Thermo Scientific), através da mensuração da absorbância no comprimento de onda de 260 nm (A₂₆₀). As relações A₂₆₀:A₂₈₀ e A₂₆₀:A₂₃₀ também foram obtidas e indicam a pureza do RNA. As relações A₂₆₀:A₂₈₀ entre 1,9 e 2,1 e a relação A₂₆₀:A₂₃₀ entre 1.9 e 2,2 foram consideradas ideais, uma vez que razões abaixo desses valores sugerem presença de contaminantes, tais como proteínas ou fenóis. Por fim, as amostras foram armazenadas a -70°C.

3.18.2. Reação da Transcrição Reversa

O cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA total por reação de transcrição reversa, utilizando o kit *High-capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante. Além disso, cada amostra teve um RT- correspondente, sem a enzima transcriptase reversa, os quais foram incluídos para verificar eventuais contaminações por DNA genômico. Ao final da reação, o cDNA foi estocado em freezer -20°C até o momento do ensaio de PCR.

3.18.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real

Um e meio nanograma de cDNA em água livre de RNase foram amplificados no termociclador modelo ViiA[™]7 (Applied Biosystems) em 12 µL de solução contendo 7,5 µL de 2x Power SYBR (Applied Biosystems), 4 µL de água livre de RNAse, 0,5 µL do *primer* senso e antissenso na concentração de 10 µM. O programa de amplificação consistiu em um aquecimento a 50°C por 2 minutos, seguido de desnaturação e ativação da Taq polimerase a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. Em seguida, prosseguimos com as

curvas de dissociação para verificar a especificidade da reação. Para tal, foi realizada a desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 60°C por 1 minuto e novamente desnaturação a 95°C por 15 segundos.

A eficiência das amplificações foi avaliada utilizando as diluições seriadas do cDNA molde e somente foram utilizados *primers* que apresentaram eficiência entre 90 - 110% (Tabelas 1 e 2). Cada cDNA foi amplificado em duplicata e uma amostra correspondente sem a enzima transcriptase reversa (amostra RT-) foi incluída como controle negativo. Além disso, a expressão dos genes das NADPH oxidases e enzimas antioxidantes foi normalizada pela expressão do gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase (GAPDH) que foi usado como controle endógeno.

A quantificação relativa dos produtos de amplificação foi feita através da comparação relativa dos produtos de PCR durante a fase log-linear do processo de amplificação. Para tal, foi utilizado o método 2^{-ddCt}, sendo ddCt = [(dCt _{experimental} - dCt _{controle}). O dCt é a subtração entre número do ciclo em que a molécula alvo atinge o limiar pelo número do ciclo em que o controle endógeno atinge o limiar. O Ct referese ao número do ciclo no qual a fluorescência é detectada (*threshold cycle*) e é determinado em cada amplificação pelo software ViiaTM7 Software versão 1.1 (Applied Biosystems).

Os resultados foram apresentados em escala logarítmica na base 10, a fim de evidenciar melhor graficamente as possíveis diferenças.

As sequências dos primers que foram utilizados estão na tabelas 1 e 2.

Gene	Sequência do primer senso	Tamanho	Eficiência
	Sequência do <i>primer</i> antissenso	(bp)	do Primer
NOX 2	CAA TTC ACA CCA TTG CAC ATC	181 bp	100,67%
	CGA GTC ACA GCC ACA TAC AG		
NOX 4	TCC ATC AAG CCA AGA TTC TGA G	192 bp	97,32%
	GGT TTC CAG TCA TCC AGT AGA G		
GAPDH	CCA TCA ACG ACC CCT TCA TT	110 bp	106,97%
	GAC CAG CTT CCC ATT CTC AG		
	GAC CAG CTT CCC ATT CTC AG		

Tabela 1. Sequência de primers que foram utilizados para detecção dos transcritos das NADPH oxidases e controle endógeno (GAPDH).

NOX – NADPH oxidases; GAPDH - gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase.

Gene	Sequência do <i>primer</i> senso Sequência do <i>primer</i> antissenso	Tamanho (bp)	Eficiência do <i>Primer</i>
CAT	CAA GCT GGT TAA TGC GAA TGG TTG AAA AGA TCT CGG AGG CC	141 bp	109,66%
SOD1	TGT GTC CAT TGA AGA TCG TGT G CTT CCA GCA TTT CCA GTC TTTG	138 bp	105,24%
SOD2	GGA CAA ACC TGA GCC CTA AG CAA AAG ACC CAA AGT CAC GC	81 bp	104,11%
SOD3	GAC CTG GAG ATC TGG ATG GA GTG GTT GGA GGT GTT CTG CT	213 bp	108,65%
GPX1	AAT CAG TTC GGA CAT CAG GAG GAA GGT AAA GAG CGG GTG AG	150 bp	105,49%
GPX3	TGA TTC TAC CCA CGG CAA GT AGC ATC ACC CCA TTT GAT GT	145 bp	109,80%

Tabela 2. Sequência de primers que foram utilizados para detecção dos transcritos das enzimas antioxidantes.

CAT – catalase; SOD – superóxido dismutase; GPX – glutationa peroxidase.

3.19. Análise Estatística

A escolha do teste empregado foi feita de acordo com a finalidade e com as características da variável envolvida. No caso da comparação entre dois grupos, como por exemplo o falso operado *versus* infartado, foi utilizado o teste *t* de Student para grupos não-pareados. Para comparação entre 3 grupos ou mais, foi utilizado o teste Análise de Variância (ANOVA) de uma ou duas entradas, com pós-teste de Bonferroni. Em todos os testes, o grau mínimo de significância considerado foi de 95% (P<0,05) e os cálculos estatísticos foram feitos com o programa Graph Pad Prism 5.0[®].

Os valores obtidos foram apresentados como média ± desvio padrão da média.

4. Resultados

4.1. Isolamento e cultivo das células estromais mesenquimais derivadas do sangue menstrual

A fim de enriquecer a fração isolada das células derivadas do sangue menstrual em células estromais mesenquimais, nosso primeiro passo foi isolar a fração aderente ao frasco de cultura. Para tal, após 48 horas de plaqueamento, as células não aderentes foram removidas. Assim, foi possível observar a existência de uma subpopulação aderente ao plástico da placa de cultura, derivada do sangue menstrual total. As células aderentes encontravam-se isoladas ou em grupos com pequeno número de células aderentes apresentam um formato fibroblastóide (delgadas e alongadas), que se tornou mais evidente com o passar do tempo, uma característica semelhante à de células estromais mesenquimais (Figura 3B).

Caso não houvesse crescimento celular após duas semanas, o material era descartado. As culturas foram monitoradas diariamente para observação de possível contaminação por bactérias e/ou fungos, se essa ocorresse, as culturas eram descartadas.

Para o início dos experimentos, era necessário que as células apresentassem, em até 20 dias, confluência na área plaqueada de 80-90%. Caso contrário, também eram descartadas.



Figura 3: Microscopia óptica de contraste de fase das células humanas derivadas do sangue menstrual em cultura. Grupos de células aderidas no segunda dia de cultivo, após a remoção do sobrenadante e lavagens (A). Células em quinta passagem, utilizadas nos experimentos (B). A barra de calibração é de 200 µm.

4.2. Avaliação da adesão celular nas diferentes condições de cultivo

A propriedade de adesão das células é importante para a terapia celular, uma vez que é necessário que as células sejam capazes de se fixar, pelo menos por um período, no tecido ou órgão em que foram injetadas para que assim possam desempenhar a sua função e promover algum benefício. Em doenças isquêmicas, o ambiente em que essas células são injetadas é hostil e há elevação do estresse oxidativo, bem como redução da concentração de oxigênio e nutrientes, sendo essa uma importante barreira a ser vencida.

Inicialmente, decidiu-se testar se as CeSaM, em microambiente com ausência de soro e privação de oxigênio *in vitro*, teriam uma capacidade de aderência deficiente. Observou-se que, 2 horas após o plaqueamento, as CeSaM aderiram e não foi observada diferença significativa no percentual relativo de células aderidas, independente da concentração de soro e oxigênio (Figura 4A) (n=6, em cada condição experimental). Sabendo que esse microambiente não reduziu a sua capacidade de adesão em duas horas, avaliamos qual o impacto de períodos de cultivo mais longos na quantidade de células aderidas, reflexo do balanço entre sobrevivência, proliferação e morte celular.

Quarenta e oito horas após o plaqueamento também não foi observada diferença significativa no percentual de células aderidas, independente da

concentração de soro e oxigênio (Figura 4B) (n=6, em cada condição experimental). Entretanto, esse percentual foi significativamente reduzido pela ausência de soro após 7 dias de cultivo, ao passo que a redução concentração de oxigênio não impactou negativamente o percentual de células aderidas (Figura 4C), mantendo a adesão em níveis semelhantes à normóxia (n=6, em cada condição experimental).

Normóxia 21%Hipóxia 5%



Figura 4: Ensaio de adesão e quantificação celular na presença (20%) ou ausência de soro e nas diferentes concentrações de O_2 . A privação de soro e oxigênio não comprometeu a adesão celular em duas horas (A), bem como não alterou o percentual de células aderidas em 48 horas (B). Entretanto, a ausência de soro por 7 dias, independente da concentração de O_2 , reduziu o percentual de células aderidas (### p <0,001 comparado com a mesma concentração de O_2 na presença de soro) (C).

Adicionalmente, através da microscopia óptica de contraste de fase constatamos que a morfologia das CeSaM se manteve fibroblastóide, alongada e delgada nas diferentes condições de oxigênio e soro, após 7 dias de cultivo (Figura 5). Além disso, a partir dessas imagens é possível observar que a ausência de soro implicou em uma redução do número de células presentes na cultura ao final do protocolo experimental (n=12).



Figura 5: Microscopia óptica de contraste de fase das CeSaM após 7 dias em cultivo nas diferentes condições de concentração de oxigênio e privação de soro. Imagem representativa das CeSaM cultivadas em normóxia (21%) com e sem soro (A e D), hipóxia 5% com e sem soro (B e E) e hipóxia 1% (C e F) com e sem soro. A barra de calibração é de 200 µm.

4.3. Avaliação da susceptibilidade à morte celular nas diferentes condições de cultivo

A redução de oxigênio para células aeróbicas pode induzir morte celular, bem como a ausência de soro. Logo, investigamos o efeito desse microambiente na viabilidade celular após 48 horas e 7 dias de cultivo. Neste experimento, demonstrou-se que não houve diferença significativa no percentual de células viáveis, independente da condição e do tempo de cultivo realizado (Figura 6A e 6B) (n=6, em cada condição experimental). Isso indica que nas CeSaM apresentam uma elevada sobrevivência mesmo quando privadas de soro e oxigênio.



Figura 6: Ensaio de viabilidade celular com azul de Trypan na presença (20%) ou ausência de soro e nas diferentes concentrações de O₂. A privação de soro e oxigênio não comprometeu a viabilidade das células em 48 horas (A) e em 7 dias (B).

4.4. Quantificação do percentual de células apoptóticas nas diferentes condições de cultivo

A fim de avaliar o efeito da ausência de soro, bem como da redução do aporte de oxigênio, sobre o número de CeSaM em diferentes estágios de apoptose, foi realizado ensaio de Anexina V / 7AAD. Observamos que após 48 horas e 7 dias de cultivo, não houve diferença significativa no percentual de CeSaM em estágios iniciais de apoptose, bem como em estágios tardios ou mortas, independente da condição e do tempo realizado (Figura 7A a 7D) (n=4, em cada condição experimental). Logo, o baixo número de células apoptóticas se manteve semelhante à condição normóxia com soro.

Normóxia 21%



Figura 7: Ensaio de apoptose com Anexina V / 7AAD na presença (20%) ou ausência de soro e nas diferentes concentrações de O₂. A privação de soro e oxigênio não alterou significativamente o número de células em apoptose em estágio inicial (A e B), bem como em estágio tardio ou mortas (C e D), independente do tempo de cultivo.

4.5. Avaliação do ciclo celular nas diferentes condições de cultivo

Considerando que ao final de sete dias de cultivo houve uma redução significativa no percentual de células aderidas, devido à ausência de soro e independente da concentração de oxigênio, e que o percentual de células viáveis e de células apoptóticas se mantiveram semelhantes, é possível que a proliferação das CeSaM tenha se reduzido ao longo desse período, justificando o resultado descrito acima. Para investigar essa possibilidade, realizamos o ensaio de ciclo celular com iodeto de propídio, para avaliar o percentual de células em cada fase do ciclo.

Observamos, após 48 horas de cultivo, que o percentual de células na fase G1 e G2 (Figura 8A e 8C) não foi influenciado pela ausência de soro e privação de O₂. Entretanto, um número menor de células estava duplicando o DNA na ausência de soro, independente da concentração de O₂. Logo, houve um menor percentual de CeSaM na fase S (Figura 8B). Além disso, ao final de 7 dias de cultivo, não foi observada diferença significativa no percentual de células nas fase G1, S e G2 (Figura 8D, 8E e 8F) (n=4, em cada condição experimental).



Figura 8: Ensaio de ciclo celular com iodeto de propídeo na presença (20%) ou ausência de soro e nas diferentes concentrações de O_2 . Em 48 horas, houve redução somente no percentual de células na fase S cultivadas na ausência de soro (B), mantendo números semelhantes nas fases G1 e G2 (A e C). Já em 7 dias, não houve diferença significativa em nenhuma das fases do ciclo celular (D, E, F) ([#] p<0.05, ^{##} p<0.01, ^{###} p<0.001 comparado com a mesma concentração de O_2 na presença de soro).

4.6. Ensaio de atividade das enzimas antioxidantes nas diferentes condições de cultivo

Considerando que diversas doenças isquêmicas cursam com a elevação da produção de espécies reativas de oxigênio, determinamos a atividade das enzimas antioxidantes das CeSaM *in vitro*, em condições semelhantes ao microambiente isquêmico.

Após 48 horas de cultivo na presença de soro, a condição hipóxia 1% reduziu significativamente a atividade da catalase, quando comparada à condição normóxia (Figura 9A). Adicionalmente, a ausência de soro promoveu uma redução significativa da atividade da glutationa peroxidase, independente da concentração O₂ (Figura 9C). Além disso, na presença de soro há uma redução significativa da atividade da GPX nas células cultivadas em 1% de O₂, quando comparadas à 5%. Já a atividade da superóxido dismutase foi semelhante em todas as condições (Figura 9B).

Ao avaliarmos as CeSaM no sétimo dia de cultivo, não houve diferença estatística entre as amostras com relação à atividade da catalse e GPX (Figura 9D e 9F). Entretanto, ao consideramos a atividade da SOD, houve diferença significativa na presença de soro entre normóxia e hipóxia 1%, bem como entre hipóxia 5% e 1% (Figura 9E) (n=3, em cada condição experimental).



Figura 9: Atividade das enzimas antioxidantes das CeSaM nas diferentes condições de concentração de oxigênio e privação de soro. O cultivo em hipóxia 1% na presença de soro promoveu uma redução significativa na atividade da catalase (Figura 8A) e GPX (Figura 8C) em 48 horas, bem como em 7 dias de superóxido dismutase (Figura 8E). Adicionalmente, a ausência de soro induziu redução da atividade da GPX, independente da concentração de O₂ (Figura 8C). (*p<0.05 quando comparadas as CeSaM cultivadas em normóxia com soro e ### p<0.001 comparado com a mesma concentração de O₂ na presença de soro).
4.7. Estabelecimento do modelo animal de infarto do miocárdio

4.7.1. Mortalidade Cirúrgica e Pós-cirúrgica

O procedimento cirúrgico para a indução do infarto do miocárdio (n=22) resultou em um índice de mortalidade de 36,6% dos animais infartados envolvidos no estudo, entretanto nenhum animal *sham* morreu durante a mesma cirurgia, porém sem oclusão da artéria coronária descendente anterior.

Em seguida, os animais que sobreviveram ao procedimento cirúrgico foram acompanhados por 28 dias e ao final do protocolo, cerca de 75% dos *sham* e 46,1% dos infartados estavam vivos (Figura 10).



Figura 10: Curva de sobrevivência pós-cirúrgica. Ao final do protocolo experimental, sobreviveram cerca de 75% dos animais *sham* (n=3) e 46,1% (n=6) dos animais infartados.

4.7.2. Avaliação da atividade elétrica cardíaca

O registro eletrocardiográfico foi realizado 50 minutos ou 24 horas após o procedimento cirúrgico, com os animais (sham (n=4) e infartados (n=18)) dentro e fora do plano anestésico, respectivamente.

A presença de supradesnivelamento do segmento ST, que caracteriza a isquemia miocárdica, e/ou onda Q patológica (primeira onda negativa do complexo QRS maior do que um terço da primeira onda positiva que a sucede) na derivação D1, que caracteriza inatividade elétrica na parede livre do ventrículo esquerdo (Figura 11B), foram utilizados como critérios para a confirmação de que o procedimento de oclusão da artéria coronária esquerda foi bem-sucedido. Através do eletrocardiograma, constatamos que cerca de 9% dos animais não apresentaram as alterações eletrocardiográficas descritas acima e foram excluídos do experimento, indicando que o procedimento de oclusão da artéria coronária esquera da artéria não foi bem-sucedido nesses casos.



Figura 11: Ilustração representativa dos registros eletrocardiográficos. ECG na derivação D1 de um animal fora do plano anestésico, falso operado (A) e ocluído transitoriamente (B), 24 horas após a cirurgia. Seta menor em (B) destaca a presença da onda Q patológica e a seta maior aponta para o supradesnivelamento do segmento ST.

4.7.3. Avaliação da função cardíaca

Ao final protocolo experimental, foram realizados do exames ecocardiográficos, a fim de avaliarmos a função cardíaca dos animais infartados (n=6) e falso-operados (n=3). Os resultados claramente mostraram que a oclusão transiente da artéria coronária impactou negativamente na função cardíaca, gerando uma queda significativa da fração de ejeção (Figura 12B). Além disso, o débito sistólico reduziu (Figura 12C) e por consequência o volume sistólico final aumentou significativamente (Figura 12A), indicando um prejuízo principalmente da função sistólica. Por fim, o volume diastólico final permaneceu inalterado, não havendo diferença significativa entre os infartados e os falso-operados (Figura 12D).



Figura 12: Análises ecocardiográficas no vigésimo oitavo dia do protocolo experimental. Os animais infartados apresentaram diferença significativa nos parâmetros fração de ejeção, volume sistólico final e débito sistólico (A, B e C, respectivamente), entretanto o volume diastólico (D) final permaneceu semelhante ao do grupo falso-operado. (*p<0.05 e ***p<0.001 quando comparados aos animais *sham*).

4.7.4. Avaliação da mecânica cardíaca

Por meio da técnica de Langendorff é possível mensurar *ex vivo* as pressões sistólicas e diastólicas do ventrículo esquerdo quando submetidos a volumes crescentes, permitindo inferir como está a função mecânica cardíaca. Notavelmente, as curvas pressão sistólica x volume (Figura 13A), pressão diastólica x volume (Figura 13B) e pressão desenvolvida x volume (Figura 13C), são diferentes entre os dois grupos de animais. Logo, considerando as pressões sistólicas e diastólicas, o animal infartado (n=6) apresentou menor pressão que o animal falso-operado (n=3) para um mesmo volume.

A fim de analisamos estatisticamente essas curvas pressão x volume, realizamos a análise da área sob a curva, a qual evidenciou uma deficiência sistólica, uma vez que os animais infartados apresentaram uma menor área quando comparados aos animais falso-operados (Figura 13D). Em contraste, não houve diferença significativa nas áreas sob a curva diastólica e desenvolvida (Figura 13E e 13F).





Figura 13: Análises das pressões sistólicas, diastólicas e desenvolvidas em determinados volumes, no vigésimo oitavo dia do protocolo experimental. As curvas pressão x volume são notoriamente diferentes entre os animais falso operados e infartados (A, B e C), entretanto considerando a área sob a curva de cada grupo, houve somente diferença significativa na função sistólica (*p<0.05 quando comparados aos animais falso operados).

4.7.5. Avaliação da área infartada do ventrículo esquerdo

A coloração de picrosirius foi realizada *post mortem*, ao final do protocolo experimental. Observamos que os animais infartados (n=6) apresentaram cerca de $26,24 \pm 8,24\%$ do ventrículo esquerdo com depósito de colágeno, evidenciando a área de infarto (Figura 14).



Figura 14: Coloração de picrosírius do ventrículo esquerdo cardíaco. Imagem representativa de um corte histológico do ventrículo esquerdo, no animal falso-operado (A) e no animal infartado (B), evidenciando a área infartada marcada pela elevada deposição de colágeno, corado em vermelho.

4.8. Estabelecimento do ponto de maior produção de espécies reativas de oxigênio após isquemia e reperfusão do miocárdio

A fim de analisar a produção de espécies reativas de oxigênio geradas pelo coração após isquemia e reperfusão do miocárdio, os animais foram infartados, utilizando o método de oclusão transiente da artéria coronária descendente anterior. Após 1, 2, 6 e 24 horas da reperfusão miocárdica, os animais foram eutanasiados e separadas as seguintes regiões do coração: região infartada do ventrículo esquerdo e a borda do infarto (n=3, em cada tempo pós infarto). Em seguida, o lisado dessas regiões foi obtida e a produção de ERO quantificada. Nesse experimento, avaliamos também a contribuição das NADPH oxidases para a produção de ERO, já que a única função destas enzimas nos sistemas biológicos é produzir espécies reativas de oxigênio. O ventrículo esquerdo e direito de animais falso-operados (*sham*, n=9) foram utilizados como controle.

Observamos que a produção de ERO aumentou significativamente nos animais *sham* na presença de NADPH, sendo cerca de 3 vezes maior quando comparada ao mesmo tecido do mesmo animal na ausência de NADPH. Já as regiões infartadas (INF) e borda de infarto (BI) do animais infartados aumentaram significativamente cerca de 6 vezes a produção de ERO, em todos os tempos analisados, quando comparada à produção ERO da mesma região e no mesmo tempo pós reperfusão na ausência de NADPH (Figura 15A). Além disso, não há diferença significativa entre os diferentes tecidos analisados, infartados ou não, na ausência de NADPH. Adicionalmente, não existe diferença significativa entre os tecidos dos animais infartados, independente do tempo pós reperfusão, na presença de NADPH, entretanto há diferença significativa quando comparado aos *sham* na mesma condição.

A partir deste experimento, realizamos a subtração da produção com NADPH, substrato da enzima NADPH oxidase, pela produção sem NADPH. Verificamos que a produção de ERO na área infartada (INF) realizada pela NADPH oxidase é cerca de 2,2 vezes maior do que no ventrículo esquerdo dos animais controle (sham) (Figura 15B). Além disso, a produção de ERO é cerca de 2,2 vezes maior na borda do infarto (BI) quando comparada à quantidade produzida pelo ventrículo direito dos animais sham (Figura 15B). Cabe ressaltar que não há diferença estatística na produção de ERO pelas NADPH oxidases entre as diferentes regiões do infarto e nos diferentes tempos pós reperfusão. Portanto, a produção de ERO é aumentada pelas NADPH oxidases na região do infarto e na borda infartada nesses diferentes tempos analisados. Considerando que são nessas regiões que células utilizadas na terapia celular são injetadas as intramiocardicamente, estas deveriam ser resistentes às espécies reativas que estão sendo geradas para que elas possam sobreviver e exercer a sua função.



Figura 15: Atividade da geração de espécies reativas de oxigênio pelas NADPH oxidases. Sem NADPH, todos os falso-operados e os infartados dos diferentes tempos pós reperfusão, tanto na área infartada quanto na borda do infarto produzem ERO de forma semelhante. Entretanto, ao adicionarmos NADPH, todos os animais apresentam uma produção mais acentuada (A) (***p<0.001 quando comparados aos animais de mesmo grupo sem NADPH). Ao realizarmos a subtração da produção com NADPH, pela produção sem NADPH, observamos que NADPH oxidases são responsáveis por um aumento expressivo de ERO na área infartada e na borda do infarto (B) (***p<0.001 quando comparados aos animais falso operados). BI – borda do infarto; INF – região infartada.

4.9. Impacto da terapia celular na produção de ERO e na defesa antioxidante

4.9.1. Níveis de RNA mensageiro das NADPH oxidases no tecido cardíaco

Considerando a importância das NADPH oxidases para produção de ERO para a fisiopatologia da lesão por isquemia e reperfusão, investigamos a sua expressão por RT-PCR quantitativo. Duas horas após o início da reperfusão miocárdica e terapia celular, a expressão de NOX2 foi semelhante entre os animais falso-operados (n=6) e os infartados tratados (n=5) ou não (n=4) com as CeSaM, considerando tanto a borda do infarto quanto a área infartada (Figuras 16A e 16B, respectivamente). Adicionalmente, NOX4 foi expressa em todos grupos experimentais, sem diferença estatística entre eles, em ambas as regiões analisadas (Figura 16C e 16D).



Figura 16: Avaliação da expressão das diferentes NADPH oxidases 2 horas após reperfusão e terapia celular. NOX2 (A e B) é expressa em todos os grupos experimentais, assim como NOX4 (C e D), sem diferença significativa entre eles, tanto na borda (BI) quanto na área infartada (INF). Cel – CeSaM.

Além disso, a expressão dessas NADPH oxidases também foi avaliada 24 horas após a reperfusão e terapia celular. Observamos que os animais infartados tratados com CeSaM (n=4) aumentaram significativamente a expressão de NOX2, tanto na borda quanto na área infartada (Figura 17A e 17B, respectivamente) quando comparados ao *sham* (n=6) e aos animais infartados não tratados (n=5). No caso da NOX4, não houve diferença significativa entre os grupos, independente da área analisada (Figura 17C e 17D).



Figura 17: Avaliação da expressão das diferentes NADPH oxidases 24 horas após reperfusão e terapia celular. Considerando a expressão de NOX2, os animais infartados e tratados com CeSaM apresentaram um aumento significativo na borda (BI) (A) (**p<0.01 vs *sham* e *p<0.05 vs 24h INF) e na área infartada (INF) (B) (**p<0.001 vs *sham* e **p<0.01 vs 24h INF). Já NOX4 manteve expressão semelhante em todos os grupos experimentais, sem diferença significativa entre eles, independente da região analisada (C e D). Cel – CeSaM.

4.9.2. Produção de espécies reativas de oxigênio após a terapia celular no coração dos animais infartados

A produção de ERO pelas NADPH oxidases, ao realizarmos a subtração da produção com o substrato NADPH, pela produção sem NADPH, é semelhante entre os animais infartados tratados (n=5) ou não (n=5) com CeSaM, em ambos tempos, pós reperfusão analisados, independente da região, borda do infarto (Figura 18A) ou área de infarto (Figura 18B).



Figura 18: Atividade da geração de espécies reativas de oxigênio pelas NADPH oxidases 2 e 24 horas após reperfusão e terapia celular. Ao realizarmos a subtração da produção com NADPH pela produção sem NADPH, observamos que na borda do infarto (A) e na área infartada (B) a produção de ERO é semelhante entre os animais infartados tratados ou não, em ambos tempos pós reperfusão analisados.

4.9.3. Níveis de RNA mensageiro das enzimas antioxidantes no tecido cardíaco

A expressão de enzimas antioxidantes foi avaliada por RT-PCR quantitativo. Duas horas após a reperfusão, considerando a borda do infarto, não houve diferença entre os grupos experimentais nos níveis de RNA mensageiro das enzimas catalase, superóxido dismutase 1, 2, 3 e glutationa peroxidase 1 e 3 (Figura 19A-F).



Figura 19: Expressão das diferentes enzimas antioxidantes na borda do infarto 2 horas após reperfusão e terapia celular. Os níveis de RNA mensageiro de catalase (A), SOD1 (B), SOD2 (C), SOD3 (D), GPX1 (E) e GPX3 (F) foram semelhantes em todos os grupos experimentais, sem diferença significativa entre eles. CAT- catalase; SOD – superóxido dismutase; GPX – Glutationa peroxidase; cel - CeSaM.

Adicionalmente, ao analisarmos a área infartada duas horas após a reperfusão, não houve diferença entre os grupos experimentais nos níveis de RNA mensageiro das enzimas catalase, superóxido dismutase 1, 3 e glutationa peroxidase 1 e 3 (Figura 20A, B, D, E e F, respectivamente). Entretanto, os animais infartados não tratados apresentaram redução significativa na expressão da SOD2 (Figura 20C) quando comparados aos animais falso-operados e infartados tratados.



Figura 20: Expressão das diferentes enzimas antioxidantes na área infartada 2 horas após reperfusão e terapia celular. Os níveis de RNA mensageiro de catalase (A), SOD1 (B), SOD3 (D), GPX1 (E) e GPX3 (F) foram semelhantes em todos os grupos experimentais, ao passo que a expressão de SOD2 (C) reduziu significativamente nos animais infartados não tratados quando comparados aos outros dois grupos experimentais (*p<0.05 vs *sham* e **p<0.01 vs 24h INF + cel). CAT- catalase; SOD – superóxido dismutase; GPX – Glutationa peroxidase; cel – CeSaM.

Além disso, assim como na análise de duas horas, 24 horas após a reperfusão não houve diferença entre os grupos experimentais nos níveis de RNA mensageiro das enzimas catalase, superóxido dismutase 1, 2, 3 e glutationa peroxidase 1 e 3 na borda do infardo (Figura 21A-F).



Figura 21: Expressão das diferentes enzimas antioxidantes na borda do infarto 24 horas após reperfusão e terapia celular. Os níveis de RNA mensageiro de catalase (A), SOD1 (B), SOD2 (C), SOD3 (D), GPX1 (E) e GPX3 (F) foram semelhantes em todos os grupos experimentais, sem diferença significativa entre eles. CAT- catalase; SOD – superóxido dismutase; GPX – Glutationa peroxidase; cel – CeSaM.

Entretanto, ao analisarmos a área infartada, 24 horas após a reperfusão, os animais infartados tratados apresentaram aumento significativo na expressão de GPX1 (Figura 22E) quando comparados aos animais falso-operados. Ao considerarmos os níveis de RNA mensageiro das enzimas catalase, SOD1, 2, 3 e GPX3 (Figura 22A, B, C, D e F, respectivamente) não houve diferença entre os grupos experimentais.



Figura 22: Expressão das diferentes enzimas antioxidantes na área infartada 24 horas após reperfusão e terapia celular. Os níveis de RNA mensageiro de catalase (A), SOD1 (B), SOD2 (C), SOD3 (D) e GPX3 (F) foram semelhantes em todos os grupos experimentais, ao passo que a expressão de GPX1 (E) aumentou significativamente quando comparada ao grupo *sham* (**p<0.01). CAT- catalase; SOD – superóxido dismutase; GPX – Glutationa peroxidase; cel – CeSaM.

4.9.4. Análise da atividade das enzimas antioxidantes no tecido cardíaco

Uma vez que uma redução ou aumento nos níveis de mRNA não indica necessariamente que a enzima é menos ou mais ativa, foram realizados ensaios para determinar a atividade das enzimas antioxidantes. Vinte e quatro horas após a reperfusão e terapia celular, as atividades da catalase e superóxido dismutase tanto na borda do infarto (Figura 23A e B) quanto na área infartada (Figura 23D e E) foram semelhantes ao compararmos os grupos experimentais, não havendo diferença estatística, em com concordância com os níveis de RNA mensageiros. Entretanto, a atividade da glutationa peroxidase foi significativamente maior no grupo infartado tratado com CeSaM quando comparado ao grupo *sham*, ao passo que foi semelhante quando comparada ao grupo infartado não tratado com células, tanto na borda (Figura 23C) quanto na região infartada (Figura 23F).





Figura 23: Atividade das enzimas antioxidantes na borda do infarto e área infartada 24 horas após reperfusão e terapia celular. A terapia com as CeSaM não alterou atividade da catalase (A e D), SOD (B e E), não havendo diferença significativa entre os grupos experimentais, na borda e na área infartada. Entretanto há um aumento significatico de atividade de GPX ao compararmos o grupo sham com grupo o infartado tratado em ambas as regiões (E e F) (**p<0.01 e ***p<0.001) CAT-catalase; SOD – superóxido dismutase; GPX – Glutationa peroxidase; cel - CeSaM.

Discussão

Nos últimos 20 anos, as células estromais mesenquimais têm atraído atenção como uma ferramenta promissora para terapia celular e medicina regenerativa no tratamento de diversas patologias cardíacas, cerebrais, ósseas, músculo esqueléticas, diabetes e câncer (CHEN *et al.*, 2004; TORRENTE e POLLI, 2008; KOSZTOWSKI *et al.*, 2009; UNDALE *et al.*, 2009; WILLIAMS e HARE, 2011). A cada ano, diferentes trabalhos evidenciam o potencial terapêutico das MSC devido à sua ação parácrina mediante a secreção de fatores que favorecem a proteção do tecido lesado (RUAN *et al.*, 2005; DHARMASAROJA, 2009; CAPLAN e SORREL, 2015). Além disso, já foi descrito que as MSC apresentam um perfil imunomodulatório, sendo capazes de regular resposta imune do organismo (LE BLANK e RINGDEN, 2007; HO *et al.*, 2015; CARRILLO-GALVEZ *et al.*, 2015).

As MSC podem ser isoladas a partir da medula óssea, tecido adiposo, placenta, cordão umbilical, sangue menstrual, entre outras fontes (FRIEDSTEIN, 1977; ERICES *et al.*, 2000; LUND *et al.*, 2009, CUI *et al.*, 2007). No organismo, as MSC residem em nichos, ou locais anatômicos específicos, que modulam suas atividades durante o desenvolvimento, sendo fundamentais para a manutenção e reparo tecidual (SPRADLING, *et al.*, 2001; SCADDEN, 2006). Já é bem estabelecido que a maioria das células tronco *in vivo* estão em nichos com baixa ou muito baixa pressão parcial de O₂ (PO₂), com valores entre 5 e 50 mmHg (0,7% - 7%) (FISHER e BAVISTER, 1993; SIMON e KEITH 2008; LIN *et al.*, 2008; MA *et al.*, 2009; IVANOVIC 2009). Vários estudos revelaram que esses nichos com níveis bastantes reduzidos de O₂ podem influenciar as MSC, promovendo proliferação, bem como inibindo a diferenciação (KEITH 2007; HOLZWARTH *et al.*, 2010). Logo, essas células são sensíveis às variações de PO₂ no meio circundante.

Dessa forma, nos últimos anos, diferentes pesquisadores realizaram experimentos *in vitro* em baixas concentrações de O₂, a fim de investigar a resposta das células estromais mesenquimais (BURAVKOVA *et al.*, 2014). No entanto, os diferentes protocolos experimentais utilizados variam o tipo celular e a fonte de obtenção, a presença de nutrientes, o tempo de duração do cultivo, bem como a concentração de O₂ (0 a 5%), dificultando comparações e conclusões sobre o papel da hipóxia sobre a biologia da MSC. Além disso, os dados sobre a resposta às

condições de hipóxia são bastantes controversos, tanto mostram efeitos prejudiciais quanto benéficos. No entanto, a tensão de oxigênio é, sem dúvida, um regulador importante na determinação do destino das células e da manutenção das MSC no estado indiferenciado (BIANCO *et al.*, 2008; MOHYELDIN *et al.*, 2010).

Considerando que um dos objetivos dos estudos com células-tronco é avaliar o potencial terapêutico, tanto em modelos pré-clínicos quanto em ensaios clínicos, para futura utilização na medicina regenerativa, é mandatória a expansão das células *in vitro*, para aumentar o número de células isoladas inicialmente. Entretanto, apesar de as células estromais mesenquimais serem provenientes de tecidos com baixa concentrações de oxigênio e serem transplantadas em grande número, a eficácia da terapia pode ser limitada devido ao comprometimento celular induzido pelo microambiente extremamente hostil e pró-apoptótico do tecido receptor (GENG, 2003). Portanto, devido ao fornecimento de sangue deficiente e baixa tensão de oxigênio no coração infartado e em outras doenças, estudar os efeitos da hipóxia é de extrema importância. Sabe-se que um fator crítico associado com privação de oxigênio é o aumento do estresse oxidativo, como consequência do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio que pode levar à disfunção mitocondrial e morte celular (GUZY e SCHUMACKER, 2006; PETERSON *et al.*, 2011).

Diante deste panorama, as MSC derivadas do sangue menstrual despertam grande interesse, uma vez que essas células apresentam elevada sobrevivência e aderência na presença altas concentrações de peróxido de hidrogênio, além de grande atividade das enzimas antioxidantes (ASENSI *et al.*, 2014), características essenciais para vencer o estresse oxidativo gerado em diversas patologias. Entretanto, apesar de ser amplamente conhecido que a concentração de O₂ uterina é em torno de 1,5% a 7% (FISHER e BAVISTER, 1993), nenhum estudo foi realizado até hoje visando analisar as respostas das CeSaM cultivadas nessas condições. Assim, neste trabalho avaliamos o impacto da hipóxia e privação de soro, mimetizando o ambiente isquêmico, na adesão, viabilidade, proliferação e potencial antioxidante das células estromais mesenquimais derivadas do sangue menstrual, mediante a privação de oxigênio e soro.

Inicialmente, foi realizado o isolamento da célula objeto de estudo, as CeSaM, a partir do sangue menstrual coletado pela própria doadora. Conforme observado, estas células são capazes de aderir ao frasco de cultura, atendendo ao primeiro critério de classificação de MSC publicado pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) (DOMINICI *et al.*, 2006) (Figura 3), apresentando uma morfologia fibroblastóide (delgadas e alongadas), formando morros e vales.

Além disso, as CeSaM já foram caracterizadas sob outros aspectos, tais como perfil imunofenotípico, capacidade de diferenciação e potencial proliferativo por alguns pesquisadores (MENG et al., 2007; PATEL et al., 2008; CUI et al., 2007), bem como pelo nosso grupo de pesquisa (ASENSI et al., 2014). Brevemente, as CeSaM cultivadas in vitro mostram uma expressão menor que 2% de antígenos associados a linhagens hematopoiéticas (CD45, CD34, CD19 e HLA-DR) e endoteliais (CD133 e CD31). Adicionalmente, apresentam elevada expressão de CD73, CD90 e CD105, sendo que este perfil está de acordo com o segundo critério descrito pela ISCT. Considerando a capacidade de diferenciação, estudos indicam que as CeSaM são multipotentes, sendo capazes de se diferenciar em diferentes linhagens derivadas dos três folhetos embrionários, na presença de fatores indutores cardíacas, específicos, tais como: neuronais, hepáticas, osteogênicas, condrogênicas, adipogênicas, epiteliais, endoteliais, pancreáticas (CUI et al., 2007; MENG et al., 2007; PATEL et al., 2008; HIDA et al., 2008; DARZI et al., 2012; ASENSI et al., 2014; RAHIMI et al., 2014).

Atualmente, na literatura todos os estudos que utilizam as CeSaM a fim de caracterizar efeitos celulares e bioquímicos *in vitro*, bem como avaliar seu potencial terapêutico *in vivo*, expandiram essas células em normóxia (21% de O₂). Logo, o presente estudo foi pioneiro em caracterizar as respostas dessa célula mesenquimal *in vitro* na presença de concentrações reduzidas de oxigênio (hipóxia 1% e 5%), em conjunto ou não com ausência de soro. Assim, estamos mimetizando um ambiente isquêmico, encontrado em diversas doenças na fase aguda para quais a terapia celular é uma opção terapêutica, tais como infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral.

Uma das limitações dos modelos de hipóxia *in vitro* é que a pressão parcial de O₂ definida na incubadora, não necessariamente reflete a pO₂ no meio de cultura próximo às células. A primeira dificuldade é que são necessárias algumas horas para que a pO₂ do meio de cultura seja equilibrada com baixa concentração de O₂ presente na incubadora, uma vez que, anteriormente, este estava exposto à PO₂ atmosférica (WESTFALL *et al.*, 2008). Dessa forma, períodos curtos de hipóxia, por poucas horas, não garantem que as células de fato foram expostas à pO₂ desejada, e, se foram, com certeza o tempo é mais curto do que o que estiveram na

incubadora. Cultivos mais longos em hipóxia apresentam outra limitação, que é a necessidade de troca do meio de cultura e a passagem das células geralmente em uma câmara de fluxo laminar com PO₂ atmosférica. A fim de superar parcialmente esses obstáculos, optamos pelo tempo de 48 horas de cultivo, que garantiria mais de 1 um dia de fato em hipóxia, na concentração desejada. Além disso, optamos pelo cultivo por 7 dias, sendo realizada a troca do meio de cultura no terceiro dia após o plaqueamento, proporcionando alguns dias em hipóxia antes e após essa troca.

Nesse contexto, avaliamos inicialmente a capacidade de adesão das células em um microambiente semelhante ao isquêmico *in vitro*, uma vez que é fundamental que as CeSaM sejam capazes de se fixar, pelo menos por um período, no tecido em que foram injetadas, para que assim possam desempenhar a sua função e promover algum benefício. Observamos que a privação de soro e oxigênio não comprometeu a adesão celular em duas horas, bem como não alterou o percentual de células aderidas após 48 horas de cultivo (Figura 4A e 4B). Adicionalmente, o cultivo por períodos mais longos (7 dias) com 5% ou 1% de O₂ e na presença de soro, mostrou que esse parâmetro não alterou a quantidade de células aderidas ao final desse período. Em 2011, Kim e colaboradores demonstraram entretanto, que o cultivo de células estromais mesenquimais humanas derivadas do tecido adiposo (hMSC-AT), por 3 ou 6 dias em hipóxia de 2%, aumentou o número de células quando comparado à normóxia. No entanto, os autores não mostraram o efeito da ausência de soro na quantidade final de células.

Adicionalmente, nosso trabalho mostrou que a ausência de soro por 7 dias, independente da concentração de O₂, reduziu o percentual de células aderidas significativamente (Figura 4C), corroborando com os dados de Wan Safwani e colaboradores (2016) em hMSC-AT cultivadas em hipóxia de 2%.

Dessa forma, questionamos se a limitada capacidade de expansão das CeSaM na ausência de soro, seria devido a uma redução na viabilidade celular, uma vez que essa condição, em conjunto com a hipóxia por 48 horas ou mais prolongada (menos de 1% de O₂ por 5 dias), foi capaz de induzir apoptose de 13% e 99% das MSC de medula óssea humanas, respectivamente (POTIER *et al.*, 2007). Neste mesmo trabalho, os autores demonstraram que esse percentual de células em apoptose reduzia para 50% quando a hipóxia era realizada na presença de soro por 5 dias. Outros pesquisadores demonstraram que as MSC murinas quando cultivadas

por 24 horas em pressão parcial reduzida de O₂ (24 mmHg, aproximadamente 1%), apresentaram elevado índice de células apoptóticas em estágios iniciais e tardios, quando comparado à normóxia, e que a privação de soro potencializou ainda mais esse efeito, induzindo apoptose dependente de caspases e liberação do citocromo c mitocondrial (ZHU *et al.*, 2006). Resultados semelhantes foram descritos mais tarde por outros grupos, indicando que a hipóxia em combinação com a privação de soro aumentou para 50% o número de células apoptóticas (NIE *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2009). Além disso, já foi demonstrado que as hMSC-AT, na ausência de soro, apresentaram uma redução da viabilidade celular de cerca de 50% em normóxia e 30% em hipóxia (2%) (WAN SAFWANI *et al.*, 2016). Esses resultados sugerem que a combinação de hipóxia e privação de soro aumentam as taxas de morte celular na mesma extensão em que a observada com a privação de soro por si só. Isto sugere que entre O₂ e privação de nutrientes, a privação nutrientes é o fator que mais influencia na sobrevivência após o transplante das MSC em períodos curtos de hipóxia.

Diante desses fatos, investigamos o percentual de células viáveis e o número de células apoptóticas. A viabilidade celular foi avaliada com o corante azul de Trypan, que não é incorporado por células saudáveis. Entretanto, quando as células estão mortas essa substância consegue penetrar, devido à desestabilização da membrana, resultando em uma coloração azulada e possibilitando a contagem das células viáveis, que não são coradas. Já no ensaio de apoptose utilizamos a anexina V a fim de detectar o fosfolipídeo fosfatidilserina, que é translocado e exposto na face externa da membrana em células que já iniciaram a apoptose. Já o composto fluorescente 7-amino-actinomicina (7-AAD) é um intercalante de DNA, que penetra na célula mediante desestabilização membrana na fase final do processo de apoptose ou necrose. Assim, nesses ensaios, observamos que independente do tempo cultivo, da concentração de oxigênio ou privação de soro, as CeSaM apresentaram elevada viabilidade (superior a 90%), bem como um baixo número de células em apoptose em estágios iniciais e tardios (inferior a 8%) (Figura 6 e 7). Logo, as CeSaM podem ser consideradas uma ferramenta terapêutica promissora, uma vez que apresentam elevada sobrevivência mesmo quando privadas de soro e oxigênio.

Considerando que a morte celular parece não explicar a redução significativa do percentual de células presentes na cultura devido à ausência de soro ao final de

7 dias, avaliamos as fases do ciclo celular. Para tal, utilizamos o iodeto de propídio (PI), que é um intercalante de ácidos nucléicos, comumente utilizado na citometria de fluxo para avaliação das fases do ciclo celular. Observamos que o percentual de células na fase G1 e G2 não foi influenciado pela ausência de soro e privação de O2 após 48 horas de cultivo (Figura 8A e 8C). Entretanto, a ausência de soro implicou em um número menor de células duplicando o DNA (Fase S), independente da concentração de O₂ (Figura 8B). Dessa forma, uma possível explicação para a redução do percentual das CeSaM ao final do protocolo experimental é que a ausência de soro reduziu o percentual de células duplicando o DNA (Fase S), observado já em 48 horas pela citometria de fluxo. Esse menor potencial proliferativo pôde ser detectado em longo prazo, uma vez que em 7 dias as células cultivadas na presença de soro já duplicaram seu material genético mais de 4 vezes, já que as CeSaM têm um tempo de duplicação da população de 36 horas (ASENSI K.D. et al, 2014). Cabe ressaltar que não observamos um aumento do número de células na fase G1 ou G2 quando cultivadas na ausência de soro, apesar de ter ocorrido uma redução na fase S em 48 horas.

Em contraste, ao final de 7 dias de cultivo não foi observada diferença significativa no percentual de células nas diferentes fases do ciclo celular devido à ausência de soro ou concentração de oxigênio (Figura 8D-F). Uma possível explicação para tal fato é a inibição da proliferação por contato, já que as CeSaM cultivadas na presença de soro aumentaram bastante em número, permanecendo em uma mesma área, atingindo uma confluência próxima a 100%. Logo, ao final do protocolo experimental, o percentual de células na fase S se mostrou reduzido, igualando-se ao percentual encontrado no cultivo sem soro.

Neste contexto, pesquisadores cultivaram MSC derivadas da medula óssea de ratos em hipóxia (1% de O₂) por 48 horas e constataram um aumento do número de células na fase G0/G1 do ciclo celular. Esse efeito foi potencializado quando as MSC foram também cultivadas em conjunto com a privação de soro (KUMAR e VAIDYA, 2016), possivelmente devido à ausência de nutrientes necessários para dar início à duplicação do DNA e posterior citocinese.

Considerando que a hipóxia gera produção de espécies reativas de oxigênio (GUZY e SCHUMACKER, 2006; PETERSON *et al.*, 2011), determinamos a atividade das enzimas antioxidantes presentes nas CeSaM *in vitro*, em condições semelhantes ao microambiente isquêmico. O cultivo em hipóxia com 5% de O₂, na

presença de soro, não alterou a atividade das diferentes enzimas antioxidantes analisadas. Entretanto, ao considerarmos a condição de hipóxia em 1% de O₂, na presença de soro, houve uma redução significativa na atividade da catalase e GPX em 48 horas, bem como da superóxido dismutase em 7 dias (Figura 9). Resultados semelhantes foram encontrados por Peterson e colaboradores (2011) em MSC de medula óssea de rato, uma vez que observaram uma redução da proteína catalase, entretanto a SOD permaneceu inalterada após 24 horas de cultivo em hipóxia 1%. Adicionalmente, em nosso trabalho a ausência de soro induziu redução da atividade da GPX, independente da concentração de O₂ (Figura 9C), após 48 horas de cultivo, permanecendo inalterado em 7 dias. Dessa forma, apesar de as CeSaM terem reduzido modestamente as atividades das enzimas antioxidantes devido à hipóxia 1% ou privação de soro, cabe ressaltar que essa redução talvez não impacte de forma significativa fisiologicamente.

Umas das possíveis e prováveis explicações para manutenção da sobrevivência das CeSaM, mesmo em concentrações reduzidas de O₂ (inferior à 5%) e na ausência de fatores de crescimento e nutrientes, é a estabilização do fator induzido por hipóxia (HIF-1α). Já foi demonstrado em MSC que ocorre a translocação do HIF-1α para o núcleo após 6 a 24 horas de exposição à hipóxia (HU *et al.*, 2008; CHACKO *et al.*, 2010; DESCHEPPER *et al.*, 2011; PETERSON *et al.*, 2011). A estabilização desta proteína modula diversas vias de sinalização nas MSC, podendo proporcionar uma resposta adaptativa à redução da concentração de oxigênio (BURAVKOVA *et al.*, 2014). Estudos mostraram que a hipóxia pode induzir um modesto aumento nas relações Akt fosforilada/Akt e Bcl-2/Bax, bem como reduzir a relação ERK 1-2 fosforilada/ERK 1-2 (CHACKO *et al.*, 2010; PETERSON *et al.*, 2011). Adicionalmente, a superexpressão de HIF-1α em MSC protege contra a morte celular e a apoptose desencadeada por condições hipóxicas, ao passo que sua inibição apresenta efeito contrário (KIANI *et al.*, 2013).

Logo, diante dos resultados apresentados, as CeSaM, em um microambiente semelhante ao isquêmico, mantiveram a adesão e viabilidade celular, bem como continuaram proliferando mesmo em condições de ausência de soro e baixa concentração de oxigênio. Dessa forma, constituem uma opção terapêutica interessante e viável, uma vez que a ausência de soro não impactou negativamente na viabilidade celular, diferentemente das outras MSC já estudadas.

Na busca de um tipo celular ideal para a aplicação nas cardiopatias, MSC de diferentes fontes já foram administradas localmente ou sistemicamente, visando à regeneração cardíaca e são consideradas uma terapia promissora e emergente para o infarto do miocárdio. Entretanto, diferentes trabalhos já mostraram que a isquemia tecidual pode causar danos e morte celular, bem como seu desaparecimento, reduzindo o potencial terapêutico das MSC (VAN DER BOGT et al., 2008; NOORT et al., 2010; DE ALMEIDA et al., 2011). O transplante de células estromais mesenquimais derivadas de medula óssea em modelos de isquemia miocárdica provoca morte macica das células transplantadas em menos de 4 dias (TOMA et al., 2002). Resultados semelhantes foram descritos para as MSC derivadas da placenta no modelo de infarto do miocárdio: o sinal bioluminescente das células transplantadas desaparece em 3 dias (PASSIPIERI et al., 2014). Outro trabalho corrobora essas observações uma vez que somente 1% das MSC transplantadas estão presentes no coração de ratos infartados após 24 horas (MCGINLEY et al., 2013). Porém, os mecanismos que levam à perda de MSC ainda são desconhecidos.

Apesar de diversos estudos pré-clínicos já terem sido realizados nesta área (MAZHARI e HARE, 2007; BOYLE, 2006, GNECCHI *et al.*, 2005), até hoje não existe um protocolo padrão a ser adotado para a terapia com células-tronco no modelo de IM. Os dados obtidos até os dias atuais são variáveis e diversas questões ainda são levantadas, tais como o tipo celular mais adequado, dose ideal, via de administração e a janela temporal para injeção das células após o IM. Diante desse quadro científico, tanto em relação aos benefícios da injeção de células quanto aos mecanismos envolvidos quando há melhora da função cardíaca, mais estudos pré-clínicos utilizando modelos de indução do infarto do miocárdio são fundamentais para a melhor compreensão dos efeitos da terapia celular.

O infarto do miocárdio já foi induzido com sucesso em diversos modelos animais, tais como gatos, coelhos, roedores, cães e primatas (DIKSHIT *et al.*, 1987; DIKSHIT *et al.*, 1992; KLOCKE *et al.*, 2007). Entretanto, o modelo mais utilizado mundialmente é o infarto do miocárdio em roedores, devido ao fácil manuseio, habitação e menor custo envolvido na sua experimentação (BHINDI *et al.*, 2006). Vários métodos têm sido utilizados para induzir cirurgicamente o infarto do miocárdio, como o oclusor hidráulico em forma de anel, o catéter de balão intracoranário e a oclusão da coronária mediante ponto cirúrgico (KLOCKE *et al.*,

2007). Dentre esses, o procedimento mais amplamente utilizado é a ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda, a qual foi realizada pela primeira vez em animais de pequeno porte em 1954 (JOHNS e OLSON, 1954).

Na prática médica, a cirurgia de revascularização do miocárdica e a angioplastia coronariana, em conjunto com a terapia farmacológica, são amplamente utilizadas para o tratamento do infarto agudo do miocárdio. Nesse contexto, também foram adotadas abordagens a fim de permitir a reperfusão do miocárdio em modelos pré-clínicos. O primeiro trabalho relatando esse tipo de procedimento foi em caninos em 1960 por Jennings e colaboradores (1960). De forma semelhante aos modelos de IM, em animais de pequeno porte, a artéria coronária é ocluída mediante a realização de um ponto cirúrgico, entretanto um pequeno tubo de polietileno (PE-10) é colocado entre o vaso ligado e o nó, que permite a remoção mais fácil e segura da oclusão, sem lesar o miocárdio (KLOCKE *et al.*, 2007).

Dessa forma, a segunda parte deste trabalho consistiu em estudar o efeito das CeSaM no modelo de infarto do miocárdio por isquemia e reperfusão, avaliando se essas foram capazes diminuir essa produção de ERO, bem como modular a defesa antioxidante, reduzindo os danos às células locais. Devido às características vantajosas das CeSaM previamente discutidas, é plausível que essas células sobrevivam no ambiente hostil do infarto. Adicionalmente, cabe ressaltar que não há trabalhos na literatura utilizando as CeSaM no modelo de infarto por isquemia e reperfusão.

Para tal, estabelecemos o modelo de infarto do miocárdio por isquemia e reperfusão resultando no comprometimento da função elétrica e mecânica cardíaca. A isquemia pode ser verificada pela súbita palidez do miocárdio abaixo da região ocluída e por alterações no eletrocardiograma. Já a reperfusão é verificada pelo aparecimento de hiperemia na região previamente pálida, mediante a remoção da cânula e do ponto cirúrgico. O procedimento cirúrgico para a indução do infarto do miocárdio por I/R resultou em um índice de mortalidade de 36,6% (Figura 10). Dos animais sobreviventes (63,4%), 91% estavam infartados, uma vez que apresentaram inatividade elétrica da parede livre do ventrículo esquerdo, evidenciado pelo eletrocardiograma. O restante, que não apresentou alteração elétrica (9%), foi descartado do estudo.

Em seguida, os animais falso-operados e infartados que sobreviveram ao procedimento cirúrgico foram acompanhados para avaliar a sobrevivência por 28

dias e, ao final desse período, 3 falso-operados e 6 infartados permaneceram vivos, realizadas análises morfofuncionais do coração. sendo as Os exames ecocardiográficos (Figura 11) mostraram que a oclusão transiente da artéria coronária impactou negativamente na função cardíaca. O débito sistólico (DS), que é o volume de sangue ejetado a cada sístole, reduziu cerca de 40% nos animais infartados, indicando um prejuízo no volume de sangue ejetado. Por consequência, o volume que permanece na câmara cardíaca ao final da sístole (VSF) aumentou cerca de 3 vezes, entretanto volume diastólico final (VDF) permaneceu inalterado. Observou-se uma queda significativa do percentual de sangue ejetado a cada sístole (FE%), uma vez que nesse modelo existe uma redução do DS e manutenção VDF, estabilizando em torno de 42%, semelhante aos dados descritos por Arslan e colaboradores (2013).

Adicionalmente, neste trabalho a função mecânica cardíaca foi avaliada *ex vivo* pela técnica de Langendorff (Figura 12). Ao realizamos a análise da área sob a curva, foi evidenciada somente uma deficiência sistólica, uma vez que os animais infartados apresentaram menor área quando comparado aos animais falsooperados. Logo, 28 dias após da indução do infarto, os dados de pressão sistólica indicam menor capacidade contrátil.

A análise morfométrica realizada *post mortem*, ao final do protocolo experimental, mostrou que os animais infartados apresentaram depósito de colágeno (26,24 ± 8,24%) no ventrículo esquerdo, evidenciando a dimensão da área de infarto. Além disso, observamos que a lesão na parede livre do ventrículo foi transmural, o que contribui para a disfunção sistólica encontrada. As áreas de infarto encontradas nesse trabalho são homogêneas e semelhantes às áreas descritas em ratos por outros pesquisadores (YELLOW e HAUSENLOY, 2007; ARSLAN *et al.*, 2013), bem como às encontradas em camundongos (MICHAEL *et al.*, 1995).

Com o modelo de isquemia e reperfusão estabelecido e devidamente caracterizado histologicamente pela perda de músculo contrátil evidenciado pela fibrose cardíaca, bem como funcionalmente, pelo comprometimento da função sistólica do ventrículo esquerdo, prosseguimos o estudo caracterizando a produção ERO após reperfusão miocárdica.

A restauração do fluxo sanguíneo no miocárdio isquêmico atenua os danos gerados devido à isquemia, no entanto, pode gerar ainda mais danos por meio de mecanismos diferentes. Este fenômeno, designado de lesão de reperfusão do

miocárdio, pode reduzir paradoxalmente os efeitos benéficos da reperfusão do miocárdio (BRAUNWALD e KLONER, 1985; YELLOW e HAUSENLOY, 2007). Um dos mediadores dessa "lesão de reperfusão" é a formação de espécies reativas de oxigênio, que aumenta logo nos primeiros minutos de reperfusão do miocárdio, sendo produzidas por uma variedade de fontes (MCCORD, 1985; ZWEIER; FLAHERTY; WEISFELDT, 1984). Uma das consequências diretas da produção de ERO nas células cardíacas, durante a reperfusão, são a peroxidação lipídica, lesões proteicas, oxidação do DNA e a ativação de metaloproteases de matriz. Adicionalmente, a elevada geração de ERO induz a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, podendo resultar em alterações celulares irreversíveis e morte celular devido à liberação de fatores pró-apoptóticos (KALOGERIS; BAO; KORTHUIS, 2014).

Uma das proteínas responsáveis pela a grande produção de ERO durante a lesão de reperfusão é a NADPH oxidase, que constitui uma família de enzimas, associadas às membranas celulares, que catalisam a redução de oxigênio molecular utilizando NADPH como um doador de elétrons. No coração, já foi descrito que as NOX desempenham um papel crucial na mediação de efeitos patológicos, incluindo a apoptose, hipertrofia, fibrose e disfunção mitocondrial (MAEJIMA *et al.*, 2011), sendo NOX2 e NOX4 as principais.

Já se sabe que animais NOX2 ^{-/-}, quando infartados, apresentam redução da morte celular dos cardiomiócitos e melhora da sobrevivência dos animais, indicando que essa NADPH oxidase apresenta importância fundamental na geração do estresse oxidativo no infarto (AKKI *et al.*, 2009).

Outro estudo desenvolvido por Braunersreuther e cols. (2013) demonstrou que após isquemia e 24 horas de reperfusão, houve uma redução significativa no tamanho do infarto do miocárdio em animais NOX2^{-/-}, mas não em ratos NOX4^{-/-}. No entanto, nenhuma proteção foi observada no modelo de isquemia por oclusão permanente, o que indica que o dano oxidativo mediado por NOX2 ocorre durante a reperfusão. Por fim, o efeito cardioprotetor nos animais NOX2^{-/-} foi associado à diminuição de ERO no tecido e a fosforilação das moléculas Stat3 e Erk.

Adicionalmente, Matsushima et al. (2013) também mostrou diminuição da lesão miocárdica após isquemia/reperfusão em camundongos com deleção cardíaca especifíca de NOX2 e NOX4. Isso sugere que a NOX4 presente nos cardiomiócitos também desempenha um papel importante na mediação de lesão por I/R. Neste contexto, esses estudos que utilizaram os animais geneticamente modificados avaliaram, principalmente, o impacto da ausência de determinada NADPH oxidase na sobrevivência das células miocárdicas, bem como no remodelamento e função cardíaca. Complementarmente, alguns desses trabalhos quantificaram indiretamente a produção total ERO com sondas fluorescentes, entretanto, nenhum deles avaliou a atividade das NADPH oxidases na geração de ERO mediante lesão por isquemia e reperfusão.

Assim, neste trabalho, avaliamos a contribuição das NADPH oxidases no estresse oxidativo gerado no miocárdio, quantificando, de forma inédita, sua atividade no coração em diferentes tempos após a reperfusão. Como resultado obtivemos que, de fato, existe um aumento significativo na produção de ERO na área ao redor do infarto e na área infartada devido às NADPH oxidases (Figura 15). O aumento já era evidente 1 hora após a reperfusão em ambas as regiões, quando comparado aos animais falso-operados, mantendo-se elevado mesmo após 24 horas, não havendo diferença significativa na produção ERO nos diferentes tempo analisado.

Sendo assim, diante dos resultados previamente descritos neste trabalho, optamos por realizar a terapia celular no momento da reperfusão, ao invés de no ponto de maior produção de ERO. Para tal, as células foram injetadas por via intramiocárdica, uma vez que já foi demonstrado um maior percentual de MSC retidas no coração por essa via, quando comparado com a intracoronariana (HOU *et al.*, 2005). Dessa forma, investigamos se as CeSaM seriam capazes de atenuar a geração de ERO mediada pelas NADPH oxidases, bem como modular a atividade antioxidante miocárdica, uma vez que apresentam elevada resistência ao estresse oxidativo e alta atividade das enzimas antioxidantes.

Inicialmente, após 2 e 24 horas do restabelecimento do fluxo sanguíneo e administração concomitante das CeSaM, investigamos a expressão de NOX2 e NOX4 por RT-PCR quantitativo. A expressão de NOX5, presente em células endoteliais e musculares lisas, não foi avaliada neste estudo já que essa NADPH oxidase não é expressa em ratos (BEDARD e KRAUSE, 2007; LASSEGUE e CLEMPUS, 2003).

Após duas horas, a expressão de NOX2 e NOX4 foi semelhante entre os animais falso-operados e os infartados tratados ou não com as CeSaM, considerando tanto a borda do infarto quanto a área infartada (Figura 15).

Entretanto, após 24 horas houve um aumento significativo da expressão de NOX2 nos animais infartados tratados com CeSaM, tanto na borda quanto na área infartada, quando comparados ao falso-operados e aos animais infartados não tratados (Figura 17). Cabe ressaltar, que a CeSaM expressa NOX2, entretanto o primer é específico para rato. Adicionalmente, a maior expressão de NOX2 não necessariamente refletirá em maior atividade de geração de ERO pela NADPH oxidase, uma vez que a ativação de NOX2 ocorre por meio de uma série complexa de interações entre diferentes proteínas. Para tal, a NOX2 se associa constitutivamente com p22phox e é instável na ausência do mesmo. Em seguida, para ativação de NOX2 é necessária a translocação de fatores citosólicos para o complexo NOX2/p22phox. A fosforilação de p47phox conduz a uma alteração conformacional que permite interação com a p22phox e, adicionalmente, organiza a translocação de outros fatores citosólicos. A localização de p47phox na membrana favorece o contato de p67phox com NOX2, o qual é considerado o ativador da subunidade. Finalmente, subunidade p40phox e a GTPase Rac interagem com NOX2, permitindo a geração de ERO (BEDARD e KRAUSE, 2007).

Outra hipótese para explicar esse fato seria que a presença da célula mesenguimal humana derivada do sangue menstrual no tecido cardíaco do rato induziu um aumento de células inflamatórias no local. Logo, é possível que o aumento de expressão dessa NADPH oxidase seja devido aos neutrófilos e macrófagos que migraram para essas regiões, uma vez que essas células expressam principalmente NOX2. Entretanto, essa hipótese, apesar de possível, é pouco provável, uma vez que já está devidamente comprovado que as MSC apresentam um perfil imunomodulatório, sendo capazes de regular resposta imune do organismo in vitro e in vivo (LE BLANK e RINGDEN, 2007; HO et al, 2015; CARRILLO-GALVEZ et al., 2015). Especificamente, já foi demonstrado que diferenciação fenotípica dos monócitos em células dendríticas imaturas foi inibida mediante co-cultivo com esse tipo celular (BOZORGMEHR et al., 2014). Além disso, demonstrou-se que a adição das CeSaM após a estimulação de linfócitos com lipopolissacarídeos resulta na supressão da proliferação, inibição da secreção de IFN-γ e TNFα e estimulação da secreção de IL-4 (MURPHY et al., 2008). Outro fato que comprova que essas células não tenham gerado resposta inflamatória é a sua utilização em animais imunocompetentes sem a utilização de imunosupressores, resultando em benefícios terapêuticos (MURPHY et al., 2008, BORLONGAN et al., 2010). Indicando que mesmo em transplantes xenogênicos essas células modulam a resposta imune do hospedeiro evitando a rejeição.

Apesar de ocorrer um aumento na expressão de NOX2 mediante o tratamento com a célula, isso não refletiu em uma maior produção de ERO pelas NADPH oxidases, sendo semelhante entre animais infartados tratados ou não com CeSaM, em ambos tempos pós reperfusão analisados, independente da região analisada (Figura 17). Esse resultado sugere um possível papel antioxidante das CeSaM, modulando negativamente a produção de ERO pelas NADPH oxidases, 24 horas pós reperfusão, uma vez que o possível aumento da atividade dessa enzima foi inibido pela ação antioxidante da célula.

A elevada produção de ERO pelas NADPH oxidases no infarto do miocárdio por isquemia e reperfusão é prejudicial, uma vez que pode desencadear a apoptose ou necrose, por meio de danos ao DNA, lípidios, proteínas, bem como por meio da ativação de moléculas sinalizadoras ativadas por ERO. Essa sinalização próapoptótica das ERO pode ocorrer por meio da ativação de MAP quinases (BEDARD; KRAUSE, 2007). Adicionalmente, as ERO derivadas das NADPH oxidases vêm sendo sugeridas como reguladores dos canais de cálcio presentes na membrana plasmática (ZIMMERMAN *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2004), bem como os intracelulares (receptor de rianodina) (YI *et al.*, 2006), promovendo um aumento ainda maior de cálcio citoplasmático durante a reperfusão miocárdica, contribuindo ainda mais para o fenômeno de hipercontratura, ativação de proteases e abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial.

Fisiologicamente, o coração normal apresenta uma capacidade significativa de neutralizar as espécies reativas de oxigênio que estão sendo geradas em condições basais. No entanto, em situação patológicas, a defesa antioxidante não consegue conter a quantidade de ERO em excesso (HILL e SINGAL, 1996). Nesse sentido, foi demonstrado, em corações de ratos, que os níveis de superóxido dismutase, catalase, glutationa peroxidase estavam diminuídos após IM (HILL e SINGAL, 1997; SUN, 2009). Entretanto, existem outros trabalhos demonstrando que a atividade dessas enzimas antioxidantes permanecem inalteradas após a reperfusão tecidual (FERRARI *et al.*, 1985; HARAMAKI *et al.*, 1998).

A enzima antioxidante glutationa peroxidase desempenha um papel significativo na eliminação do H₂O₂ no coração, uma vez que sua atividade é muito maior que a da catalase. Um estudo utilizando camundongos knockout confirmou o

papel essencial da glutationa peroxidase na cardioproteção contra a injúria pós isquemia e reperfusão. Os animais transgênicos reduziram significativamente a força desenvolvida do coração, bem como apresentaram um aumento do tamanho da área infartada após 120 minutos de reperfusão (YOSHIDA et al., 1996).

A catalase é uma enzima intracelular presente nos peroxissomos, entretanto, a sua atividade foi também observada na matriz mitocondrial (STEARE; YELLON, 1993). Os efeitos protetores da catalase endógena na isquemia e reperfusão são controversos na literatura, alguns trabalhos mostram benefícios dessa enzima na redução da geração H₂O₂, arritmias e peroxidação lipídica (NOHL, 1980; MOCANU *et al.*, 1993), enquanto outros estudos não observaram tais efeitos (KARMAZYN *et al.*, 1990; KONOREV *et al.*, 1993).

Já a superóxido dismutase exerce no coração um papel fundamental na conversão do O₂•• em H₂O₂, sendo encontrada no citoplasma (SOD1), no interior das mitocôndrias (SOD2), bem como no meio extracelular (SOD3). Já foi demonstrado que a administração de SOD e catalase, em conjunto, impediu as alterações na função do miocárdio, preservando a função das bombas que compõem o retículo sarcoplasmático em corações isolados de ratos submetidos à isquemia seguida de reperfusão (TEMSAH *et al.*, 1999).

Outros antioxidantes endógenos, incluindo a vitamina E (tocoferóis), vitamina C (ácido ascórbico) e vitamina A (retinol) também estão presentes no miocárdio (KEANEY, SIMON, FREEDMAN, 1999; NESS, POWLES, KHAW, 1996; PALACE *et al.*, 1999).

Neste contexto, uma alternativa naturalmente plausível para atenuar ou prevenir o estresse oxidativo, após injúria de isquemia e reperfusão, é a terapia antioxidante, enzimática ou não (YELLON; HAUSENLOY, 2007).

Algumas abordagens genéticas com antioxidantes em modelos pré-clínicos atenuaram o remodelamento cardíaco, como, por exemplo, a superexpressão de glutationa peroxidase (YOSHIDA *et al.*, 1996; SHIOMI *et al.*, 2004), superóxido dismutase (CHEN *et al.*, 1998), bem como a transferência cardíaca de vetores com genes que codificam SOD e catalase (WOO *et al.*, 1998).

Atualmente, já foram realizados diversos estudos clínicos com antioxidantes em um grande número de pacientes antes da intervenção coronariana ou após trombólise, entretanto, os resultados são conflitantes. Alguns estudos observaram que a administração de edaravone e alopurinol melhora a função cardíaca e atenua
o estresse oxidativo tecidual (TSUJITA *et al.*, 2006, GUAN *et al.* 2003). Em contraste, inúmeros estudos utilizando enzimas antioxidantes ou diversas doses de diferentes vitaminas não demonstraram benefícios (RAPOLA *et al.*, 1997; BAILEY *et al.*, 2006; VIVEKANANTHAN *et al.*, 2003, COOK *et al.*, 2007; SESSO *et al.*, 2008; YUSUF, 2000).

Existem algumas razões para esse fracasso terapêutico, tais como: administração por via oral, o que dificulta a entrada no sistema vascular, a incapacidade do antioxidante para entrar na célula-alvo, a meia vida curta, bem como a conversão dos antioxidantes em agentes pró-oxidantes mediante a presença de radicais livres (KLEIKERS *et al.*, 2012). Adicionalmente, uma vez que esses estudos empregaram condições experimentais diferentes, como a gravidade do infarto, a duração e/ou protocolo de isquemia e reperfusão e os métodos de análise antioxidante, é esperado que os resultados sejam variáveis. Logo, os diferentes resultados dos estudos já realizados dificultam a compreensão de como o sistema de defesa antioxidante do tecido cardíaco opera contra a lesão provocada por radicais livres.

Assim, neste trabalho observou-se também o impacto das CeSaM na atividade das enzimas antioxidantes no tecido cardíaco após a injúria de isquemia e reperfusão. Essas células poderiam contribuir para redução do estresse oxidativo, uma vez que apresentam elevada atividade antioxidante, principalmente a enzima catalase, eliminando parte das ERO que estão sendo produzidas em excesso. Adicionalmente, poderiam modular positivamente a defesa antioxidante do próprio tecido cardíaco.

Assim, os níveis de transcritos de várias enzimas antioxidantes no nível do RNA mensageiro foram avaliados. Duas horas após a reperfusão, observamos que somente a área infartada apresentou redução significativa na expressão da SOD2 quando comparados ao animais falso-operados e infartados tratados com CeSaM (Figura 20). Isso indica que o processo de isquemia e reperfusão pode contribuir para um comprometimento dos níveis de superóxido dismutase presente nas mitocôndrias. Consequentemente, aumentam a chance de abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, uma vez que é possível que a detoxificação das espécies reativas de oxigênio neste local esteja prejudicada, podendo gerar morte celular. Cabe ressaltar que os animais infartados e tratados com a célula, não apresentaram essa redução, indicando um possível benefício das CeSaM na manutenção da expressão da SOD2 no miocárdio. Entretanto, 24 horas após a reperfusão, não observamos essa redução de SOD2 na região infartada dos animais falso-operados, indicando que possivelmente as próprias células cardíacas restauraram a expressão dessa enzima. Entretanto, é provável que os danos anteriores, devidos à sua redução, tenham permanecido.

Além disso, 24 horas após a reperfusão, somente a área infartada dos animais infartados tratados com CeSaM apresentaram aumento significativo na expressão de GPX1 quando comparados aos animais falso-operados (Figura 22). Vale ressaltar que a glutationa peroxidase é de extrema importância no coração uma vez que sua atividade é bastante elevada no músculo cardíaco. O aumento de sua expressão devido ao tratamento com as células é bastante entusiasmante, considerando que isso pode resultar na redução do estresse oxidativo no tecido cardíaco, potencialmente reduzindo a morte dos cardiomiócitos e lesões vasculares neste tipo de injúria.

Neste estudo também foram determinadas as atividades das enzimas da catalase, superóxido dismutase e glutationa peroxidase, em ambas as áreas analisadas, foram semelhantes ao compararmos os grupos infartados tratados ou não com CeSaM (Figura 23). Adicionalmente, os animais infartados não tratados mantiveram as atividades das enzimas antioxidantes semelhantes ao grupo *sham*, 24 horas pós reperfusão, corroborando com outros trabalhos da literatura (FERRARI *et al.*, 1985; HARAMAKI *et al.*, 1998). Entretanto, há um aumento significativo da atividade da GPX ao compararmos os animais infartados tratados com CeSaM e o grupo *sham*, indicando que possivelmente essas células podem apresentar um efeito antioxidante benéfico na fisiopatologia do infarto. Vale salientar que atualmente, não há na literatura trabalhos que estudem o efeito das MSC na defesa antioxidante cardíaca *in vivo*.

Também concluímos que a administração de células estromais mesenquimais derivadas do sangue menstrual, no modelo de infarto por isquemia e reperfusão, não atenuou significativamente a produção elevada de ERO pelas NADPH oxidases quando comparado aos animais infartados não tratados. Entretanto, mais estudos são necessários para avaliar se ocorreu aumento da atividade de NOX, devido ao aumento de expressão de NOX2 mediante ao tratamento. Adicionalmente, se essa produção de ERO foi atenuada pelo efeito antioxidante das CeSaM, modulando negativamente as subunidades ativadoras das NADPH oxidases, levando ao

resultado encontrado. Contudo, é factível também que as CeSaM possam interagir com outras vias produtoras de ERO, atenuando sua ativação e/ ou produção, bem como detoxificar parte da grande quantidade de espécies reativas que estão sendo produzidas no miocárdio por meio de suas enzimas antioxidantes.

Por fim, ainda é possível que as CeSaM possam gerar benefício terapêutico funcional no modelo de isquemia e reperfusão cardíaco. Tal possibilidade já foi demonstrada em alguns trabalhos, uma vez que as MSC são capazes de secretar fatores angiogênicos e anti-apoptóticos, tais como fatores de crescimento, citocinas, mRNA, miRNA e exossomos (RATAJCZAK *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2016) favorecendo a sobrevivência das células cardíacas, bem como liberar metaloproteinases de matriz, que apresentam um efeito antifibrótico (QUEVEDO *et al.*, 2009). A injeção de MSC no miocárdio infartado de ratos, uma semana após I/R, diminuiu o tamanho do infarto (TANG *et al.*, 2006). Já a administração de exossomos derivados de MSC regularam elementos chaves da lesão de reperfusão por meio da sinalização parácrina, promovendo aumento nos níveis de ATP e NADH, redução da morte celular e do estresse oxidativo (ARSLAN *et al.*, 2013). Experimentos em corações isolados submetidos à I/R também revelaram o efeito parácrino protetor das MSC, mediado pela via fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) (ANGOULVANT *et al.*, 2011).

Assim, esse conjunto de dados sugere que diferentes intervenções terapêuticas ainda podem ser realizadas com as CeSaM, visando reduzir os danos gerados pela isquemia e reperfusão do miocárdio.

Conclusões

1) As CeSaM cultivadas em um microambiente semelhante ao isquêmico mantiveram a adesão e viabilidade celular, bem como continuaram proliferando mesmo em condições de baixa concentração de oxigênio e ausência de soro. Adicionalmente, o cultivo com 1% de oxigênio ou a ausência de soro, reduziu apenas modestamente as atividades de algumas enzimas antioxidantes. Dessa forma, as CeSaM podem ser consideradas uma opção terapêutica em potencial para doenças isquêmicas.

2) O modelo de infarto do miocárdio por isquemia/ reperfusão foi realizado com sucesso, uma vez que as áreas de infarto obtidas impactaram negativamente na função sistólica cardíaca. Além disso, a produção de ERO pelas NADPH oxidases elevou-se nas primeiras horas após isquemia e reperfusão tanto na borda como na área infartada. Entretanto, a terapia realizada com as MSC derivadas do sangue menstrual, no momento da reperfusão, não reduziu a produção de ERO, bem como não aumentou a atividade das principais enzimas antioxidantes cardíaca. Contudo, ainda é possível que as CeSaM sejam capazes de agir por meio de outros mecanismos parácrinos, não avaliados neste estudo, atenuando o remodelamento cardíaco.

Referências Bibliográficas

ABDUL KADIR, S. H. *et al.* Embryonic stem cell-derived cardiomyocytes as a model to study fetal arrhythmia related to maternal disease. *J Cell Mol Med*, v.13, n. 9B, p. 3730-3741, sep. 2009.

AEBI, H. Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology*, v.105, p. 121-126, 1984.

AGOSTINI, C. Stem cell therapy for chronic lung diseases: hope and reality. *Respir Med*, v. 104, n. s1, p. S86–S91, jul. 2010.

AKKI, A. *et al.* NADPH oxidase signaling and cardiac myocyte function. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, v. 47, p. 15–22, 2009.

ANGELOS, M. G. *et al.* Hypoxic reperfusion of the ischemic heart and oxygen radical generation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 290, n. 1, p. 341–347, jan. 2006.

ANGOULVANT, D, *et al.* Mesenchymal stem cell conditioned media attenuates in vitro and ex vivo myocardial reperfusion injury. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, v. 30, n. 1, p. 95-102, jan. 2011.

ARSLAN, F. *et al.* Mesenchymal stem cell-derived exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress and activate PI3K/Akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Research*, v. 10, n. 3, p. 301–312, may. 2013.

ASENSI, K. D. *et al.* Reprogramming to a pluripotent state modifies mesenchymal stem cell resistance to oxidative stress. *J Cell Mol Med*, v. 18, n. 5, p. 824-31, feb. 2014.

BAILEY, D. M, *et al.* Vitamin C prophylaxis promotes oxidative lipid damage during surgical ischemia–reperfusion. *Free Radic Biol Med,* v. 40, n. 4, p. 591–600, feb. 2006.

BAINES, C. P. The cardiac mitochondrion: nexus of stress. *Annu Rev Physiol*, v. 72, p. 61–80. 2010.

BAINES, C. P. The mitochondrial permeability transition pore and ischemia-reperfusion injury. *Basic Res. Cardiol*, v. 104, n. 2, p. 181–188, mar. 2009a.

BAINES, C. P. The molecular composition of the mitochondrial permeability transition pore. *J Mol Cell Cardiol*, v. 46, n. 6, p. 850–857, jun. 2009b.

BARTUNEK, J. *et al.* Cardiopoietic stem cell therapy in heart failure The C-CURE multicenter randomized trial with lineage-specified biologics. *J Am Coll Cardiol*, v. 61, n. 23, p. 2329-38, jun. 2013.

BEDARD, K, KRAUSE, K. H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev,* v. 87, n. 1, p. 245–313, jan. 2007.

BELL, R. M; MOCANU, M. M.; YELLON, D. M. Retrograde heart perfusion: The Langendorff technique of isolated heart perfusion. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, v. 50, n. 6, p. 940-950, jun. 2011.

BHINDI, R, et al. Rat models of myocardial infarction. Pathogenetic insights and clinical relevance. *Thromb Haemost*, v. 96, n. 5, p. 602-10, nov. 2006.

BIANCO, P, ROBEY, P. G, SIMMONS, P. J. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*, v. 2, n. 4, p. 313–319, apr. 2008.

BOERSMA, E. *et al.* Early thrombolytic treatment in acute myocardial infarction: reappraisal of the golden hour. *Lancet*, v. 348, n. 9030, p. 771–775, sep. 1996.

BORLONGAN, C. V. *et al.* Menstrual blood cells display stem cell like phenotypic markers and exert neuroprotection following transplantation in experimental stroke. *Stem Cells Dev*, v. 9, n. 4, p. 439-452, apr. 2010.

BOYLE AJ, *et al.* Is stem cell therapy ready for patients Stem Cell Therapy for Cardiac Repair. Ready for the Next Step. *Circulation*, v. 114, n. 4, p. 339-52, jul. 2006.

BOZORGMEHR, M, *et al.* Menstrual blood-derived stromal stem cells inhibit optimal generation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Immunology letters*, v. 162, p. 239-246, dec. 2014.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. *Analitical Biochemistry*, v. 7, n. 72, p. 248-254, may. 1976.

BRANDES, R. P, WEISSMANN, N, SCHRÖDER, K. Redox-mediated signal transduction by cardiovascular Nox NADPH oxidases. *J Mol Cell Cardiol*, v. 73, p. 70–79, aug. 2014.

BRAUNERSREUTHER, V, *et al.* Role of NADPH oxidase isoforms NOX1, NOX2 and NOX4 in myocardia ischemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*, v. 64, p. 99-107, nov. 2013

BRAUNWALD, E, KLONER, R. A. Myocardial reperfusion: a double-edged sword? *J Clin Invest*, v. 76, n. 5, p. 1713–1719, nov. 1985.

BRAUNWALD, E. The war against heart failure: the Lancet lecture. *Lancet*, v. 385, n. 9970, p. 812-824, feb. 2015

BULKLEY, G. B. Free radical-mediated reperfusion injury: a selective review. *Br J Cancer Suppl, v.* 8, p. 66–73, jun. 1987.

BURAVKOVA, L. B, *et al.* Mesenchymal stem cells and hypoxia: Where are we? *Mitochondrion*, v. 19, p. 105-12, nov. 2014

BUTLER, D. UN targets top killers. *Nature*, v. 477, n. 7364. p. 260-261, sep. 2011.

BYRNE, J. A. et al. Oxidative stress and heart failure. Arch Mal Coeur Vaiss, v. 96, n. 3, p. 214–221, mar. 2003.

CAMPAGNOLI, C. *et al.* Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*, v. 98, n. 8, p. 2396-2402, oct. 2001.

CANTON, M. et al. Oxidation of myofibrillar proteins in human heart failure. J. Am Coll Cardiol, v. 57, n. 3, p. 300–309, jan. 2011.

CAPLAN AL, SORRELL JM. The MSC curtain that stops the immune system. *Immunol Lett*, v. 168, n. 2, p. 136-9, dec. 2015.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. J Orthop Res, v. 9, n. 5, p. 641–650, sep. 1991.

CARRILLO-GALVEZ, A. B, *et al.* Mesenchymal stromal cells express GARP/LRRC32 on their surface: effects on their biology and immunomodulatory capacity. *Stem Cells*, v. 33, n. 1, p. 183-95, jan. 2015.

CHACKO, S. M, *et al.* Hypoxic preconditioning induces the expression of prosurvival and proangiogenic markers in mesenchymal stem cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*, v. 299, n. 6, p. C1562–C1570, dec. 2010

CHEN, S. L. *et al.* Improvement of cardiac function after transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in patients with acute myocardial infarction. *Chin Med J*, v. 117, n. 10, p. 1443-1448, oct. 2004.

CHEN, Z. *et al.* Overexpression of MnSOD protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol*, v. 30, n. 11, p. 2281–2289, nov. 1998.

CHIU, R. C, ZIBAITIS, A, KA, R.L. Cellular cardiomyoplasty: myocardial regeneration with satellite cell implantation. *Ann Thorac Surg*, v. 60, n. 1, p. 12-8, jul. 1995.

CHULLIKANA, A. *et al.* Randomized, double-blind, phase I/II study of intravenous allogeneic mesenchymal stromal cells in acute myocardial infarction. *Cytotherapy*, v. 17, n. 3, p. 250-61, mar. 2015.

CONTRERAS, L. *et al.* Mitochondria: the calcium connection. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1797, n. 7, p. 607–618, jul. 2010.

COOK, N. R. *et al.* A randomized factorial trial of vitamins C and E and beta carotene in the secondary prevention of cardiovascular events in women: results from the Women's Antioxidant Cardiovascular Study. *Arch Intern Med.* v. 167, n. 15, p. 1610–1618, aug. 2007.

COWAN, C. A. *et al.* Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *N Engl J Med.* v. 350, n. 13, p. 1353-1356, mar. 2004.

CRAPO, J. D, MC CORD, J. M, FRIDOVICH, I. Preparation and assay of superoxide dismutases. *Methods in Enzymology*, v. 53, p. 382-393, 1978.

CROALL D. E, ERSFELD. K. The calpains: modular designs and functional diversity. *Genome Biol*, v. 8, n. 6, p. 218, 2007.

CUI, C. H. *et al.* Menstrual blood-derived cells confer human dystrophin expression in the murine model of Duchenne muscular dystrophy via cell fusion and myogenic transdifferentiation. *Mol Biol Cell*, v. 18, n. 5, p. 1586-1594, maio. 2007.

DARZI, S, *et al.* Osteogenic differentiation of stem cells derived from menstrual blood versus bone marrow in the presence of human platelet releasate. *Tissue Eng Part A*, v. 18 n. 15-16, p. 1720-8, aug. 2012.

DE ALMEIDA, P. E, VAN RAPPARD, J. R, WU, J. C. In vivo bioluminescence for tracking cell fate and function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 301, n. 3, p. H663 – H671, sep. 2011.

DESCHEPPER, M, *et al.* Survival and function of mesenchymal stem cells (MSCs) depend on glucose to overcome exposure to long-term, severe and continuous hypoxia. *J. Cell. Mol. Med*, v. 15, n. 7, p.1505–1514, jul. 2011.

DHALLA, N. S, *et al.* Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, v. 47, n. 3, p. 446-456, aug. 2000.

DHARMASAROJA, P. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the treatment of ischemic stroke. *J. Clin. Neurosci, v.* 16, n. 1, p. 12–20. 2009.

DIKALOV, S, GRIENDLING, K. K, HARRISON, D. G. Measurement of Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Studies. *Hypertension, v.* 49, n. 4, p. 717-727, apr. 2007.

DIKSHIT, M, *et al.* Effect of quinidine on myocardial enzyme activities following myocardial infarction in the cat. *Indian J Med Res*, v. 85, p. 85-90, jan. 1987.

DIKSHIT, M, *et al.* Free radical scavenger mechanisms in experimentally induced ischemia in the rabbit heart and protective effect of verapamil. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, v. 318, p. 55-65, jul. 1992.

DOBACZEWSKI, M, GONZALEZ-QUESADA, C, FRANGOGIANNIS, N. G. The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*, v. 48, n. 3, p. 504 – 511, mar. 2010.

DOMINICI, M, *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, v. 8, n. 4, p. 315-7. 2006.

EKELUND, U. E. *et al.* Intravenous allopurinol decreases myocardial 66. oxygen consumption and increases mechanical efficiency in dogs with pacing-induced heart failure. *Circ Res, v.* 85, n. 5, p. 437–445, sep. 1999.

ELTZSCHIG, H. K, COLLARD, C. D. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *Br Med Bull*, v. 70, p. 71–86, oct. 2004.

ERICES, A, CONGET, P, MINGUELL, J. J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br. J. Haematol*, v. 109, n. 1, p. 235–242. 2000.

ESPORCATTE, B. L. B, *et al.* Ecocardiograma de Alta Resolução e o Modelo de Infarto do Miocárdio em Camundongos. *Rev bras ecocardiogr imagem cardiovasc*, v. 23, n. 3, p. 18-24. 2010.

FERRARI, R, *et al.* Oxygen-mediated myocardial damage during ischaemia and reperfusion: role of the cellular defences against oxygen toxicity. *J Mol Cell Cardiol,* v. 17, n. 10, p. 937–945, oct. 1985.

FINKEL, T. Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol*, v. 15, n. 2, p. 247–254, apr. 2003.

FISCHER, B, BAVISTER, B. D. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J Reprod Fertil*, v. 99, n. 2, p. 673–9, nov. 1993.

FLETCHER, P. J, *et al.* Left ventricular diastolic pressure-volume relations in rats with healed myocardial infarction. *Circ Res*, v. 49, n. 3, p. 618-626, sep. 1981.

FLOHÉ, L. GÜNZLER, W. A. Assays of Glutathione Peroxidase. *Methods in Enzymology*, v. 105, p. 114-121, 1984.

FORTUNATO, R. S, *et al.* Functional consequences of dual oxidase-thyroperoxidase interaction at the plasma membrane. J. Clin Endocrinol Metab, v. 95, n. 12, p. 5403-11, dec. 2010.

FRANGOGIANNIS, N. G, SMITH, C. W, ENTMAN, M. L. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res*, v. 53, n. 1, p. 31-47, jan. 2002.

FRANTZ, S, BAUERSACHS, J, ERTL, G. Post-infarct remodelling: contribution of wound healing and inflammation. *Cardiovascular Research*, v. 81, n. 3, p. 474–481, feb. 2009.

FRANTZ, S. *et al.* Left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice with targeted deletion of the NADPH oxidase subunit gp91(PHOX). *Basic Res Cardiol*, v. 101, n. 2, p. 127-132, mar. 2006.

FRIEDENSTEIN, A. J. *et al.* Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopietic organs. *Exp Hematol*, v. 4, n. 5, p. 267-274, sep. 1976.

FUKUI, T. *et al.* Expression of *p22-phox* and *gp91-phox,* essential components of NADPH oxidase, increases after myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 281, n. 5, p. 1200–1206, mar. 2001.

GANDIA, C, *et al.* Human Dental Pulp Stem Cells Improve Left Ventricular Function, Induce Angiogenesis, and Reduce Infarct Size in Rats with Acute Myocardial Infarction. *Stem cells*, v. 26, n. 3, p. 635-45, mar. 2008.

GAO, L. R, *et al.* Intracoronary infusion of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in acute myocardial infarction: double-blind, randomized controlled trial. *BMC Med*, v. 13, p. 162-177, jul. 2015.

GENG, Y. J. Molecular mechanisms for cardiovascular stem cell apoptosis and growth in the hearts with atherosclerotic coronary disease and ischemic heart failure. *Ann N Y Acad Sci*, v. 1010, p. 687–697, dec. 2003.

GINKS, W. R, *et al.* Coronary artery reperfusion. II. Reduction of myocardial infarct size at 1 week after the coronary occlusion. *J Clin Invest*, v. 51, n. 10, p. 2717–2723, oct. 1972.

GNECCHI, M, *et al.* Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med,* v. 11, n. 4, p. 367–8, apr. 2005.

GRIENDLING, K. K, Sorescu, D, Ushio-Fukai, M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* v. 86, n. 5, p. 494–501, mar. 2000.

GRIEVE, D. J, BYRNE, J. A, CAVE, A. C, SHAH, A. M. Role of oxidative stress in cardiac remodelling after myocardial infarction. *Heart Lung Circ*, v. 13, n. 2, p. 132–138, jun. 2004.

GRIEVE, D. J, SHAH, A. M. Oxidative stress in heart failure more than just damage. *Eur Heart J*, v. 24, n. 24, p. 2161–2163, dec. 2003.

GUAN, W, et al. Effect of allopurinol pretreatment on free radical generation after primary coronary angioplasty for acute myocardial infarc- tion. J Cardiovasc Pharmacol, v. 41, n. 5, p. 699-705, may. 2003.

GURDON, J. B, MELTON, D. A. Nuclear reprogramming in cells. *Science*, v. 322, n. 5909, p. 1811-1815, dec. 2008.

GUZY, R.D, SCHUMACKER, P.T. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp. Physiol*, v. 91, n. 5, p. 807–819, sep. 2006.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans*, v. 35, n. 5, p. 1147-1150, nov. 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radical Biology and Medicine, 4. ed. New York: Clarendon Press, 2007. 880 p.

HARAMAKI, N, *et al.* Networking antioxidants in the isolated rat heart are selectively depleted by ischemia – reperfusion. *Free Radic Biol Med*, v. 25, n. 3, p. 329 – 339, aug. 1998.

HAUSENLOY, D. J, YELLON, D. M. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *The Journal of Clinical Investigation*. v. 123, n. 1, p. 92-100, jan. 2013.

HAUSENLOY, D. J, YELLON, D. M. The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*, v. 35, n. 4, p. 339–341, apr. 2003.

HEUSCH, G, BOENGLER, K, SCHULZ, R. Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening: the Holy Grail of cardioprotection. *Basic Res Cardiol.* v. 105, n. 2, p. 151–154, mar. 2010.

HEYMES, C. *et al.* Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure. *J Am Coll Cardiol.* v. 41, n. 12, p. 2164–2171, jun. 2003.

HIDA, N. *et al.* Novel cardiac precursor-like cells from human menstrual bloodderived mesenchymal cells. *Stem Cells*, v. 26, n. 7, p. 1695-1704, jul. 2008.

HILL, M. F, SINGAL, P. K. Antioxidant and oxidative stress changes during heart failure subsequent to myocardial infarction in rats. *Am J Pathol*, v. 148, n. 1, p. 291–300, jan. 1996.

HILL, M. F, SINGAL, P. K. Right and left myocardial antioxidant responses during heart failure subsequent to myocardial infarction. *Circulation. v.* 96, n. 7, p. 2414–2420, oct. 1997.

HO, M. S, MEI, S. H, STEWART, D. J. The Immunomodulatory and Therapeutic Effects of Mesenchymal Stromal Cells for Acute Lung Injury and Sepsis. *J Cell Physiol*, v. 230, n. 11, p. 2606-17, nov. 2015.

HOLZWARTH, C, *et al.* Low physiologic oxygen tensions reduce proliferation and differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells. *BMC Cell Biol*, v. 11, p. 11. 2010.

HORI, M. E, NISHIDA, K. Oxidative stress and left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Cardiovascular Research*, v. 81, p.457–464, feb. 2009.

HORI, M. *et al.* Infarct size and left ventricular ejection fraction in acute myocardial infarction. Jpn Circ J, v. 41, n. 11, p. 1299-1309, nov. 1977.

HOU, D, et al. Radiolabeled cell distribution after intramyocardial, intracoronary, and interstitial retrograde coronary venous delivery: implications for current clinical trials. *Circulation*, v. 112, n. 9, p. 1150–1156, aug. 2005.

HU, X, *et al.* Transplantation of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells improves infarcted heart function via enhanced survival of implanted cells and angiogenesis. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg*, v. 135, n. 4, p. 799–808, apr. 2008.

IBÁÑEZ, B. *et al.* Evolving Therapies for Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *J Am Coll Cardiol*, v. 65, n. 14, p. 1454-1471, apr. 2015.

IVANOVIC, Z. Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigma. J Cell Physiol, v. 219, n. 2, p.271-5, may. 2009.

JENNINGS, R. B, *et al.* Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol*, v. 70, p. 68-78, jul. 1960.

JOHNS, T. N, OLSON, B. J. Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals. *Ann Surg*, v. 140, n. 5, p. 675-82, nov. 1954.

JOSEPHSON, R. A, *et al.* Study of the mechanisms of hydrogen peroxide and hydroxyl free radical-induced cellular injury and calcium overload in cardiac myocytes. *J Biol Chem, v. 266, n. 4, p.* 2354–2361, feb. 1991.

KABE, Y. *et al.* Redox regulation of NF-kB activation: distinct redox regulation between the cytoplasm and the nucleus. *Antioxid Redox Signal, v.* 7, n. 4, p. 395–403, mar. 2005.

KALOGERIS, T, BAO, Y, KORTHUIS, R. J. Mitochondrial reactive oxygen species: a double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning. *Redox Biology*, v. 2, p. 702–714, jun. 2014.

KALOGERIS, T. *et al.* Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury. *Int Rev Cell Mol Biol.* v. 298, p. 229–317, 2012.

KARMAZYN, M, MAILER, K, CURRIE, R. W. Acquisition and decay of heat-shockenhanced postischemic ventricular recovery. *Am J Physiol*, n. 259, v. 2, p. H424– H431, aug. 1990.

KEANEY, J. F. JR, SIMON, D. I, FREEDMAN, J. E. Vitamin E and vascular homeostasis: implications for atherosclerosis. *FASEB J*, v. 13, n. 9, p. 965 – 975, jun 1999.

KEITH, B, SIMON, M. C. Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. *Cell*, v. *129*, n. 3, p. 465–472, may. 2007.

KIANI, A. A, *et al.* HIF-1alpha confers resistance to induced stress in bone marrowderived mesenchymal stem cells. *Arch. Med. Res,* v. 44, n. 3, p. 185–193, apr. 2013.

KIM, J. H, *et al.* The Pivotal Role of Reactive Oxygen Species Generation in the Hypoxia-Induced Stimulation of Adipose-Derived Stem Cells. *Stem Cells Dev*, v. 20, n. 10, p. 1753-61, oct. 2011.

KLEIKERS, P. W. M, *et al.* NADPH oxidases as a source of oxidative stress and molecular target in ischemia/reperfusion injury. J Mol Med (Berlin) 2012 Dec;90(12):1391-406.

KLOCKE, R, *et al.* Surgical animal models of heart failure related to coronary heart disease. *Cardiovasc Res*, v. 74, n. 1, p. 29-38, apr. 2007.

KONOREV, E. A, *et al.* Intracellular catalase inhibition does not predispose rat heart to ischemia–reperfusion and hydrogen peroxide-induced injuries. *Free Radic Res Commun*, v. 19, n. 6, p. 397 – 407. 1993.

KOSZTOWSKI, T., ZAIDI, H. A., Quinones-Hinojosa, A. Applications of neural and mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Expert Rev. Anticancer Ther*, v. *9*, n. 5, p. 597–612, may. (2009).

KRAUSE, K. *et al.* Stem Cell Therapy in Cardiovascular Disorders. Cardiovasc Ther. v. 28, p. 101–110, oct. 2010.

KUMAR, S, VAIDYA, M. Hypoxia inhibits mesenchymal stem cell proliferation through HIF1a-dependent regulation of P27. *Mol Cell Biochem*, v. 415, p. 29-38, apr. 2016.

LANDMESSER, U. *et al.* Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest*, v. 113, 8, n. 8, p. 1201–1209, apr 2003.

LASSEGUE, B, CLEMPUS, R. E. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 285, n. 2, p. R277–R297, aug 2003.

LATE_STUDY_GROUP. Late Assessment of Thrombolytic Efficacy (LATE) study with alteplase 6–24 hours after onset of acute myocardial infarction. *Lancet*, v. 342, n. 8874, p. 759–766, sep. 1993.

LE BLANC, K, RINGDEN, O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Intern Med,* v. 262, n. 5, p. 509 – 525, nov. 2007.

LEE, A. S. *et al.* Effects of cell number on teratoma formation by embryonic stem cells. *Cell Cycle*, v. 8, n. 16, p. 2608-2612, aug. 2009.

LI, L, *et al.* How to Improve the Survival of Transplanted Mesenchymal Stem Cell in Ischemic Heart? *Stem Cells International,* Article ID 9682757, 14 p. 2016.

LIN, Q, et al. Oxygen and Cell Fate Decisions. Gene Regul. Syst. Biol., v. 10, n. 2, p. 43–51, feb. 2008.

LUND, P, *et al.* Effect of growth media and serum replacements on the proliferation and differentiation of adipose-derived stem cells. *Cytotherapy*, v. 11, n. 2, p. 189–197, jun. 2009.

MA T, et al. Hypoxia and stem cell-based engineering of mesenchymal tissues. *Biotechnol Prog*, v. 25, n. 1, p. 32–42, jan. 2009.

MA, X. L. *et al.* Peroxynitrite aggravates myocardial reperfusion injury in the isolated perfused rat heart. *Cardiovasc Res,* v. 36, n. 2, p. 195 – 204, nov 1997.

MAEJIMA, Y. *et al.* Regulation of myocardial growth and death by NADPH oxidase. *J Mol Cell Cardiol,* v. 50, n. 3, p. 408–416, mar. 2011.

MALLIARAS, K. *et al.* Intracoronary Cardiosphere-Derived Cells After Myocardial Infarction: Evidence of Therapeutic Regeneration in the Final 1-Year Results of the CADUCEUS Trial. *J Am Coll Cardiol*, v. 63, n. 2, p. 110–122, jan. 2014.

MARCUS, A. J, WOODBURY, D. Fetal stem cells from extra-embryonic tissues: do not discard. *J Cell Mol Med.* v. 12, n. 3, p. 730-742, jun. 2008.

MAROKO, P.R. *et al.* Coronary artery reperfusion. I. Early effects on local myocardial function and the extent of myocardial necrosis. *J Clin Invest.* v. 51, n. 10, p. 2710–2716, oct. 1972.

MATSUSHIMA, S, TSUTSUI, H, SADOSHIMA, J. Physiological and pathological functions of NADPH oxidases during myocardial ischemia-reperfusion. *Trends Cardiovasc Med*, v. 24, n. 5, p. 202–205, jul, 2014.

MATSUSHIMA. S. *et al.* Broad suppression of NADPH oxidase activity exacerbates ischemia/reperfusion injury through inadvertent downregulation of hif-1 and upregulation of PPARalpha. *Circ Res*, v. 112, n. 8, p.1135-1149, apr. 2013.

MAULIK, N. *et al.* Ischemic preconditioning reduces apoptosis by upregulating antideath gene Bcl-2. *Circulation*, n. 100, v. s19, p. II369–II375, nov. 1999.

MAZHARI R, HARE JM. Mechanisms of action of mesenchymal stem cells in cardiac repair. potential influences on the cardiac stem cell niche. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, v. 4, p. S21-6, fev, 2007.

MCCORD, J. M. Oxygen-derived free radicals in post-ischemic tissue injury. *N Engl Med*, v. 312, n. 3, p. 159-163. 1985.

MCGINLEY, L. M, *et al.* Mesenchymal stem cell survival in the infarcted heart is enhanced by lentivirus vector-mediated heat shock protein 27 expression. *Human Gene Therapy*, v. 24, n. 10, p. 840–851, oct. 2013.

MELMED, S, *et al.* **Williams Textbook of Endocrinology**. 12th edição. Estados Unidos da América: Elsevier, 2011. 1828 p.

MENG, X, et al. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. J Transl Med, v. 5, p. 57, nov. 2007.

MICHAEL, L. H, et al. Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. Am J Physiol, v. 269, n. 6, p. H2147-54, dec. 1995.

MOCANU, M. M, *et al.* Heat stress attenuates free radical release in the isolated perfused rat heart. *Free Radic Biol Med*, v. 15, n. 4, p. 459–463, oct. 1993.

MOHYELDIN, A, GARZÓN-MUVDI, T, QUINONES-HINOJOSA, A. Oxygen in Stem Cell Biology: A Critical Component of the Stem Cell Niche. *Cell Stem Cell*, v. 7, n. 2, p. 150-61, aug. 2010.

MURPHY, E, STEENBERGEN, C. Ion transport and energetics during cell death and protection. *Physiology (Bethesda), v.* 23, p. 115–123, apr. 2009.

MURPHY, M. P. *et al.* Allogeneic endometrial regenerative cells: An "Off the Shelf" solution for critical limb ischemia? *J Transl Med, v.* 6, p. 45, aug. 2008.

MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J.* 2009;417:1–13. *Biochem J.* v. 417, n. 1, p. 1-13, jan. 2009.

MURRAY, C. J, LOPEZ, A. D. Mortality by cause for eight regions of the world: Global burden of disease study. *Lancet, v.* 349, n. 9061, p. 1269–1276, may. 1997.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. Disponível em: https://www.nih.gov/ Acesso em: 15 mai. 2009.

NESS, A. R, POWLES, J. W, KHAW, K. T. Vitamin C and cardiovascular disease: a systematic review. *J Cardiovasc Risk*, v. 3, n. 6, p. 513–521, dec 1996.

NIE, Y., *et al.* Identification of microRNAs involved in hypoxia and serum deprivationinduced apoptosis in mesenchymal stem cells. *Int. J. Biol. Sci,* v. 7, n. 6, p. 762–768, jun. 2011.

NOHL, H, JORDAN W. The metabolic fate of mitochondrial hydrogen peroxide. *Eur J Biochem*, v. 111, n.1, p. 203–210, oct. 1980.

NOORT, W. A, *et al.* Mesenchymal stromal cells to treat cardiovascular disease: strategies to improve survival and therapeutic results. *Panminerva Med*, v. 52, n. 1, p. 27–40. 2010.

NORDBERG, J, ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Rad Biol Med*, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, dec. 2001.

OGA, S. Fundamentos da toxicologia. 2ª ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 530 p.

OPIE, L. H. *et al.* Controversies in ventricular remodelling. *Lancet*, v. 367, n. 9507, p. 356–367, jan. 2006.

OSHIMA, Y. *et al.* STAT3 mediates cardioprotection against ischemia/reperfusion injury through metallothionein induction in the heart. *Cardiovasc Res*, v. 65, n. 2, p. 428–435, feb. 2005.

PACHER, P, BECKMAN, J. S, LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*, v. 87, n. 1, p. 315–424, jan. 2007.

PALACE, V. P. *et al.* Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Radic Biol Med*, v. 26, n. 6, p. 746–761, mar. 1999.

PAPPA, K. I, ANAGNOU, N. P. Novel sources of fetal stem cells: where do they fit on the developmental continuum? *Regen Med*, v. 4, n. 3, p. 423-433, may. 2009.

PASSIPIERI, J. A, *et al.* Improvement of cardiac function by placenta- derived mesenchymal stem cells does not require permanent engraftment and is independent of the insulin signaling pathway. *Stem Cell Res Ther*, v. 5, n. 4, p. 102, aug. 2014.

PATEL, A. N. *et al.* Multipotent menstrual blood stromal stem cells: isolation, characterization, and differentiation. *Cell Transplant*, v. 17, n. 3, p. 303–311, 2008.

PETERSON, K. M, *et al.* Improved survival of mesenchymal stromal cell after hypoxia preconditioning: Role of oxidative stress. *Life Sciences*, v. 88, n. 1-2, p. 65–73, jan. 2011.

PFEFFER, M. A, BRAUNWALD, E. Ventricular enlargement following infarction is a modifiable process. *Am J Cardiol*, v. 68, n. 4, p. 127D – 131D, nov. 1991.

PIPER, H. M, GARCIA-DORADO, D, OVIZE, M. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, v. 38, n. 2, p. 291–300, may. 1998.

PITTENGER, M. F. *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, v. 284, n. 5411, p. 143-147, apr. 1999.

PORTALSAÚDE/MINISTÉRIODASAÚDE:http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2012/c08.def.Acesso em: 1 abr. 2016.

PORTALSAÚDE/MINISTÉRIODASAÚDE:http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/366-sas-
raiz/dahu-raiz/transplantes-raiz/transplantes/21676-coracaoAcesso em: 01/05/2016.

PORTAL SAÚDE / MINISTÉRIO DA SAÚDE: http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/366-sasraiz/dahu-raiz/transplantes-raiz/transplantes/21682-transplante-de-orgaos .Acesso em: 17/03/2016.

POTIER, E, *et al.* Prolonged hypoxia concomitant with serum deprivation induces massive human mesenchymal stem cell death. *Tissue Eng*, v. 13, n. 6, p. 1325–1331, jun. 2007.

QUEVEDO, H. C, *et al.* Allogeneic mesenchymal stem cells restore cardiac function in chronic ischemic cardiomyopathy via trilineage differentiating capacity. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 106, n. 33, p. 14022–27, aug. 2009.

RADI, R. *et al.* Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys*, v. 288, n. 2, p. 481–487, aug. 1991.

RAEDSCHELDERS, K, ANSLEY, D. M, CHEN, D.D.Y. The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion. *Pharmacol Ther*, v. 133, n. 2, p. 230-255, feb. 2012.

RAHIMI, M, *et al.* Comparative evaluation of cardiac markers in differentiated cells from menstrual blood and bone marrow-derived stem cells in vitro. *Mol Biotechnol*, v. 56, n. 12, p. 1151-62, dec. 2014.

RAPOLA, J. M, *et al.* Randomised trial of alpha-tocopherol and beta-carotene supplements on incidence of major coronary events in men with previous myocardial infarction. *Lancet*, n. 349, p. 1715–1720, jun. 1997.

RATAJCZAK, M. Z, *et al.* Pivotal role of paracrine effects in stem cell therapies in regenerative medicine: can we translate stem cell-secreted paracrine factors and microvesicles into better therapeutic strategies. *Leukemia*, v. 26, n. 6, p. 1166–1173, jun. 2012.

REIMER, K. A. *et al.* The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation*, v. 56, n. 5, p. 786–794, nov. 1977.

RICHARDSON, J. D. *et al.* Impact of Timing and Dose of Mesenchymal Stromal Cell Therapy in a Preclinical Model of Acute Myocardial Infarction. *J Card Fail*, v. 19, n. 5, p. 342-53, may. 2013.

RODRIGO, S. F. *et al.* Intramyocardial Injection of Autologous Bone Marrow-Derived Ex Vivo Expanded Mesenchymal Stem Cells in Acute Myocardial Infarction Patients is Feasible and Safe up to 5 Years of Follow-up. *J Cardiovasc Trans Res,* v. 6, n. 5, p. 816–825, out. 2013.

RUAN, W. *et al.* Assessment of left ventricular segmental function after autologous bone marrow stem cells transplantation in patients with acute myocardial infarction by tissue tracking and strain imaging. *Chin Med J*, v. 118, n. 1175-1181, jul. 2005.

RUSSO, V. *et al.* Mesenchymal stem cell delivery strategies to promote cardiac regeneration following ischemic injury. *Biomaterials*, v. 35, n. 13, p. 3956-3974, apr. 2014.

SANADA, S, KOMURO, I, KITAKAZE, M. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning and translational aspects of protective measures. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 301, n. 5, p. 1723-1741, nov. 2011.

SCADDEN, D.T. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*, v. 441, p. 1075–1079. 2006.

SCHOONBROODT, S, PIETTE, J. Oxidative stress interference with the nuclear factor-kappa B activation pathways. *Biochem Pharmacol, v.* 60, n. 8, p. 1075–1083, oct. 2000.

SESSO, H. D, *et al.* Vitamins E and C in the prevention of cardiovascular disease in men: the Physicians' Health Study II randomized controlled trial. *JAMA*, v. 300, n. 18, p. 2123–2133, nov. 2008.

SHIOMI, T, et al. Overexpression of glutathione peroxidase prevents left ventricular remodeling and failure after myocardial infarction in mice. *Circulation*, v. 109, n. 4, p. 544–549, feb. 2004.

SIES, H. **Oxidative stress: introductory remarks.** USA: Academic Press, 1985. 1-7 p.

SIMON, M. C, KEITH, B. The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 9, n. 4, p. 285–296, apr. 2008.

SITE OMS. http://apps.who.int/gho/data/node.main.PROJNUMWORLD?lang=en Acesso em: 10 mai. 2016

SITE OMS. http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/ Acesso em: 8 mai. 2016.

SITE OMS. http://www.who.int/nmh/countries/bra_en.pdf Acesso em: 4 abr. 2016

SONG, H. *et al.* Reactive Oxygen Species Inhibit Adhesion of Mesenchymal Stem Cells Implanted into Ischemic Myocardium via Interference of Focal Adhesion Complex. *Stem Cells*, v. 28, n. 3, p. 555-563, mar. 2010.

SPRADLING, A, DRUMMOND-BARBOSA, D, KAI, T. Stem cells find their niche. *Nature*, v. 414, p. 98–104, nov. 2001.

STEARE, S. E, YELLON, D. M. The protective effect of heat stress against reperfusion arrhythmias in the rat. *J Mol Cell Cardiol*, v. 25, n. 12, p. 1471 – 1481, dec. 1993.

SUJATA, L, CHAUDHURI, S. Stem Cell Niche, the Microenvironment and Immunological Crosstalk. *Cell Mol Immunol*, v. 5, n. 2, p. 107-112, apr. 2008.

SUN, Y. Myocardial repair/remodelling following infarction: roles of local factors. *Cardiovasc. Res. v.* 81, n. 3, p. 482–490, feb. 2009.

SUTTON, M. G, SHARPE, N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation*, v. 101, n. 25, p. 2981-2988, jun. 2000.

SZYDLOWSKA. K, TYMIANSKI, M. Calcium ischemia and excitotoxicity. Cell Calcium, v. 47, n. 2, p. 122–129, feb. 2010.

TALUKDER, M. A, ZWEIER, J. L, PERIASAMY, M. Targeting calcium transport in ischaemic heart disease. *Cardiovasc. Res*, v. 84, n. 3, p. 345–352, dec. 2009.

TANG, J, *et al.* Mesenchymal stem cells participate in angiogenesis and improve heart function in rat model of myocardial ischemia with reperfusion. *Eur J Cardiothorac Surg*, v. 30, n. 2, p. 353–361, aug. 2006.

TEMSAH, R. M, *et al.* Alterations in sarcoplasmic reticulum function and gene expression in ischemic-reperfused rat heart. *Am J Physiol*, v. 277, n. 2, p. H584 – H594, aug. 1999.

THE WORLD HEALTH REPORT. www.who.int/whr Acesso em: 7 dez. 2009.

TOMA, C, *et al.* Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*, v. 105, n. 1, p. 93-8, jan. 2002.

TORRENTE, Y, POLLI, E. Mesenchymal stem cell transplantation for neurodegenerative diseases. *Cell Transplant*, v. 17, n. 10-11, p. 1103–1113. 2008.

TSUJITA, K, *et al.* Long-term efficacy of edaravone in patients with acute myocardial infarction. *Circ J,* v. 70, n. 7, p. 832-7, jul. 2006.

UNDALE, A.H., *et al.* Mesenchymal stem cells for bone repair and metabolic bone diseases. *Clin. Proc.*, v. 84, n. 10, p. 893–902, oct. 2009.

VALKO, M. *et al.* Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interactions*, v. 160,n. 1, p. 1-40, mar. 2006.

VALLE-PRIETO, A. E, CONGET, P. A. Human Mesenchymal Stem Cells Efficiently Manage Oxidative Stress. *Stem Cells Dev,* v. 19, n. 12, p. 1885-1893, dec. 2010.

VAN DER BOGT, K. E, *et al.* Comparison of different adult stem cell types for treatment of myocardial ischemia. *Circulation*, v. 118, n. 14 supl, p. S121–S129, sep. 2008.

VIVEKANANTHAN, D. P, *et al.* Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of randomised trials. *Lancet*, v. 361, p. 2017–2023, jun. 2003.

WAN SAFWANI, W. K, *et al.* The effects of hypoxia and serum-free conditions on the stemness properties of human adipose-derived stem cells. *Cytotechnology*, jan. 2016.

WANG, G, et al. NADPH oxidase contributes to angiotensin II signaling in the nucleus tractus solitarius. *J Neurosci*, v. 24, n. 24, p. 5516–5524, jun. 2004.

WEN, J. J, VYATKINA, G, GARG, N. Oxidative damage during chagasic cardiomyopathy development: Role of mitochondrial oxidant release and inefficient antioxidant defense. *Free Radic Biol Med*, v. 37, n. 11, p. 1821–1833, dec. 2004.

WESTFALL, S. D, *et al.* Identification of oxygen-sensitive transcriptional programs in human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*, v. *17*, n. 5, p. 869–881, oct. 2008.

WILLIAMS, A. R, HARE, J. M. Mesenchymal stem cells: biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. *Circ Res*, v. 109, n. 8, p. 923-940, sep. 2011.

WINKLER, J, HESCHELER. J, SACHINIDIS, A. Embryonic stem cells for basic research and potential clinical applications in cardiology. *Biochim Biophys Acta*, v. 1740, n. 2, p. 240-248, may. 2005.

WOO, Y. J, *et al.* Recombinant adenovirus- mediated cardiac gene transfer of superoxide dismutase and catalase attenuates postischemic contractile dysfunction. *Circulation*, v. 98, n. S19, p. II255 – II260, nov. 1998.

WU, X, *et al.* Transplantation of human menstrual blood progenitor cells improves hyperglycemia by promoting endogenous progenitor differentiation in type 1 diabetic mice. *Stem Cells Dev*, v. 23, n. 11, p.1245-57, jun. 2014.

XIAO, J, *et al.* Effect of allopurinol on cardiomyocyte apoptosis in rats after myocardial infarction. Eur J Heart Fail, v. 11, n. 1, p. 20-7, jan. 2009.

XU, C. *et al.* Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Circ Res*, v. 91, n. 6, p. 501-508, Sep. 2002.

TAKAHASHI, K, YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult cultures by defined factors. *Cell.* v. 126, n. 4, p. 663-76, aug. 2006.

YELLON, D. M, HAUSENLOY, D. J. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*, v. 357, n. 11, p. 1121–1135, sep. 2007.

YI, X. Y, *et al.* Characteristics and actions of NAD(P)H oxidase on the sarcoplas- mic reticulum of coronary artery smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 290, n. 3, p. H1136 – H1144, mar. 2006.

YOSHIDA, T, *et al.* Transgenic mice overexpressing glutathione peroxidase are resistant to myocardial ischemia reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*, v. 28, n. 8, p. 1759–1767, aug. 1996.

YU, T, *et al.* In Vivo Differentiation of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Circ J*, v. 77, n. 5, p. 1297-1306, feb. 2013.

YUSUF, S, *et al.* The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. *N Engl J Med.* v. 342, n. 3, p. 154–160, jan. 2000.

ZACKS, M. A, *et al.* An overview of chagasic cardiomyopathy: pathogenic importance of oxidative stress. An Acad Bras Cienc, v. 77, n. 4, p. 695-715, dec. 2005.

ZHANG, J. *et al.* Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circ Res*, v. 104, n. 4, p. 30-41, feb. 2009.

ZHANG, W, et al. Berberine protects mesenchymal stem cells against hypoxiainduced apoptosis in vitro. *Biol. Pharm. Bull*, v. 32, n. 8, p. 1335–1342, aug. 2009.

ZHAO, Z. Q. *et al.* Dynamic progression of contractile and endothelial dysfunction and infarct extension in the late phase of reperfusion. *J Surg Res*, v. 94, n. 2, p. 133–144, dec. 2000.

ZHONG, Z. *et al.* Feasibility investigation of allogeneic endometrial regenerative cells. *J Transl Med, v. 7, p. 15, feb. 2009.*

ZHU, W, *et al.* Hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells. *Stem Cells, v.* 24, n. 2, p. 416–425, feb. 2006.

ZIMMERMAN, M. C, *et al.* Superoxide mediates the actions of angiotensin II in the central nervous system. *Circ Res*, v. 91, n. 11, p. 1038–1045, nov. 2002.

ZWEIER, J. L, *et al.* Recombinant superoxide dismutase reduces oxygen free radical concentrations in reperfused myocardium. *J Clin Invest*, v. 80, n. 6, p. 1728-34, dec. 1987.

ZWEIER, J. L, FLAHERTY, J. T, WEISFELDT, M. L. Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 84, n. 5, p. 1404–1407, mar. 1987.

Anexo A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



Coordenador: Alice Helena Dutra Violante Midico - Prof. Associado Secretário: Zumera Rodrigues da Silva Professor Membros Titulares: Bentiz Maria Alasia de Herodia Antopologo-Prof Associado Carlos Henrique Fernandes Castelpoppi Médico-Especialista Eiza Regina Ambrosio Assistente Social - Mestre Hidana Wazynsky Representante dos Usuários Luzia da Conocição de Araújo Marques Enformeiro - Mestre Marco Antonio Alves Brasil Milico-Professor Adjunto Minio Teixeira Antonio Farmandanco-Especialista Nurmer Concocato Femandes Midico-Prof. Adjunto Paulo Fejó Barroso Médico-Prof. Assistante Roberto Coury Pedrosa Medico-Doutor Mombros Suplentes: Anna Paola Trindade Rocha Pierucci Nutricionista - Professor Auxiliar Beariz Montz Troop Medico - Doutora Carlos Alberto Guimartes Modico-Piot Associado Cesônia de Assis Martínusso Jonalismo Lucia Helena Luiza Vieira Amim Biologo-Mestre Maria da Conceição Lopes Buarque Assistante Social Mariangelica Oliveira da Silva Enformairo Michel Jean-Marie Thiofert Sociologo-Prot Adjunto Natalie Herrique Silva Caredo Médico-Professor Adjunto Renan Moritz Varnier Rodrigues Almeida Engenheiro-Professor Adjunto Maria Benadele Tavares Soares Representante dos Usuários RuiHaddad Medico-Prof. Adjunto

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO Hospital Universitário Clementino Fraga Filho Faculdade de Medicina Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

CEP - MEMO - n.º408/09

Rio de Janeiro, 01 de Junho de 2009.

Da: Coordenadora do CEP

A (o): Sr. (a) Pesquisador (a): Prof^a. Regina Coeli dos Santos Goldenberg

Assunto: Parecer sobre projeto de pesquisa.

Sr. (a) Pesquisador (a),

Informo a V. S.a. que o CEP constituído nos Termos da Resolução n.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e, devidamente registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, recebeu, analisou e emitiu parecer sobre a documentação referente ao protocolo de pesquisa páginas 001 a 043 e seu respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme abaixo discriminado:

Protocolo de Pesquisa: 056/09 - CEP

Título: "Sangue menstrual: uma fonte alternativa de célulatronco."

Pesquisador (a) responsável: Prof^a. Regina Coeli dos Santos Goldenberg

Data de apreciação do parecer: 28/05/2009

Parecer: "APROVADO"

Informo ainda, que V. Sa. deverá apresentar relatório semestral, previsto para 28/11/2009, anual e/ou relatório final para este Comitê acompanhar o desenvolvimento do projeto. (item VII. 13.d., da Resolução n. ° 196/96 – CNS/MS).

Atenciosamente,

He Much

Prof^a. Alice Helena Dutra Violante Coordenadora do CEP Anexo B – Aprovação da Comissão de Ética de Uso de Animais em Experimentação Científica



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – UFRJ Centro de Ciências da Saúde - CCS

Rio de Janeiro, 30 de abril de 2014

Prezada Professora Regina Coeli dos Santos Goldenberg

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) em Experimentação Cientifica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro registrada no Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) sobre o número de processo 01200.001568/2013-87 certifica que o projeto sob sua coordenação e intitulado: **"Alta resistência ao estresse oxidativo: possível vantagem terapêutica das células-tronco mesenquimais derivadas do sangue menstrual no infarto do miocárdio."**, onde é indicada a utilização de **180 ratos**, foi aprovado por esta comissão no dia **30/04/14** sob o número de referência **022/14**. Este protocolo tem validade unicamente para os 180 animais solicitados até o prazo de maio de 2017.

Atenciosamente;

Prof. Marcel Frajblat Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - CCS

Anexo C – Tabelas dos Resultados dos Experimentos *in vitro*

a)	Tabelas	referentes	à figu	ıra 4	-	Ensaio	de	adesão	е	quantificação	celular	na
pre	presença (20%) ou ausência de soro e nas diferentes concentrações de O₂.											

		Ensaio de Adesão Celular - 2 horas							
	Nom	óxia	Hipóx	ia 5%	Hipóxia 1%				
	Com Soro	Sem soro	Com Soro	Sem soro	Com Soro	Sem soro			
média	100	100,14	96,39	101,33	101,47	97,01			
desvio padrão	9,35	4,20	8,25	3,29	10,49	8,61			

	Quantificação Celular - 48 horas							
	Nomóxia		Hipóx	ia 5%	Hipóxia 1%			
	Com Soro	Sem soro	Com Soro	Sem soro	Com Soro	Sem soro		
média	102,18	82,89	120,19	95,89	98,85	85,44		
desvio padrão	4,92	12,79	18,65	24,65	9,92	13,16		

	Quantificação Celular - 7 dias							
	Nom	óxia	Hipóxi	ia 5%	Hipóxia 1%			
	Com Soro	Sem soro	Com Soro	Sem soro	Com Soro	Sem soro		
média	101,68	31,48	112,18	31,45	109,27	29,67		
desvio padrão 12,02 12,99 16,91 6,66				21,52	6,32			

b) Tabelas referentes à figura 6 - Ensaio de viabilidade celular com azul de Trypan na presença (20%) ou ausência de soro e nas diferentes concentrações de O₂.

		Viabilidade Celular - 48 horas							
	Nom	óxia	Hipóx	ia 5%	Hipóxia 1%				
	Com Soro	Sem soro	Com Soro	Sem soro	Com Soro	Sem soro			
média	94,18	94,31	92,03	94,38	92,32	90,01			
desvio padrão	3,47	0,97	2,53	0,45	0,82	3,57			

	Viabilidade Celular - 7 dias							
	Nom	óxia	Hipóx	ia 5%	Hipóxia 1%			
	Com Soro	Sem soro	Com Soro	Sem soro	Com Soro	Sem soro		
média	93,47	92,44	91,04	90,70	91,69	89,96		
desvio padrão	0,97	1,28	3,89	2,93	3,66	4,39		

	Apoptose Celular - Estágio Inicial - 48 horas							
	Nomóxia		Hipóx	ia 5%	Hipóxia 1%			
	Com Soro	Sem soro	Com Soro	Sem soro	Com Soro	Sem soro		
média	5,73	3,10	4,03	1,53	5,73	4,37		
desvio padrão	2,61	1,31	0,91	0,82	2,15	1,84		

c) Tabelas referentes à figura 7 - Ensaio de apoptose com AnexinaV / 7 AAD na presença (20%) ou ausência de soro e nas diferentes concentrações de O_2 .

	Apoptose Celular - Estágio Inicial - 7 dias								
	Nom	óxia	Hipóx	ia 5%	Hipóxia 1%				
	Com Soro	Sem soro	Com Soro	Sem soro	Com Soro	Sem soro			
média	0,50	0,97	0,93	0,57	2,30	2,00			
desvio padrão	0.36	0,46	0,25	0,09	0,91	0,94			

		Apoptose Celular - Estágio Tardio - 48 horas							
	Nom	óxia	Hipóx	ia 5%	Hipóxia 1%				
	Com Soro	Sem soro	Com Soro	Sem soro	Com Soro	Sem soro			
média	1,33	1,07	1,03	0,30	4,60	3,33			
desvio padrão	0,93	0,96	0,25	0,22	1,87	1,92			

	Apoptose Celular - Estágio Tardio - 7 dias								
	Nom	óxia	Hipóx	ia 5%	Hipóxia 1%				
	Com Soro	Sem soro	Com Soro	Sem soro	Com Soro	Sem soro			
média	0,57	0,43	0,87	0,37	1,50	1,67			
desvio padrão	0,17	0,47	0,47	0,21	0,51	0,45			

d) Tabelas referentes à figura 8 - Ensaio de ciclo celular com iodeto de propídeo na presença (20%) ou ausência de soro e nas diferentes concentrações de O₂.

	Ciclo Celular - Fase G1 - 48 horas							
	Nom	óxia	Hipóx	ia 5%	Hipóxia 1%			
	Com Soro	Sem soro	Com Soro	Sem soro	Com Soro	Sem soro		
média	62,03	65,87	59,10	67,70	49,33	68,00		
desvio padrão	3,68	7,49	2,36	5,65	3,09	7,12		

	Ciclo Celular - Fase S - 48 horas						
	Nom	óxia	Hipóxi	ia 5%	Hipóxia 1%		
	Com Soro	Sem soro	Com Soro	Sem soro	Com Soro	Sem soro	
média	21,40	13,37	22,90	14,57	25,00	13,67	
desvio padrão	1,26	1,36	1,06	0,66	3,74	2,87	

	Ciclo Celular - Fase G2 - 48 horas					
	Nom	óxia	Hipóxi	ia 5%	Hipóxi	ia 1%
	Com Soro	Sem soro	Com Soro	Sem soro	Com Soro	Sem soro
média	20,73	17,13	21,63	21,03	23,33	18,00
desvio padrão	1,21	3,27	2,60	2,87	1,25	4,24

	Ciclo Celular - Fase G1 - 7 dias					
	Nomóxia		Hipóxia 5%		Hipóxia 1%	
	Com Soro	Sem soro	Com Soro	Sem soro	Com Soro	Sem soro
média	70,10	68,40	65,63	78,23	73,33	77,67
desvio padrão	8,95	6,81	7,28	3,92	1,89	1,25

	Ciclo Celular - Fase S - 7 dias					
	Nom	óxia	Hipóx	ia 5%	Hipóx	ia 1%
	Com Soro	Sem soro	Com Soro	Sem soro	Com Soro	Sem soro
média	8,80	12,17	12,18	8,03	5,33	6,00
desvio padrão	5,90	3,69	2,44	1,62	2,05	2,16

	Ciclo Celular - Fase G2 - 7 dias					
	Nom	óxia	Hipóx	ia 5%	Hipóx	ia 1%
	Com Soro	Sem soro	Com Soro	Sem soro	Com Soro	Sem soro
média	18,37	18,03	18,20	9,00	20,67	13,33
desvio padrão	4,51	6,22	4,74	2,37	1,25	2,05

e) Tabelas referentes à figura 9 – Atividade das enzimas antioxidantes da CeSaM nas diferentes condições de concentração de oxigênio e privação de soro.

	Atividade Catalase - 48 horas					
	Nom	óxia	Hipóx	ia 5%	Hipóx	ia 1%
	Com Soro	Sem soro	Com Soro	Sem soro	Com Soro	Sem soro
média	280,44	238,81	214,06	181,57	188,26	152,01
desvio padrão	6,85	35,46	21,52	31,14	29,49	20,28

	Atividade Superóxido Dismutase - 48 horas					
	Nomóxia		Hipóxia 5%		Hipóxia 1%	
	Com Soro	Sem soro	Com Soro	Sem soro	Com Soro	Sem soro
média	6,00	7,03	6,40	6,93	5,27	4,80
desvio padrão	0,37	0,68	1,23	0,74	0,37	0,41

	Atividade Glutationa Peroxidase - 48 horas					
	Nom	óxia	Hipóx	ia 5%	Hipóx	ia 1%
	Com Soro	Sem soro	Com Soro	Sem soro	Com Soro	Sem soro
média	12,45	10,12	12,82	11,08	11,15	9,70
desvio padrão	0,71	0,70	0,20	1,02	0,22	0,63

	Atividade Catalase - 7 dias					
	Nom	óxia	Hipóx	ia 5%	Hipóx	ia 1%
	Com Soro	Sem soro	Com Soro	Sem soro	Com Soro	Sem soro
média	147,53	196,12	201,73	214,61	124,65	133,80
desvio padrão	19,83	21,69	59,81	56,14	10,61	35,10

	Atividade Superóxido Dismutase - 48 horas					
	Nom	óxia	Hipóx	ia 5%	Hipóx	ia 1%
	Com Soro	Sem soro	Com Soro	Sem soro	Com Soro	Sem soro
média	7,60	5,93	7,03	5,73	4,90	4,63
desvio padrão	0,54	0,21	0,17	0,82	0,64	0,19

	Atividade Glutationa Peroxidase - 48 horas					
	Nom	óxia	Hipóx	ia 5%	Hipóx	ia 1%
	Com Soro	Sem soro	Com Soro	Sem soro	Com Soro	Sem soro
média	10,97	10,54	10,81	9,72	10,81	9,72
desvio padrão	1,07	0,23	0,70	0,46	0,70	0,46

Anexo D – Tabelas dos Resultados dos Experimentos in vivo

a) Tabelas referentes à figura 12 – Análises ecocardiográficas no vigésimo oitavo dia do protocolo experimental.

	Ecocardiograma - Volume Sistólico Final				
	Sham Infartad				
média	86,53	257,68			
desvio padrão	26,75	77,21			

	Ecocardiograma - Fração de Ejeção					
	Sham Infartado					
média	77,32	43,28				
desvio padrão	2,84	8,16				

	Ecocardiograma - Débito Sistólico			
	Sham Infartado			
média	287,08	195,17		
desvio padrão	45,85	38,56		

	Ecocardiograma - Volume Diastólico Final			
	Sham Infartado			
média	373,61	452,86		
desvio padrão	70,71	90,63		

b) Tabelas referentes à figura 13 – Análises das áreas sob a curva das pressões sistólicas, diastólicas e desenvolvidas em determinados volumes.

	Langendorff - Pressão Sistólica			
_	Sham Infartado			
média	176,33	163,33		
desvio padrão	2,49 9,57			

	Langendorff - Pressão Diastólica			
	Sham Infartado			
média	95,67	66,00		
desvio padrão	16,21 24,36			

	Langendorff - Pressão Desenvolvida			
	Sham Infartado			
média	80,67 94,83			
desvio padrão	14,88 21,47			

c) Tabelas referentes à figura 15 – Atividade da geração de espécies reativas de oxigênio pelas NADPH oxidases.

	Produção de ERO em diferentes tempos pós Infarto - Sem NADPH					
	Sham VE 1h INF 2h INF 6h INF 24h INF					
média	13,69	15,56	17,84	12,01	18,07	
desvio padrão	2,48	2,49	7,24	2,77	8,80	

	Produção de ERO em diferentes tempos pós Infarto - Sem NADPH					
	Sham VD 1h Bl 2h Bl 6h Bl 24h Bl					
média	9,94	17,14	20,64	18,79	15,65	
desvio padrão	1,44	5,18	7,89	5,12	4,33	

	Produção de ERO em diferentes tempos pós Infarto - Com NADPH					
	Sham VE 1h INF 2h INF 6h INF 24h INF					
média	34,83	67,73	71,37	53,11	58,06	
desvio padrão	2,69	5,21	3,64	7,56	3,80	

	Produção de ERO em diferentes tempos pós Infarto - Com NADPH					
	Sham VD 1h BI 2h BI 6h BI 24h BI					
média	31,63	71,65	60,36	57 <i>,</i> 80	63,16	
desvio padrão	3,29	2,69	11,94	5,01	2,96	