

**Avaliação dos Efeitos do Fator Estimulante de
Colônias de Granulócitos (G-CSF) Sobre os
Parâmetros Estruturais e Funcionais do Ventrículo
Esquerdo de Ratos Submetidos à Cardiomiopatia
Induzida Pelo Isoproterenol**

Ludimila Forechi

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas
(Fisiologia Cardiovascular)

**Mestrado em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo**

Vitória, Janeiro de 2011

**Avaliação dos Efeitos do Fator Estimulante de
Colônias de Granulócitos (G-CSF) Sobre os
Parâmetros Estruturais e Funcionais do Ventrículo
Esquerdo de Ratos Submetidos à Cardiomiopatia
Induzida Pelo Isoproterenol**

Ludimila Forechi

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em: 27/01/2011

Prof. Dr. José Gerado Mill – Orientador/UFES

Profa. Dra. Ivanita Stefanon – PPGCF/UFES

Profa. Dra. Simone Garcia Macambira – Fiocruz/Bahia

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

Vitória, Janeiro de 2011

Forechi, Ludimila, 1985

Avaliação dos efeitos do Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos (G-CSF) sobre os parâmetros estruturais e funcionais do ventrículo esquerdo de ratos submetidos à miocardiopatia induzida pelo isoproterenol. [Vitória] 2011

XI, 87p., 29,7cm (UFES, M. SC., Ciências Fisiológicas, 2011)

Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo.

Orientador: Prof. Dr. José Geraldo Mill

1. Isoproterenol 2. G-CSF 3. Cardiomiopatia Dilatada 4. Colágeno
5. Remodelamento Ventricular

Agradecimentos

Como diz uma grande amiga: “A base de nossas vidas é como a de uma construção, composta por três grandes pilares: nossa família, nossos amigos e nosso trabalho. Quando um chega a faltar, existem dois que ainda nos suportam. Quando dois caem é difícil segurar, mas nos firmamos ao pilar restante. Entretanto, se caem os três, é inevitável o desabamento de uma estrutura”.

Agradeço inicialmente ao meu grande e forte pilar, meus pais, pelo amor, carinho e por me proporcionarem estudar. Juntamente com meus irmãos e familiares, muito obrigada pelos conselhos, incentivos, pelo apoio financeiro e emocional, por confiarem e apoiarem as minhas decisões.

Aos meus amigos por participarem de variados momentos em minha vida. Não posso deixar de enfatizar os colegas do Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, professores, técnicos, equipe da secretaria, da limpeza, do biotério, e dos laboratórios pelas diversas horas divididas.

Ao meu terceiro pilar, o Laboratório de Fisiopatologia Cardiovascular. Sou muito grata ao professor José Geraldo Mill, pela oportunidade em conhecer e participar da pesquisa. Ao Marcelo, que me ensinou as técnicas, além de ajudar em todas as etapas realizadas nesse trabalho. A Dr^a Diana pela paciência e cuidado com os animais nos exames de imagem. A Rebeca e Jonaína pela companhia diária e nos congressos. Aos demais integrantes desse grande grupo, Enildo, Eduardo, Divanei, Luciana, Wellington, Marcela, Leonard e Viviane pelos momentos de divertimento e compartilhamento de conhecimentos.

Às agências de fomento CNPq e Fapes, pelo auxílio concedido através do Pronex (Processo 35884886/2006).

Não posso deixar de agradecer o meu namorado, Raphael, pelas caronas, por estar sempre presente e pelos finais de semana e feriados disponibilizados. Por fim, aos demais integrantes da família Maleque pelo carinho.

Resumo

Introdução: A descarga simpática maciça que ocorre em situações de estresse extremo ou com o uso de altas doses de estimulantes centrais do sistema adrenérgico tem efeitos deletérios agudos e crônicos sobre o coração em consequência do desenvolvimento de múltiplos pontos de necrose focal no subendocárdio e remodelamento ventricular. A injeção de altas doses de isoproterenol (ISO) tem sido usada como modelo experimental desta cardiomiopatia.

Objetivo: Avaliar os efeitos da injeção do fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF) neste modelo experimental em rato. **Métodos:** Ratos Wistar machos (N=155; 260-300g) foram divididos em 3 grupos e usados em diferentes protocolos: Controle (n=41), sem intervenção; ISO (n=65), tratado com ISO (150mg/kg/dia, sc) por dois dias consecutivos; e ISO+G-CSF (n=49), recebendo ISO no mesmo esquema e G-CSF (50µg/kg/dia, sc) por 7 dias (1ª dose, 24h após a última dose de ISO). Foram retiradas alíquotas de sangue da veia safena para verificar a mobilização leucocitária ao longo do protocolo. O ecocardiograma (7,5MHz) foi realizado no início e final do protocolo. No 30º dia após ISO, os animais foram anestesiados (ketamina - 90mg/kg + xilazina - 10mg/kg, ip) para análise hemodinâmica. Em seguida, o coração foi parado (KCl 3M) e um cateter de dupla luz foi inserido no ventrículo esquerdo (VE) para obtenção da curva pressão-volume no coração *in situ*. Fragmentos do VE foram preparados para histologia (picrossírius) para determinação da fração volumétrica ocupada pelo colágeno. Os dados foram analisados por ANOVA de 1 e 2 vias, e os resultados expressos em média ± erro padrão da média. A significância estatística foi estabelecida para $p < 0,05$.

Resultados: A mortalidade pelo ISO foi de 18,4%, a maior parte (66,7%) ocorrendo após a primeira dose. A contagem de leucócitos no 3º dia foi maior no ISO ($20,393 \pm 1,534$ céls./mm³) e ISO+G-CSF ($18,987 \pm 1,541$) que no Controle ($14,572 \pm 0,888$), igualando-se no 30º dia. Não houve diferença entre grupos nas análises funcionais (hemodinâmica e ecocardiografia) e no peso corporal e de vísceras (coração, fígado e pulmão). O ISO deslocou para direita a curva pressão-volume (Controle: $K1 = 2,70 \pm 0,32$; ISO: $K1 = 2,37 \pm 0,24$; ISO+G-CSF: $K1 = 2,69 \pm 0,36$) e aumentou o diâmetro diastólico final no ecocardiograma (Controle: $7,7 \pm 0,14$; ISO $8,7 \pm 0,16$; ISO+G-CSF $7,8 \pm 0,09$ mm; $p < 0,05$) caracterizando dilatação ventricular no grupo ISO com prevenção pelo G-CSF. A fração de colágeno no endocárdio do VE

aumentou com o ISO e foi parcialmente reduzida com o G-CSF (Controle $2,0 \pm 0,18$; ISO $9,1 \pm 0,81$; ISO+G-CSF $5,9 \pm 0,58\%$). **Conclusão:** O tratamento com G-CSF por 7 dias foi eficaz na prevenção da instalação da cardiomiopatia dilatada produzida pelo ISO, com diminuição da quantidade de colágeno na matriz extracelular. Esse achado pode ser devido à atenuação da lesão ou por modulação da reação inflamatória produzida pelo ISO.

Palavras-chave: Isoproterenol, G-CSF; Cardiomiopatia Dilatada; Colágeno, Remodelamento Ventricular

Abstract

Background: The massive sympathetic discharge occurring in situations of severe stress or use of high doses of stimulants of the central adrenergic system has acute and chronic deleterious effects to the heart because multiple points of focal necrosis may occur on the endocardium with the consequent ventricular remodeling. Injections of high isoproterenol (ISO) doses have been used as an experimental model of this cardiomyopathy. **Aim:** To evaluate the effects of the Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) in this experimental model in rats. **Methods:** Male Wistar rats (N=155; 260-300g) were divided into three groups and used in different protocols: Controls (n=41), without any intervention, ISO (n=65) receiving ISO (150mg/kg/day, sc) for two consecutive days, and ISO+G-CSF (n=49) receiving the same dose of ISO and being treated with G-CSF (50µg/kg/day sc) for 7 days, beginning 24 hours after the last dose of ISO. Blood samples were taken from the saphenous vein to check leukocyte mobilization during the protocol. Echocardiography (7.5 MHz) was performed at the beginning and at the end of the protocol. At the 30th day after ISO, the animals were anesthetized (ketamine - 90mg/kg + xylazine -10mg/kg, ip) for arterial and left ventricle hemodynamic records. The heart was then arrested (KCl 3M) and a double lumen catheter was inserted into the LV cavity to obtain the left ventricular pressure x volume curve in the heart *in situ*. Fragments of left ventricle were prepared to histological analysis (Syrius red) to determine the fractional volumetric density of collagen. Data were analyzed by one and two-way ANOVA as appropriate, and the results expressed as mean ± standard error of mean. The statistical significance was set at p<0,05. **Results:** Mortality determined by ISO treatment of was 18.4%. The leukocyte count at the 3th day was higher in the ISO (20,393±1,534 céls./mm³) and in the ISO+G-CSF (18,987±1,541) groups than in the Control group (14,572±0,888). This difference was undetected at the 30th day of the protocol. There was no significant difference in the functional analysis of the heart in hemodynamic and echocardiograph measurements, as well as in relation to the body weight and viscera weights (heart, lungs and liver). ISO shifted to the right the pressure-volume curve (CT K1=2,70±0,32; ISO K1=2,37±0,24; ISO+G-CSF K1=2,69±0,36) and increased the diameter of the left ventricle at the end-diastole in the echocardiogram (CT 7,7±0,14; ISO 8,7±0,16; ISO+G-CSF 7,8±0,09 mm) characterizing the ventricular dilation in the ISO group, which was

prevented by G-CSF treatment. The left ventricular endocardial fractional collagen volume increased markedly in the ISO groups and it was partially reduced ($p < 0.05$) by G-CSF (CT $2,0 \pm 0,18$; ISO $9,1 \pm 0,81$; ISO+G-CSF $5,9 \pm 0,58\%$). **Conclusion:** Treatment with G-CSF for 7 days was effective to prevent the onset of dilated cardiomyopathy produced by ISO in rats, with decreased collagen deposition in the extracellular matrix. This finding may be due to attenuation of lesions or to the reduction of the local inflammatory reaction produced by ISO treatment.

Key words: Isoproterenol, G-CSF, Dilated Cardiomyopathy; Collagen; Ventricular Remodeling

Lista de Abreviaturas

CMD	Cardiomiopatia dilatada
IC	Insuficiência cardíaca
ISO	Isoproterenol
MAO	Monoamina oxidase
COMT	Catecol-O-metiltransferase
AC	Adenilato ciclase
ATP	Adenosina trifosfato
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
MAPKs	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
PKA	Proteína quinase A
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
COX-2	Ciclooxigenase 2
MMP	Metaloproteinases de matriz
MEC	Matriz extracelular
ECA	Enzima conversora de angiotensina
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
CSF	Fator de estimulação de colônias
G-CSF	Fator de estimulação de colônias de granulócitos
G-CSFR	Receptor para o fator de estimulação de colônias de granulócitos
SCF	Fator de células tronco
IM	Infarto do miocárdio
Jak	Janus Kinase
Stat	Transdutor de sinalização e ativador de transcrição
ECG	Eletrocardiograma
FC	Frequência cardíaca
FE	Fração de ejeção
FS	Fração de encurtamento
VDF	Volume diastólico final
VSF	Volume sistólico final
DDfVE	Diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo
DSfVE	Diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo

VE	Ventrículo esquerdo
EDfPA	Espessura diastólica final da parede anterior
EDfPP	Espessura diastólica final da parede posterior
PAS	Pressão arterial sistólica
PAD	Pressão arterial diastólica
dPdt	Derivada máxima de pressão
VD	Ventrículo direito
IVDFVE	Índice de volume diastólico final do ventrículo esquerdo
SNS	Sistema nervoso simpático
PC	Peso corporal
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinases
TGF-β	Fator de crescimento transformante β

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Classificação das Cardiomiopatias	13
1.2 Cardiomiopatias Dilatadas por Reações Tóxicas ou Idiopática	17
1.3 Modelo Experimental de Cardiomiopatia Dilatada por Isoproterenol	18
1.4 Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos	23
2 OBJETIVOS	32
2.1 Objetivo Geral	33
2.2 Objetivos Específicos	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 Animais Experimentais	35
3.2 Grupos Experimentais	35
3.3 Peso Corporal	36
3.4 Coleta de Sangue e Contagem Leucocitária	36
3.5 Análise Ecocardiográfica	37
3.6 Análise Hemodinâmica	38
3.7 Análise in situ da Dilatação Ventricular pela Curva Pressão-Volume	39
3.8 Medidas Ponderais	42
3.9 Histologia	42
3.10 Análise Estatística	44
4 RESULTADOS	45
4.1 Mortalidade	46
4.2 Mobilização Leucocitária	46
4.3 Parâmetros Ponderais	47
4.4 Medidas Ecocardiográficas	49

4.5 Resultados Hemodinâmicos	51
4.6 Curva Pressão-Volume	52
4.7 Parâmetros Histológicos	54
5 DISCUSSÃO	57
5.1 Principais Achados	58
5.2 Aspectos Básicos	58
5.3 Mortalidade e Características Ponderais	60
5.4 Mobilização Celular	62
5.5 Dilatação Ventricular Esquerda	64
5.6 Redução do Colágeno	66
6 CONCLUSÃO	70
7 REFERÊNCIAS	72

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Classificação das Cardiomiopatias

Em 1891, Krehl mencionou pela primeira vez um quadro de cardiomiopatia. Entretanto, os estudos clínicos eram então mal definidos e imprecisos, quadro este que perdurou por muito tempo (Mady & Fernandes, 1997). Até a década de 50 não existiam estudos que definissem ou classificassem claramente o conjunto de entidades mórbidas inseridas dentro da denominação de “*cardiomiopatias*”. Estas eram frequentemente confundidas com as “*miocardites*”, termo utilizado com frequência em uma variedade de contextos patológicos e clínicos sem clareza de expressão (Goodwin, 1982).

Em 1957, em trabalho intitulado “Doenças miocárdicas raras: a cardiomiopatia não-coronariana”, Brigden considerou as cardiomiopatias como doenças raras, com grande diversidade e de difícil classificação (Brigden, 1957). A abordagem de Brigden despertou o interesse do médico cardiologista John Forrest Goodwin. Este atuava em Londres também como pesquisador, já obtinha conhecimentos sobre a técnica de cateterização do coração direito, radiologia cardíaca, bomba de oxigenação e cirurgia do septo ventricular, quando seu envolvimento com a cardiomiopatia o consagrou internacionalmente (Oakley, 1994). Na década de 60, Goodwin definiu a cardiomiopatia como uma “*desordem aguda, subaguda, ou crônica do músculo cardíaco de etiologia desconhecida ou obscura, freqüentemente associada com o endocárdio e às vezes envolvendo o pericárdio, mas não com origem aterosclerótica*”. Posteriormente, Goodwin conceituou a cardiomiopatia como uma “*desordem miocárdica primária*” ou “*desordem miocárdica secundária*” por entender que decorria de doenças que envolviam o miocárdio primariamente, não sendo resultantes de doenças que afetavam inicialmente outras partes do coração ou do corpo. A classificação em cardiomiopatia secundária, embora útil, não englobava todos os casos. Assim, o termo caiu em desuso (Goodwin, 1964; Goodwin & Oakley, 1972).

Goodwin, em 1964, reuniu os dados de 48 pacientes com cardiomiopatia e descreveu os casos de acordo com a estrutura e função do coração, classificando-os como cardiomiopatia congestiva, constritiva/obliterativa e obstrutiva hipertrófica.

Com o passar do tempo, o termo “dilatado” substituiu o “congestivo” pela importância da dilatação ventricular; a cardiomiopatia constrictiva/obliterativa passou a ser denominada de restritiva. Finalmente abandonou-se o termo “obstrutiva”, passando apenas a ser classificado como cardiomiopatia hipertrófica. A figura 1 apresenta as principais características dos três tipos de cardiomiopatias descritas por Goodwin.

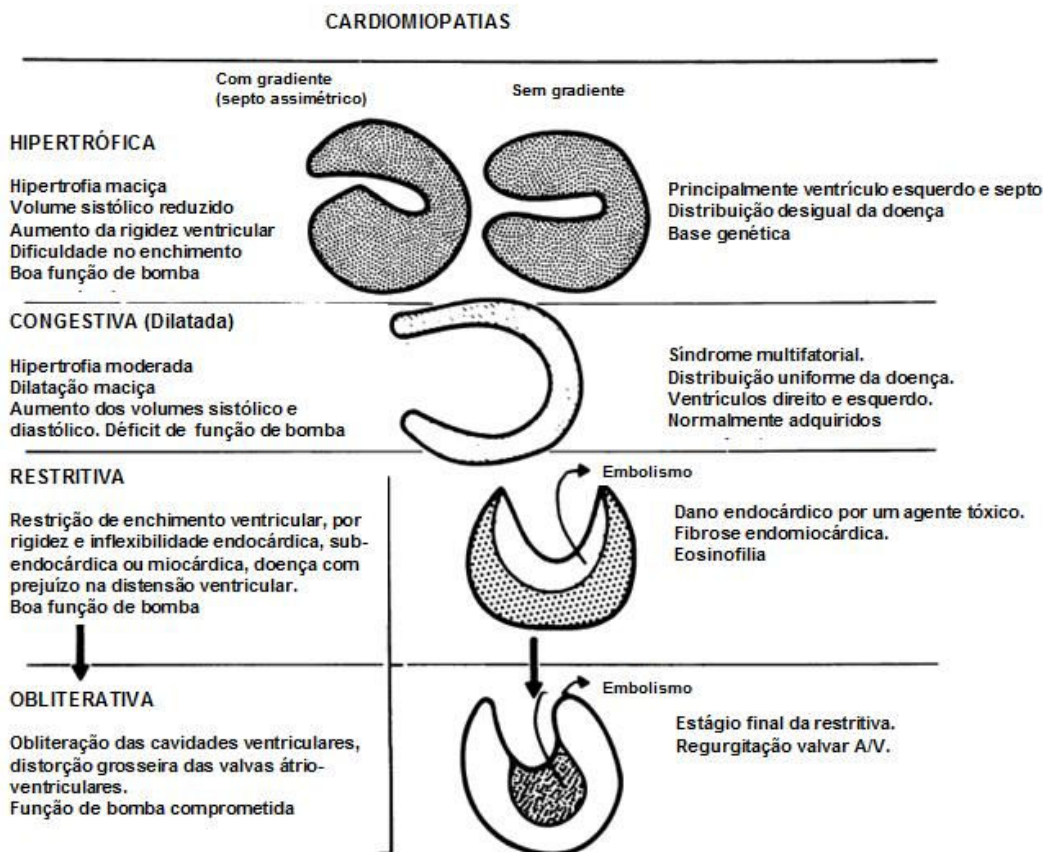


Figura 1: Tipos de cardiomiopatia (Adaptado de Goodwin, 1982).

Em 1972, Oakley tentou simplificar a definição de cardiomiopatia descrevendo-a apenas como “uma doença do músculo cardíaco de causa desconhecida ou associada”, sendo diferenciada de doença específica do músculo cardíaco com causa conhecida (Oakley, 1972; Goodwin & Oakley, 1972).

A Organização Mundial da Saúde/Sociedade Internacional e Federação de Cardiologia (*WHO/ISFC Task Force*), em 1980, definiu as cardiomiopatias como “doenças do músculo cardíaco de causa desconhecida”. Três tipos foram descritos de acordo com os aspectos clínicos: a cardiomiopatia dilatada, cardiomiopatia hipertrófica e a cardiomiopatia restritiva. Nesse trabalho utilizou-se a terminologia “cardiomiopatias não-classificadas” para aquelas doenças de origem não definida e que não se enquadravam nas classificações sugeridas. Diferenciou-se também o

termo “cardiomiopatia” da “doença específica do músculo cardíaco”, cuja causa devia ser conhecida.

As dificuldades de se conseguir uma classificação ampla, clara e bem aceita das cardiomiopatias perduraram por longo tempo tendo em vista que para se atingir tal objetivo era necessária a integração de conhecimentos de muitas áreas da medicina, como clínica, patologia, bioquímica, virologia, imunologia, epidemiologia, entre outras (Goodwin, 1974).

Somente em 1995, a *WHO/ISFC Task Force* publicou um novo artigo definindo e classificando as cardiomiopatias. A definição como “doenças do miocárdio associadas com disfunção cardíaca” e as classificações de acordo com a fisiopatologia dominante e a etiologia/fatores patogênicos são utilizadas até os dias atuais. As três classificações originais foram preservadas (cardiomiopatia dilatada, hipertrófica e restritiva), e foram incluídas mais dois grupos: a arritmogênica do ventrículo direito e aquelas sem classificação, também chamadas de idiopáticas. O termo “doença específica do músculo cardíaco” foi substituído por “cardiomiopatia específica” e descreve as doenças do miocárdio associadas a algumas afecções sistêmicas ou cardíacas. Entretanto, em muitos casos é impossível chegar a um diagnóstico etiológico e, assim, freqüentemente é preferível classificar as cardiomiopatias em um dos cinco tipos de acordo com as diferenças na fisiopatologia e no quadro clínico (Richardson et al, 1996).

A tabela 1 mostra as diferenças de terminologia propostas pela Organização Mundial de Saúde entre 1980 e 1995.

1980	1995
<p>Cardiomiopatia: doença do músculo cardíaco de causa desconhecida Classificações: dilatada, hipertrófica, restritiva e não-classificadas</p>	<p>Cardiomiopatia: doença do miocárdio associado com disfunção cardíaca Classificações: dilatada, hipertrófica, restritiva, arritmogênica e não-classificadas</p>
<p>Doença específica do músculo cardíaco: doença do músculo cardíaco de causa conhecida ou associada com desordens de outros sistemas</p>	<p>Cardiomiopatia específica: doença do músculo cardíaco associado com transtornos sistêmicas ou cardíacos específicos</p>

Tabela 1: Terminologia, definições e classificações de cardiomiopatia pela OMS em 1980 e 1995 (adaptada de Thiene et al, 2005).

Assim, sob o ponto de vista geral, as cardiomiopatias são descritas como um grupo de doenças que afetam diretamente o músculo cardíaco (miocárdio) e não

resultam de hipertensão arterial ou de anormalidades congênitas ou adquiridas das valvas, artérias coronárias ou pericárdio. Quando são classificadas segundo a etiologia, duas categorias fundamentais são reconhecidas. A miocardiopatia primária, decorrente de doença do miocárdio de causa desconhecida; e a miocardiopatia secundária, abrangendo a doença miocárdica de causa conhecida ou associada a afecção envolvendo outros sistemas orgânicos (Maisch et al., 2002; Kasper et al., 2006; Thiene et al., 2005). A tabela 2 classifica as miocardiopatias segundo a etiologia.

ENVOLVIMENTO MIOCÁRDICO PRIMÁRIO	
Idiopática	
Familiar	
Doença endomiocárdica eosinofílica	
Fibrose endomiocárdica	
ENVOLVIMENTO MIOCÁRDICO SECUNDÁRIO	
<u>Infeciosa (D)</u>	<u>Doenças do tecido conjuntivo (D)</u>
Miocardite viral	Lúpus eritematoso sistêmico
Miocardite bacteriana	Panarterite nodosa
Miocardite fúngica	Artrite reumatóide
Miocardite por protozoário	Esclerose sistêmica progressiva
Miocardite por metazoário	Dermatomiosite
Espiroqueta	<u>Infiltrações e granulomas (R,D)</u>
Riquetsia	Amiloidose
<u>Metabólica (D)</u>	Sarcoidose
<u>Doenças familiares de depósito (D,R)</u>	Câncer
Doença do depósito de glicogênio	<u>Neuromuscular (D)</u>
Mucopolissacaridoses	Distrofia muscular
Hemocromatose	Distrofia miotônica
Doença de Fabry	Ataxia de Friedreich (H,D)
<u>Deficiências (D)</u>	<u>Hipersensibilidade e reações tóxicas (D)</u>
Eletrólitos	Álcool
Nutricionais	Radiação
<u>Cardiopatia periparto (D)</u>	Fármacos

Tabela 2: Classificação etiológica das miocardiopatias. A principal manifestação clínica de cada grupo etiológico é assinalada pelas letras D (dilatada), R (restritiva) ou H (hipertrofica). Adaptado de Kasper et al, 2006.

A história da classificação das cardiomiopatias passou por várias alterações de acordo com a evolução do conhecimento, e ainda hoje, parece deixar dúvidas aos clínicos por serem complexas ou até mesmo irrelevantes na prática clínica diária. Alguns autores têm sugerido uma revisão das classificações em decorrência dos avanços no diagnóstico e conhecimento preciso da causa, da identificação de novas doenças, da rápida evolução da aplicação da genética molecular na

cardiologia e dos estudos das doenças envolvendo canais iônicos. Mas, como dizia Goodwin em seu trabalho "*The frontiers of cardiomyopathy*", "qualquer classificação é necessariamente incompleta e age como uma ponte entre a completa ignorância e a total compreensão em muitos sistemas biológicos, sendo passível de falhas, críticas e dificilmente resiste ao tempo" (Mady & Fernandes, 1997; Elliott, 2008).

1.2 Cardiomiopatias Dilatadas por Reações Tóxicas ou Idiopática

A forma dilatada é a mais comum das cardiomiopatias e pode ocorrer em várias idades, principalmente em indivíduos do sexo masculino. Dependendo da sua etiologia, o diagnóstico pode ser feito pela história clínica, radiografia do tórax, ecocardiograma, eletrocardiograma, teste ergométrico, sorologia viral, biópsia endomiocárdica ou exames bioquímicos (Luk et al. 2009; Elliott, 2000; Wexler et al., 2009).

A cardiomiopatia dilatada (CMD) foi descrita em 1976 por Goodwin ao perceber aumento dos volumes ventriculares, perda de função sistólica, e muitas vezes, por regurgitação das valvas átrio-ventriculares. Trata-se de uma doença difusa, envolvendo ambos os ventrículos e que freqüentemente leva insuficiência cardíaca (IC), com sinais de baixo débito cardíaco, cianose de extremidades, pressão venosa central elevada e presença de "ritmo de galope" (Goodwin, 1978).

As cardiomiopatias induzidas pelo álcool, pela adriamicina, diabetes, infecções virais, doenças autoimunes (sarcoidose), doenças inflamatórias crônicas são vistas com freqüência. Em casos em que a etiopatogenia não pode ser identificada, é diagnosticada como uma CMD idiopática (Maisch et al., 2002; Elliot, 2000).

A doença pode acometer os dois ventrículos. Entretanto, é predominante no lado esquerdo e o septo interventricular pode ser encontrado abaulado para a cavidade do ventrículo direito. O peso cardíaco pode aumentar de duas a três vezes em relação ao normal. Em geral, há aumento da massa e do volume miocárdico com afinamento e alargamento das paredes, intensa fibrose intersticial, baixo débito cardíaco, dispnéia, fadiga, angina, congestão pulmonar. A redução da contratilidade miocárdica resulta em função ventricular deprimida. A diminuição da contratilidade normalmente é mais evidente na região apical do coração. Complicações como

arritmias e eventos trombolíticos podem aparecer devido ao quadro evolutivo da IC congestiva e levar à morte súbita (Luk et al., 2009). A figura 2 representa as diferenças entre um coração normal e outro com CMD idiopática.

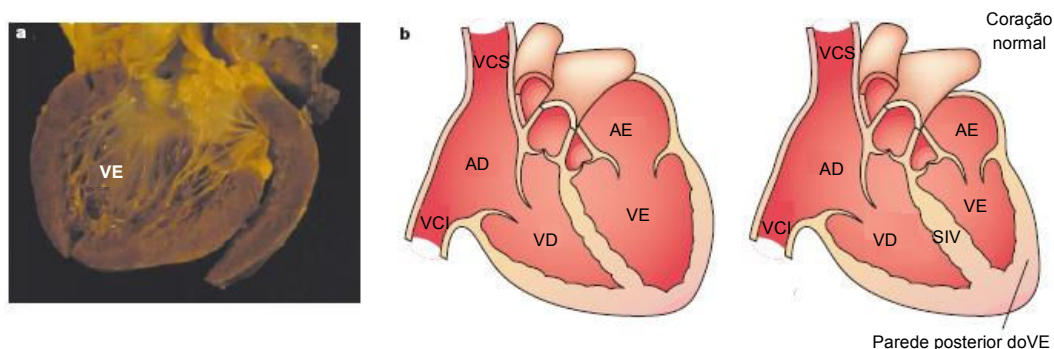


Figura 2: Cardiomiopatia dilatada idiopática. **a**, Coração de um indivíduo com cardiomiopatia dilatada. Notar a dilatação do ventrículo esquerdo e paredes ventriculares finas. Em vida, esse ventrículo apresentava função deprimida. **b**, Ilustração de cardiomiopatia dilatada (esquerda), apresentando dilatação do átrio esquerdo e ventrículo esquerdo, e paredes finas. Para comparação, um coração normal é apresentado à direita. VCS, veia cava superior; VCI, veia cava inferior; SIV, septo interventricular; AD, átrio direito, VD, ventrículo direito, AE, átrio esquerdo, VE, ventrículo esquerdo (Adaptado de Towbin & Bowles, 2002).

A terapia medicamentosa alivia os sintomas dos portadores da cardiomiopatia dilatada, mas, em geral, não impede a progressão da doença e, conseqüentemente, da dilatação ventricular. A CMD idiopática é uma das principais causas do transplante cardíaco, sendo essa a única possibilidade de cura da doença (Hosenpud et al., 1997). Este procedimento, entretanto, tem uso restrito pela escassez de doadores, afora todos os problemas decorrentes dos processos de rejeição.

1.3 Modelo Experimental de Cardiomiopatia Dilatada por Isoproterenol

O desenvolvimento de modelos experimentais de doenças humanas representa uma estratégia importante para um melhor conhecimento tanto da etiologia como da progressão da doença e seus possíveis meios de reversão. A descarga simpática maciça que ocorre em situações de estresse extremo ou com o uso de altas doses de estimulantes centrais do sistema adrenérgico tem efeitos deletérios agudos e crônicos sobre o coração. Agudamente, a descarga simpática determina grande aumento de consumo de oxigênio pelo miocárdio, sendo comum o aparecimento de infartos subendocárdicos. Na fase crônica, podem determinar o

aparecimento de IC pelo desenvolvimento de fibrose subendocárdica. No entanto, a patogênese da miocardiopatia determinada pela descarga catecolaminérgica ainda não é completamente entendida (Wittstein et al., 2005).

Em condições fisiológicas a concentração de catecolaminas no coração situa-se no âmbito nanomolar. Entretanto, em condições patológicas, os níveis podem atingir valores de micromolar. As catecolaminas são importantes reguladores do metabolismo e da contratilidade miocárdica. No entanto, a liberação endógena ou exógena excessiva causa estresse severo no músculo cardíaco (Lameris et al., 2000).

Estudos experimentais em ratos submetidos à administração subcutânea de uma catecolamina sintética - Isoproterenol (ISO) - em doses supra-fisiológicas, tem sido utilizada como modelo experimental de infarto subendocárdico. O ISO produz hipóxia e focos de necrose miocárdica na região subendocárdica ou até transmural, resultando em dilatação ventricular e redução da capacidade funcional do coração ao longo do tempo, mesmo mantendo-se a vasculatura coronariana patente (Rona et al., 1959; Feng & Li, 2010; Prince et al., 2009; Ribeiro et al., 2009).

O ISO é um agonista de receptores β_1 e β_2 adrenérgicos. Estudos histológicos prévios em animais tratados com diferentes doses de ISO mostraram aumento do número de núcleos de infiltrados de células inflamatórias no ápice do coração, identificados através do corante hematoxilina. Esse aumento é devido à alta densidade de receptores β -adrenérgicos nesta região, desencadeando uma maior resposta contrátil após a estimulação adrenérgica. O aumento da contração apical pode originar um desequilíbrio entre fornecimento/consumo de oxigênio, com conseqüente geração de lesões por hipóxia determinando, a médio prazo, necrose, apoptose, inflamação e fibrose envolvendo principalmente a área subendocárdica mas podendo também atingir os músculos papilares do ventrículo esquerdo (Heather et al., 2009; Brooks & Conrad, 2009; Rona et al., 1973).

A necrose miocárdica induzida pelo ISO em ratos, com evolução para cardiomiopatia dilatada, tem sido extensivamente utilizada como modelo experimental de IC devido à simplicidade da técnica, bem como à relativamente baixa mortalidade. Embora o insulto primário gere alterações sistêmicas, o mecanismo exato de necrose permanece desconhecido. É sugerido que, a depleção das reservas energéticas dada a hiperatividade contrátil possa ser a melhor

explicação para as alterações morfológicas observadas na presença de vasculatura coronariana patente (Teerlink et al., 1994; e Grimm et al., 1998).

Teerlink et al. (1994), avaliaram o curso temporal dos efeitos de diferentes concentrações de ISO sobre o coração, após dois dias consecutivos de tratamento. Viu-se que a necrose miocárdica e a dilatação ventricular têm natureza progressiva e ambas são dependentes da dose da catecolamina.

A lesão miocárdica ocorreria tanto por necrose como por apoptose. O ISO é rapidamente metabolizado pelas enzimas monoamina oxidase (MAO) e catecol-O-metiltransferase (COMT) (Teerlink et al., 1994). Age após ligar-se aos receptores β -adrenérgicos, estimulando a proteína de ligação guanina estimulatória (proteína Gs) que ativa a adenilato ciclase (AC) e provoca aumento da conversão da adenosina trifosfato (ATP) em adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc). Os mecanismos dependentes do AMPc que parecem regular a apoptose celular envolvem as mitocôndrias, as espécies reativas de oxigênio (ROS) e as Proteína-Kinases Ativadas por Mitógenos (MAPKs - Mitogen Activated Protein Kinases) através da Proteína-quinase A (PKA) (Singh et al., 2000 e 2001). A figura 3 ilustra os possíveis mecanismos de indução de apoptose secundária à ligação do ISO aos receptores β .

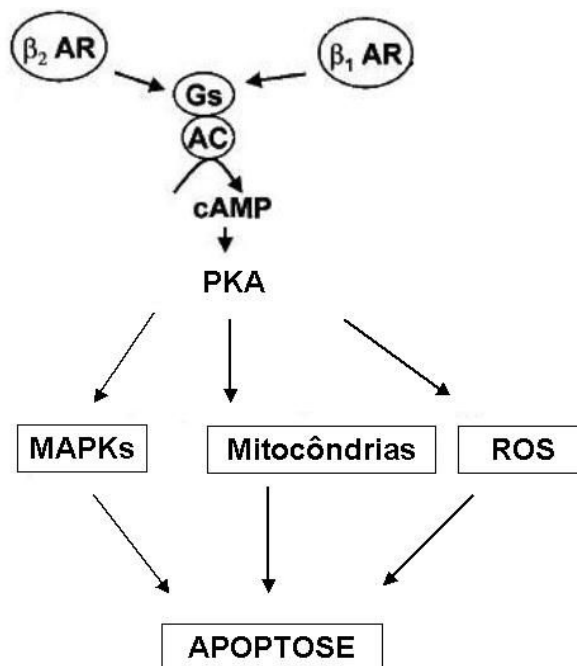


Figura 3: Esquema ilustrando a possível indução da apoptose através da ligação do Isoproterenol aos receptores β -adrenérgicos. Adaptado de Singh et al. (2001). β 1AR, receptor β 1 adrenérgico; β 2AR, receptor β 2 adrenérgico; Gs, proteína G estimulatória; AC, adenilato ciclase; cAMP, AMP cíclico; PKA, Proteína quinase A; MAPKs, Proteínas quinases ativadas por mitógenos; ROS, espécies reativas de oxigênio.

A apoptose é um processo de morte celular programada, no qual células senescentes, danificadas ou em excesso são eliminadas ativamente do organismo. A apoptose está envolvida em muitos processos degenerativos crônicos, incluindo o remodelamento cardíaco após infarto do miocárdio (Clarke et al., 2007). Quando as células miocárdicas são danificadas ou destruídas por deficiência no suprimento de oxigênio e/ou glicose, há aumento de lactato no citosol e diminuição do pH, resultando em acidose e aumento dos níveis de cálcio tissular. Esse aumento acelera a atividade de fosfolipases, favorecendo a degradação de fosfolipídeos, alterando a permeabilidade de membrana e produzindo lesão celular. As alterações na permeabilidade da membrana provocam a perda da integridade das membranas subcelulares, potencializando a liberação de enzimas lisossomais no interstício tecidual e no sangue (Sampath & Vijayaragavan, 2008; Yogeeta et al., 2006).

Essas enzimas são responsáveis pelo dano tecidual agudo. Além disso, ocorre redução da atividade das ATPases, que têm um papel importante nos ciclos de contração e relaxamento do músculo cardíaco, por manter os níveis iônicos de cálcio, sódio, potássio e magnésio (Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , e Mg^{2+}) normais dentro dos miócitos (Sampath & Vijayaragavan, 2008; e Senthil et al., 2007). A perda da atividade das ATPases pode ser responsável por causar dano funcional e mudanças necróticas envolvendo as células miocárdicas (Senthil et al., 2007).

As enzimas lisossomais também podem ter um papel inicial na apoptose e no processo inflamatório por aumentar as espécies reativas de oxigênio (ROS) e estimular a formação de mediadores inflamatórios (Prince et al., 2009). As ROS podem agir em vários tipos de moléculas, mas ao que parece, os alvos mais importantes são os ácidos graxos poliinsaturados, que são precursores da formação de peróxidos lipídicos. A elevação dos peróxidos lipídicos causam danos irreversíveis às membranas miocárdicas (Frederico et al., 2009 e Zhang et al., 2005).

Devido à geração de ROS, o ISO também estimula a geração de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$), que ativa as cascatas de *Nuclear Factor Kappa B* (NF- κ B) e p38MAPK e desse modo, causa uma rápida e transiente indução da ciclooxigenase-2 (COX-2). A COX-2 é um forte mediador inflamatório no miocárdio e pode ser um elemento chave na via final do processo inflamatório (Sampath & Vijayaragavan, 2008; Ribeiro et al., 2009). No trabalho de Ribeiro et al. (2009), observou-se por imunohistoquímica que, após

administração de ISO na dose de 150mg/kg por dois dias consecutivos, ocorreu aumento da expressão de COX-2 no citoplasma e no núcleo de miócitos de ratos.

A ativação de receptores de TNF- α aumenta a produção de metaloproteinases de matriz (MMP). As MMP compreendem uma família de enzimas proteolíticas que degradam a matriz extracelular (MEC) estando, assim, envolvidas no processo de remodelamento estrutural cardíaco (Takano et al., 2003).

Sistemas hormonais também são ativados em animais que recebem doses tóxicas de ISO. Grimm et al. (1998) avaliaram os efeitos agudos e crônicos do ISO e perceberam aumento da atividade da renina plasmática e da aldosterona, além do aumento da atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) cardíaca. Assim, a administração de doses elevadas de ISO parece ativar o sistema renina-angiotensina aldosterona (SRAA). Como se sabe, a ativação da cascata do SRAA facilita a hipertrofia de miócitos, a deposição de matriz e à dilatação das câmaras cardíacas.

Assim, a ativação do SRAA, a formação de ROS e o acúmulo de peróxido lipídicos têm sido reconhecidos como possíveis mediadores do dano miocárdico induzido pelo ISO.

Após a agressão ao miocárdio, um conjunto de eventos estruturais, bioquímicos e eletrofisiológicos ocorrem no coração. Tem-se empregado os termos remodelamento ou remodelação cardíaca para expressar a ocorrência deste conjunto de eventos. O remodelamento cardíaco é um processo que ocorre nas paredes ventriculares, mas se traduz em alterações da geometria das câmaras cardíacas e resulta em mudanças geométricas que afetam o desempenho mecânico do órgão. O remodelamento visa, num primeiro momento, manter a função cardíaca dentro dos limites de normalidade. Com a dilatação progressiva das câmaras cardíacas, entretanto, o remodelamento torna-se gradualmente uma adaptação mal sucedida que leva à descompensação progressiva da bomba cardíaca (Mill et al., 1990). O remodelamento ocorre secundariamente a várias doenças cardíacas e está relacionado ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, incluindo a cardiomiopatia dilatada. O rearranjo de fascículos de miócitos é a causa principal da dilatação ventricular e o consequente afinamento da parede (Teerlink et al., 1994). Além dos miócitos cardíacos, também estão envolvidos no processo de remodelamento cardíaco, fibroblastos, proteínas da matriz extracelular e vasos coronarianos, bem como alterações de muitos mediadores, como fatores

neurohumorais, citocinas, enzimas, radicais livres, canais iônicos, estresse oxidativo, dentre outros (Takano et al., 2003). O entendimento dos mecanismos envolvidos no processo do remodelamento cardíaco é importante, pois serve de base para o desenvolvimento de estratégias de prevenção da dilatação ventricular, a qual tem sido o marcador mais utilizado para definir o processo de remodelamento em várias doenças cardíacas, como no infarto do miocárdio (Fletcher et al., 1981). A figura 4 apresenta um esquema e os eventos que ocorrem entre a injúria causada pelo ISO e o desenvolvimento da CMD.

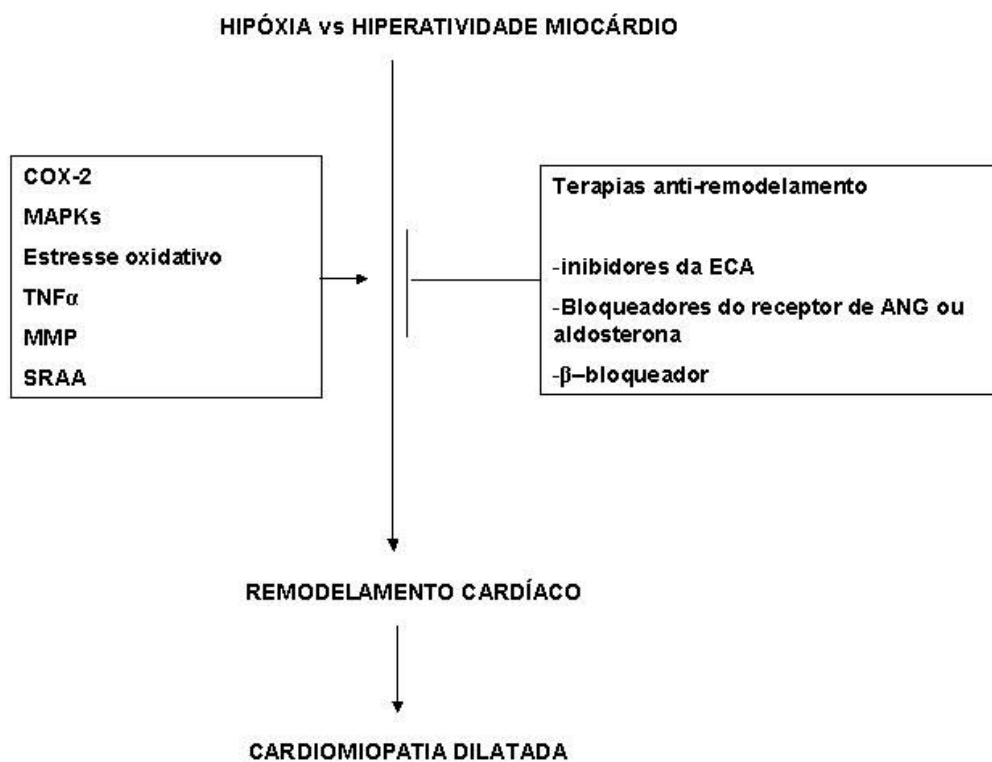


Figura 4: Eventos ocorridos entre a injúria causada pelo isoproterenol, hipóxia vs. hiperatividade miocárdica e o processo de desenvolvimento da cardiomiopatia dilatada (Adaptada de Takano et al., 2003). COX-2, ciclooxigenase 2; MAPKs, Proteínas quinases ativadas por mitógenos; TNF α , Fator de Necrose Tumoral α ; MMP, Metaloproteinases de matriz; SRAA, Sistema Renina Angiotensina Aldosterona; ECA, Enzima Conversora de Angiotensina.

1.5. Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos

O sangue é um tecido em constante renovação, sendo que as hemácias apresentam a maior vida média (cerca de 120 dias) entre todos os componentes celulares do sangue. Por muito tempo os fatores que modulavam a constante

renovação dos componentes celulares sanguíneos eram desconhecidos. A descoberta da eritropoítina, em 1906, esclareceu em parte os mecanismos de controle da produção de eritrócitos, mas também levantou a expectativa de que outros reguladores poderiam existir para controlar a produção celular em outras linhagens hematopoiéticas. Os Fatores de Estimulação de Colônias (CSF) foram identificados incidentalmente a partir de manipulações em sistemas de cultivo que permitia aos precursores específicos de granulócitos e macrófagos proliferar e formar colônias dessa descendência. O ano de 1977 foi o “ano glorioso” para as citocinas hematopoiéticas devido à purificação do CSF. Um dos derivados da purificação do CSF foi o fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF) (Nicola et al., 1983; Metcalf 2008). A forma humana do G-CSF (uma glicoproteína com peso molecular de cerca de 20kD) foi purificada, seqüenciada e clonada simultaneamente nos EUA e Japão (Welte et al., 1985; Nagata et al., 1986).

O G-CSF é uma citocina hematopoiética que controla a hematopoiese (processo de formação de células sanguíneas na medula óssea), agindo em diferentes estágios do desenvolvimento de células mielóides. O G-CSF regula a proliferação, sobrevivência, diferenciação, maturação e ativação funcional das células hematopoiéticas (Paredes-Gamero et al., 2008; Avalos, 1996; e Metcalf, 2008). A figura 5 ilustra a formação das células hematopoiéticas a partir de seus precursores.

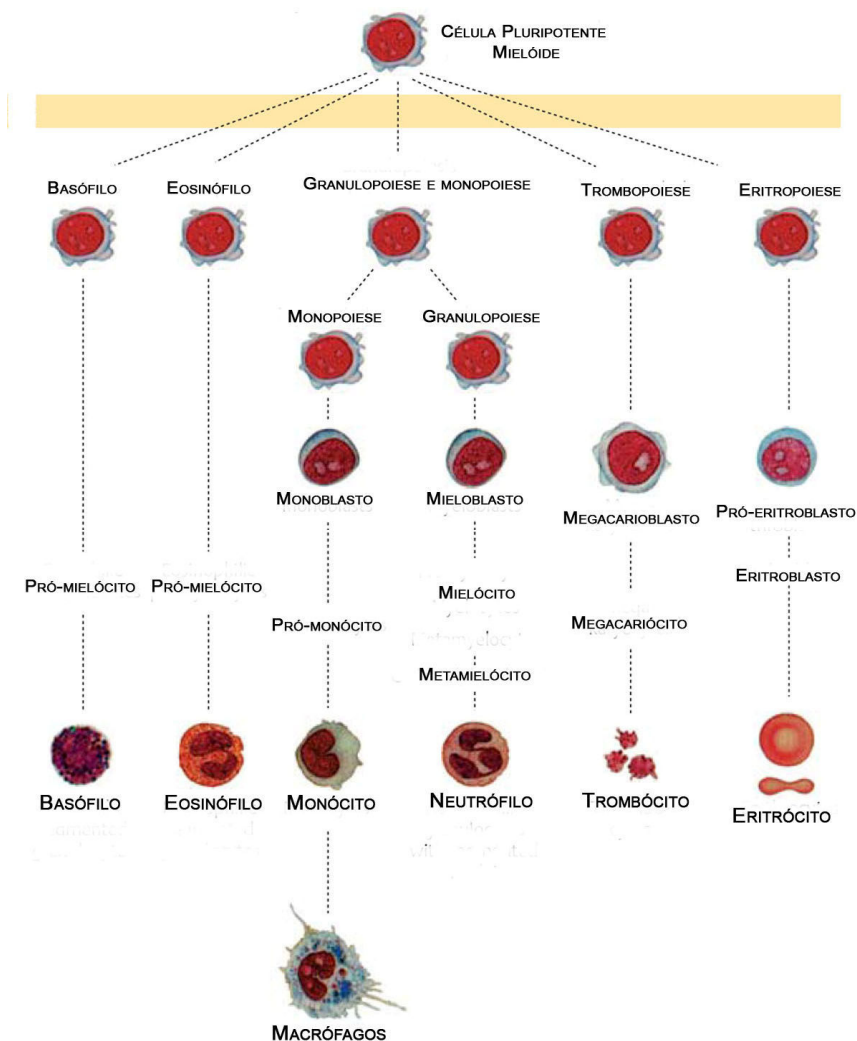


Figura 5: Formação das células hematopoiéticas a partir de seus precursores (Adaptado de Theml et al., 2004).

As células hematopoiéticas, principalmente os neutrófilos, exercem uma função fundamental no sistema de defesa do organismo contra as infecções bacterianas. O efeito granulopoiético potente do G-CSF é produzido em humanos em tratamento de câncer desde 1992 (Avalos, 1996; Blanchard & Corey, 2007). Pacientes submetidos à radioterapia e/ou quimioterapia frequentemente desenvolvem aplasia secundária da medula óssea. O tratamento com G-CSF acelera a recuperação da medula óssea após estes tratamentos.

O G-CSF é produzido por diversos tipos celulares da linhagem hematopoiética, como monócitos, macrófagos e linfócitos, células progenitoras endoteliais, além de fibroblastos e cardiomiócitos (Schwarzmeier, 1996; Lenhoff et al., 1999; Kovacic et al., 2007). O estímulo para sua produção e liberação

geralmente está associado a estados de estresse fisiológico e patológico (Kovacic et al., 2007).

A atividade biológica do G-CSF é mediada por receptores de superfície celular, os quais foram demonstrados por Nicola e Metcalf (1984) ao estudarem o efeito do G-CSF em células hematopoiéticas de camundongos, onde foi possível demonstrar a existência de receptores saturáveis e específicos com alta afinidade para o G-CSF. Além disso, observaram que a metade da atividade biológica máxima do G-CSF ocorre em concentrações significativamente baixas, sugerindo que a ocupação de apenas uma pequena fração do número total de receptores de superfície pode ser suficiente para estimular a resposta biológica máxima.

O receptor de G-CSF (G-CSFR) participa na produção de granulócitos durante desenvolvimento hematopoiético normal, exercendo papel particularmente importante nas hematopoieses de emergência, aumentando o número dessas células na corrente sanguínea (Liongue et al., 2009).

O G-CSFR se expressa principalmente em células hematopoiéticas, incluindo as progenitoras mielóides, neutrófilos, plaquetas e monócitos (Avalos, 1998; Demetri & Griffin, 1991). Além disso, foi observada sua expressão por células endoteliais (Lenhoff et al., 1999), células do sistema nervoso central (Schneider et al. 2005) e também em cardiomiócitos, o que levantou a perspectiva de que essa citocina poderia ter efeitos diretos no coração e em outros tecidos, independentemente do controle da hematopoiese (Srinivas et al., 2009; Baldo et al., 2010).

Por muitos anos os miócitos foram considerados como células perenes, ou seja, não passíveis de divisão e proliferação. Essa idéia começou a se modificar a partir da observação histológica de corações de mulheres (cariótipo XX) transplantados em homens (cariótipo XY). O exame *post mortem* do coração transplantado evidenciava presença marcante de miócitos XY o que levantou a hipótese de que o coração transplantado poderia ser repovoado com células progenitoras do próprio receptor (Quaini et al., 2002).

A partir da década de 90 ampliou-se o interesse pelas terapias celulares em cardiologia levantando-se a hipótese de reparo do tecido danificado por necrose e/ou apoptose. Nesse caso a terapia celular poderia ser feita com células ou estimulando-se o recrutamento e diferenciação de células progenitoras do próprio indivíduo. Como a taxa de regeneração do tecido cardíaco é pequena, essas novas

alternativas de tratamento objetivando a regeneração tissular mostraram-se bastante promissoras.

O grupo de Orlic em 2001 acreditava que células-tronco, particularmente as originadas na medula óssea, teriam a capacidade de colonizar diferentes tecidos, proliferar e se transdiferenciar em células de linhagens específicas. Essa hipótese recebeu reforço ao se observar que a injeção de células da medula óssea de camundongos machos transgênicos expressando proteínas fluorescentes verdes ($\text{Linc}^- \text{-kit}^{\text{POS}}$) no miocárdio infartado de fêmeas criava um tecido de reparo, contendo cardiomiócitos XY. Foi observado que as células injetadas migraram para a área da injúria, diferenciaram-se em miócitos e estruturas vasculares, com melhora do desempenho ventricular (Orlic et al. 2001). Posteriormente, os mesmos autores realizaram outro estudo no intuito de maximizar o número de células da medula óssea na circulação periférica, utilizando as citocinas exógenas “Stem Cell Factor” (SCF) e G-CSF em camundongos infartados. O resultado foi uma diminuição da mortalidade, formação de novos miócitos, diminuição do tamanho do infarto, da dilatação cavitária e do estresse diastólico. Consistente com a identificação de atividade contrátil no miocárdio reparado, a expressão de conexina 43 nos ensaios bioquímicos sugeriram que “gap junctions” ou “junções comunicantes” operantes foram desenvolvidas entre os miócitos, fornecendo as comunicações elétricas entre as células (Orlic et al. 2001).

Ohtsuka et al. (2004) realizaram um protocolo experimental semelhante, mas buscando analisar o efeito do tratamento das citocinas iniciado antes da cirurgia de ligadura da artéria coronária para produzir infarto do miocárdio (IM). Os benefícios hemodinâmicos do tratamento eram independentes da associação dessas citocinas e do tempo de administração. No entanto, o tratamento com G-CSF sozinho apresentou efeitos similares à combinação G-CSF + SCF. O tratamento isolado com SCF não preveniu o remodelamento nem melhorou a sobrevivência. Os resultados sugeriram que o efeito primordial da combinação G-CSF + SCF seria do primeiro e a atenuação do remodelamento pós-ligadura coronariana seria decorrente da mobilização de células-tronco da medula óssea para o coração, com aumento na formação de novos vasos sanguíneos e/ou redução de apoptose. Este último efeito pode decorrer da ativação de vias anti-apoptóticas (através da expressão gênica de Bcl-2) produzida pelo G-CSF como demonstrado em nosso laboratório por Baldo et al., 2008.

A arteriogênese é mediada por fatores de crescimento e citocinas de leucócitos. É fortemente dependente da concentração de leucócitos no sangue periférico. Deindl et al. (2006) verificaram após administração de G-CSF em camundongos, aumento do infiltrado dessas células sanguíneas no miocárdio, e sinais típicos de crescimento arterial colateral, melhorando a perfusão da região peri-infarto no miocárdio.

A ação benéfica de citocinas por meio de efeito parácrinos também foi sugerida por Kanellakis et al. (2006) no modelo de infarto/reperfusão em camundongos. Eles perceberam melhora da função cardíaca e aumento do número de vasos sanguíneos e cardiomiócitos na área infartada pela associação de G-CSF e SCF. Sato et al. (2007) também obtiveram a aceleração da angiogênese no miocárdio de porcos após administração do G-CSF. Ainda nesse modelo, a administração de G-CSF foi eficaz por melhorar a espessura miocárdica e a fração de ejeção ventricular esquerda (Ieishi et al., 2007). Minatoguchi et al. (2004) relataram aceleração da absorção do tecido necrótico via aumento de infiltrado de células inflamatórias, como neutrófilos e macrófagos, além da redução da cicatriz tecidual e aumento de metaloproteinases (MMP), acelerando o processo de cicatrização. Mas poucos cardiomiócitos encontrados foram derivados da medula óssea, sugerindo que o G-CSF não somente promoveria algum grau de regeneração miocárdica, mas também teria a capacidade de proteger diretamente os cardiomiócitos existentes da agressão hipóxica.

A identificação do G-CSFR e a existência de possíveis efeitos cardioprotetores desta citocina determinou a exploração das vias intracelulares de sinalização. Harada et al. (2005) avaliaram essas vias em experimentos *in vitro* e *in vivo* e observaram que o efeito cardioprotetor estava relacionado a via Jak2-Stat3 (*Janus family tyrosine kinases-Signal Transducer and activator of transcription*) e “*upregulation*” dos genes anti-apoptóticos Bcl-2 e Bcl-xL. Observaram melhora nas análises funcionais por ecocardiograma e hemodinâmica.

Ueda et al. (2006) realizaram um estudo com coração de ratos *in vitro* e sugeriram a ativação de outra via com efeitos anti-apoptóticos pelo G-CSF, a via phosphatidylinositol 3-kinase (PI3 K) e Akt, indicando que os efeitos antiapoptóticos do G-CSF podem não depender da mobilização celular. Alguns autores acreditam que os efeitos mediados pelo G-CSF sejam importantes na fase aguda do infarto

pela redução da apoptose em cardiomiócitos e, na fase crônica, pelas alterações na matriz extracelular (Li et al., 2006; Okada et al., 2008).

Outro resultado interessante do G-CSF é sua capacidade de aumentar a expressão de conexina 43, uma importante enzima de conexão de cardiomiócitos capaz de reduzir a resistência longitudinal do sincício miocárdio. Baldo et al. (2008) mostrou em nosso laboratório redução das arritmias ventriculares em ratos infartados e tratados com G-CSF, uma possível consequência do aumento da expressão da conexina 43.

Assim, esses estudos prévios em diferentes animais, modelos experimentais, dose e tempo de administração do G-CSF sugerem que células-tronco da linhagem hematopoiética podem migrar para a circulação periférica acelerando o processo de cicatrização; podem diferenciar-se em cardiomiócitos, células endoteliais, e células musculares lisas vasculares; e exercer efeitos parácrinos, através da ligação com o G-CSFR, modulando os processos de angiogênese e apoptose, resultando em melhora da função cardíaca e redução da mortalidade em animais submetidos à agressão isquêmica. A figura 6 esquematiza os mecanismos pelos quais o G-CSF pode agir no infarto do miocárdio.

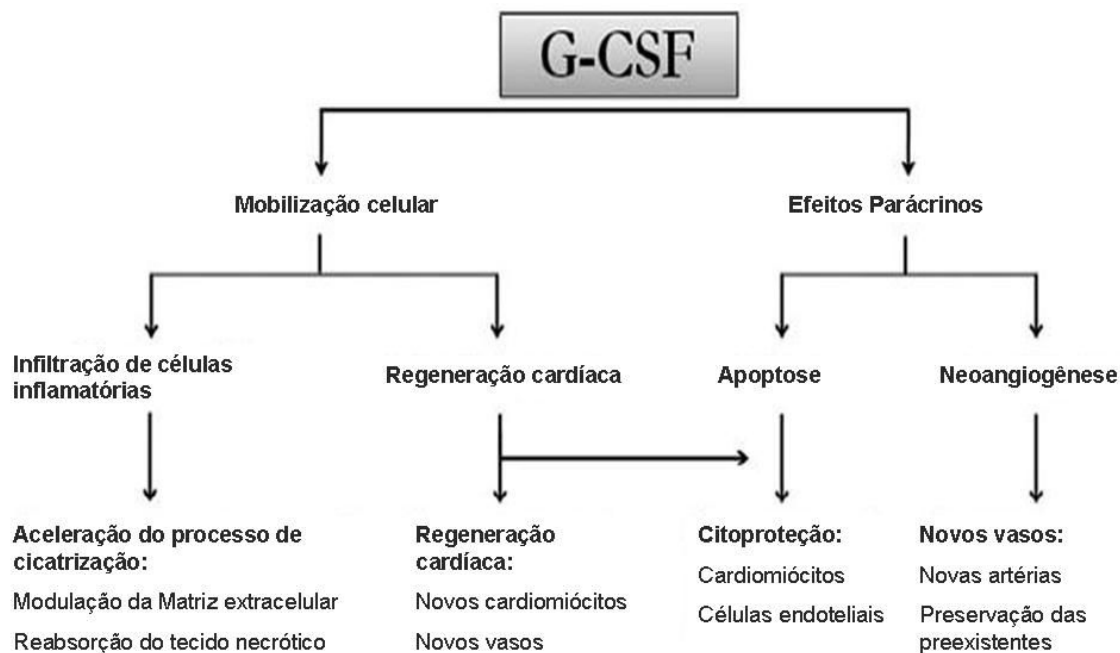


Figura 6: Esquema ilustrativo dos efeitos do G-CSF em corações infartados (Adaptado de Baldo et al., 2010).

Um fato intrigante é que os efeitos benéficos relatados tanto nas terapias celulares como na mobilização de células tronco com G-CSF não são uniformes em diferentes grupos de pesquisa. Deten et al. (2005), por exemplo, estudaram em camundongos o efeito do pré e pós-tratamento com G-CSF+SCF após cirurgia de oclusão permanente da coronária e não observaram qualquer melhora nos parâmetros hemodinâmicos, nem sinal de regeneração tecidual. Nygren et al. (2004) não encontraram evidências de geração de cardiomiócitos no miocárdio infartado. Já no miocárdio viável havia poucos cardiomiócitos gerados da fusão com células hematopoiéticas derivadas da medula óssea com cardiomiócitos residentes. Esses dados estão de acordo com a opinião de Kanellakis et al. (2006) e Murry et al. (2004) em que a diferenciação de células da medula óssea em cardiomiócitos é uma ocorrência rara. Há ainda estudos que não demonstram melhora na função cardíaca nas fases aguda e crônica do IM em ratos tratados com G-CSF, apesar da mobilização de células da medula óssea (Werneck-de-Castro et al., 2006; Louzada et al., 2010). Dessa forma, os resultados dos efeitos do G-CSF no IM ainda permanecem conflitantes e novos estudos são necessários para esclarecer as atuais controvérsias.

Outros modelos experimentais de CMD, como a cardiomiopatia chagásica, provocada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (Macambira et al., 2009; Soares et al., 2007) ou a cardiomiopatia induzida pela doxorubicina (Li et al., 2007; Hou et al., 2006) também exibiram melhora após tratamento com o G-CSF.

A doença de Chagas é uma importante causa de cardiomiopatia na América Latina. No modelo experimental em camundongos, Macambira et al. (2009) observaram que injeções repetidas de G-CSF promoveram mobilização de células-tronco da medula óssea, diminuição da inflamação e da fibrose no coração. A primeira fase de uma triagem clínica de terapia com células-tronco autólogas da medula óssea em pacientes chagásicos também sugeriu benefícios dessa terapia. Após infusão de células derivadas da medula óssea na artéria coronária e cinco administrações tardias de G-CSF, houve significativa melhora da classe funcional, da qualidade de vida, da distância caminhada de 6 minutos e da fração de ejeção medida pelo ecocardiograma, após 60 dias de seguimento (Soares et al., 2007; Vilas-Boas et al., 2006).

Outro modelo de CMD estudada é a causada pela doxorubicina, uma droga antineoplásica com uso clínico limitado devido aos efeitos adversos como apoptose

de cardiomiócitos, cardiomiopatia degenerativa irreversível e IC congestiva. Tomita et al. (2004) relataram que a administração de G-CSF ofereceu efeito cardioprotetor na CMD pós-doxorubicina, proporcionou a migração de células da medula óssea para o coração e melhorou a ultraestrutura dos cardiomiócitos lesados pela droga. Hou et al. (2006) observaram redução de apoptose em cardiomiócitos por diminuição da expressão da proteína transmembrana "*Fas ligand*" (FasL), além de melhora da performance cardíaca após uso do G-CSF.

Como visto acima, o ISO quando injetado em doses tóxicas, leva a uma cardiopatia complexa que aparentemente associa um componente isquêmico sub-endocárdico com um componente de dilatação mais tardio. Até aqui o efeito do G-CSF tem sido estudado em vários modelos de cardiopatia. Essa citocina, entretanto, ainda não foi testada neste modelo experimental de cardiopatia. Importante ressaltar que a cardiopatia produzida pelo ISO assemelha-se, em sua apresentação e evolução, às cardiopatias decorrentes da hiperestimulação adrenérgica. Estas ocorrem, por exemplo, na intoxicação aguda por drogas que atuam no sistema nervoso central e determinam forte estimulação adrenérgica periférica, como a cocaína, ou estimulam diretamente o miocárdio, como a efedrina ou outras aminas simpatomiméticas. Portanto, a exploração dos possíveis efeitos benéficos do G-CSF na cardiopatia induzida pelo ISO pode trazer informações úteis para o tratamento de formas raras, mas extremamente graves, de lesão cardíaca determinada pela hiperestimulação adrenérgica.

Objetivos

.....

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do tratamento com G-CSF sobre os parâmetros estruturais e funcionais do coração de ratos na fase de instalação da cardiopatia determinada por doses elevadas de ISO.

2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1. Quantificar a mobilização de células leucocitárias na circulação periférica provocada pelo G-CSF;
- 2.2.2. Acompanhar as alterações estruturais do ventrículo esquerdo através do ecocardiograma;
- 2.2.3. Avaliar as alterações hemodinâmicas;
- 2.2.4. Determinar as alterações de rigidez do ventrículo esquerdo produzidas pelo tratamento com ISO e ISO + G-CSF;
- 2.2.5. Mensurar a quantidade de colágeno depositado em diferentes regiões do coração (endocárdio, miocárdio, região perivascular) em ratos tratados com ISO e ISO + G-CSF.

Materiais e Métodos

.....

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais Experimentais

O estudo foi realizado em ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) machos com peso entre 260-300g, obtidos no Biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo - UFES. Um número máximo de seis animais foi colocado em cada gaiola. Os ratos ficaram acondicionados em um ambiente com temperatura controlada (aproximadamente 25°C), com ciclo claro-escuros de 12:12-h e acesso livre à água e ração padrão para roedores (Labina/Purina).

Todos os experimentos foram realizados de acordo com o “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (NIH Publication No. 85-23, revised 1996) e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, segundo o protocolo nº. 012/2010.

3.2 Grupos Experimentais

Os animais foram separados aleatoriamente em três grupos:

Controle: os animais não receberam qualquer tipo de intervenção farmacológica;

ISO: receberam dose tóxica (150mg/kg/dia) do agonista β -adrenérgico Isoproterenol (dl-Isoproterenol – hydrochloride – SIGMA), preparado com o veículo salina (NaCl 0,9%) imediatamente antes da aplicação. Os animais receberam o isoproterenol (ISO) por dois dias consecutivos através de injeção subcutânea. Essa dose é utilizada para produção do modelo de cardiomiopatia dilatada como descrito previamente (Yogeeta et al., 2006). Após a segunda aplicação do ISO, receberam salina por mais 7 dias para controle do tratamento;

ISO+G-CSF: 24 horas após a segunda aplicação de ISO como descrito no grupo anterior, os animais receberam tratamento com o Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos (Filgrastim, 50µg/kg/dia, Biosintética) diluído em salina, através de uma injeção subcutânea diária por 7 dias consecutivos.

30 dias após o início do protocolo experimental, os animais foram sacrificados. O esquema do protocolo experimental utilizado no trabalho está ilustrado na figura 7.



Figura 7: Esquema do protocolo experimental demonstrando em vermelho as duas aplicações do isoproterenol seguido de sete doses consecutivas de G-CSF.

3.3 Peso Corporal

Cada animal foi pesado individualmente em balança eletrônica com precisão de dois gramas (Toledo, modelo 9094C/5, Brasil). O peso basal foi mensurado antes do início do protocolo experimental e acompanhado no 3º, 10º, 15º, 20º, 25º e 30º dia.

3.4 Coleta de Sangue e Contagem Leucocitária

Para avaliar a mobilização leucocitária, pequenas alíquotas de sangue de cada animal foram retiradas ao longo do protocolo.

Os animais foram contidos em uma estrutura acrílica apropriada e os pêlos da região lateral da pata traseira foram retirados para melhor acesso à veia safena, que foi puncionada com uma agulha (13X4,5; BD, Brasil). Foi retirada uma alíquota de 20µl de sangue com auxílio de uma pipeta automática e diluído em 280µl de solução de "lise" (ácido acético, 2%) em um eppendorff. Após homogeneização, a amostra foi transferida para câmara de Neubauer (NORMAX, Portugal) encoberta

com lamínula e aguardou-se 5 minutos antes de iniciar a contagem celular no microscópio (BEL Engineering, Top Light B2, Itália).

Obteve-se uma estimativa do número total de células por unidade de volume de sangue por meio da média das células contadas em oitos quadrantes da câmara, multiplicado pelo valor fixo de 200. As contagens leucocitárias foram repetidas no 1º, 3º, 10º e 30º dias do protocolo.

3.5 Análise Ecocardiográfica

O ecocardiograma transtorácico foi realizado no 1º dia do protocolo e repetido no 30º dia. As imagens foram obtidas com transdutor linear PLT-704AT de 7.5 a 12MHz em plataforma Toshiba (Aplio XG Model SSA-79oA). O mesmo ecocardiografista, cego em relação aos grupos, examinou todos os animais nos dois momentos. O procedimento foi realizado sob anestesia com cloridrato de ketamina (50mg/kg, AGENER UNIAO, São Paulo, Brasil) e xilazina (10mg/kg, BAYER, São Paulo, Brasil). Após constatação da perda dos reflexos, os ratos foram posicionados em supino com os quatro membros fixados, os pêlos da região anterolateral torácia removidos e um coxim foi utilizado sob a região torácica para melhor acesso ao coração. Eletrodos subcutâneos foram colocados nos membros para registro simultâneo do eletrocardiograma (ECG).

Imagens de cortes transversais do ventrículo esquerdo no nível dos músculos papilares foram registradas em modo M, e gravadas juntamente com o eletrocardiograma para posterior análise. Os valores obtidos em cada animal correspondem à média das medidas feitas em 4 ciclos cardíacos consecutivos.

A espessura da parede anterior e posterior no final da diástole, e os diâmetros sistólico e diastólico finais foram mensurados no modo M. A frequência cardíaca (FC) foi obtida pelo eletrocardiograma. A fração de ejeção (FE) e a fração de encurtamento (FS) foram fornecidas através do método de Teichholz:

$$FE(\%)=100x (VDF-VSF)/VDF, \text{ onde:}$$

$$VDF(ml)=(7xDDfVE^3/1000)/(2.4+(DDfVE/10))$$

$$VSF(ml)=(7xDDfVE^3/1000)/(2.4+(DSfVE/10))$$

VDF: Volume Diastólico Final

VSF: Volume Sistólico Final

DDfVE: Diâmetro Diastólico final do Ventrículo Esquerdo

DSfVE: Diâmetro Sistólico final do Ventrículo Esquerdo

$$FS(\%)=100 \times (DDfVE - DSfVE) / DDfVE$$

Para o cálculo da massa utilizou-se a seguinte fórmula (Devereux, 1986):

$$\text{Massa VE(g)} = 1,04 \times \{ (DDfVE + EDfPP + EDfPA)^3 - DDfVE^3 \}, \text{ onde:}$$

VE: Ventrículo esquerdo

EDfPA: Espessura Distólica final da Parede Anterior

EDfPP: Espessura Diastólica final da Parede Posterior

3.6 Análise Hemodinâmica

No 30º dia do protocolo experimental (figura do protocolo) os animais foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de ketamina e xilazina (90mg/kg e 10mg/kg, respectivamente) por via intraperitoneal e colocados em decúbito dorsal com os membros fixados na mesa de procedimentos cirúrgicos.

Uma pequena área do pescoço foi depilada e uma incisão feita para acesso à artéria carótida direita. O isolamento da artéria carótida foi realizado cuidadosamente para evitar lesão no nervo vago. Em seguida, um pequeno orifício foi feito, com tesoura oftálmica, para introdução do cateter de polietileno (PE 50) preenchido com salina heparinizada (Heparina Sódica, ARISTON, Brasil). O cateter foi fixado com linha de algodão, conectado a um transdutor de pressão (TRI21, LETICA SCIENTIFIC INSTRUMENTS, Espanha) e este a um sistema automático de aquisição de dados (Power Lab, ADInstruments, Austrália). A taxa de amostragem dos registros foi padronizada em 2KHz.

Os valores da Pressão Arterial Sistólica (PAS) e Pressão Arterial Diastólica (PAD) foram obtidos usando o software LabChart®7 Pro (v7.0.3, ADINSTRUMENTS, Austrália). Após estabilização dos parâmetros hemodinâmicos

centrais, o cateter foi avançado até o ventrículo esquerdo (VE), cuja localização foi confirmada pela forma de onda e pelos valores de pressão observados no monitor acoplado ao Power Lab. A pressão sistólica do VE (PSVE), pressão diastólica final do VE (PDFVE), frequência cardíaca (FC) e as derivadas máxima e mínima de pressão intraventricular esquerda ($dP/dt +$ e $dP/dt -$) foram obtidas. O tempo de coleta foi de aproximadamente 40 minutos. Foi considerado para leitura das análises cerca de 10 minutos do registro estabilizado. Os valores dos parâmetros hemodinâmicos foram informados pelo programa através da média das curvas no tempo selecionado.

A figura 8 ilustra um registro típico da curva de pressão ventricular ao longo do tempo, seguido de uma curva de pressão arterial.

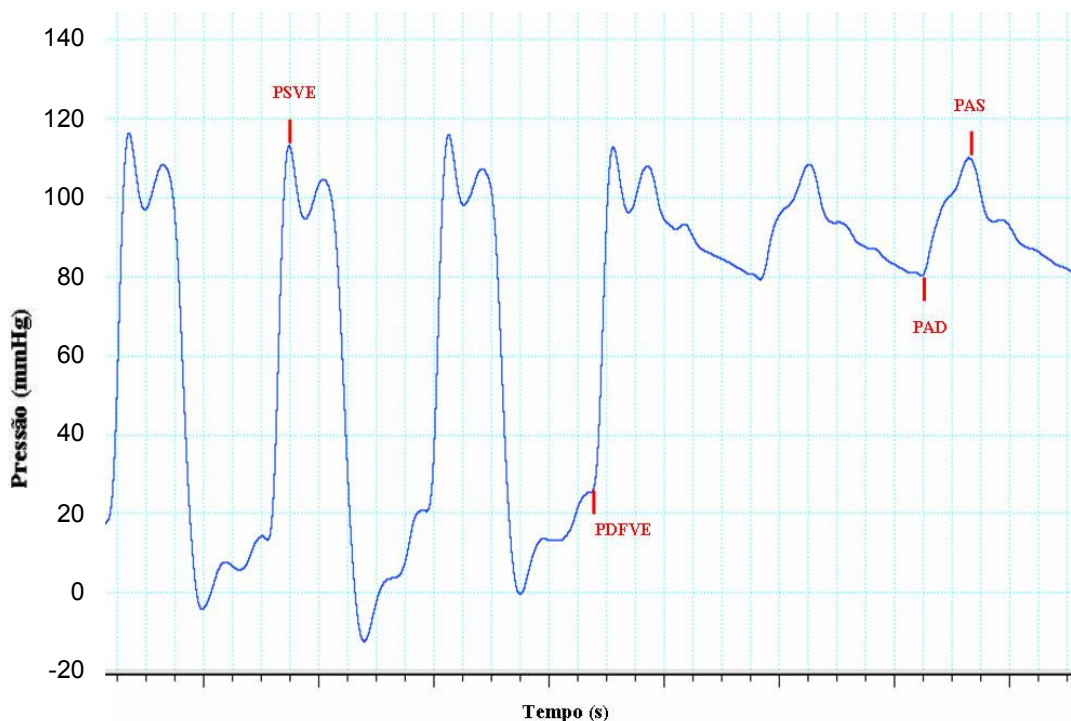


Figura 8: Registro típico da curva de pressão ventricular esquerda seguida pela curva de pressão arterial.

3.7 Análise in situ da Dilatação Ventricular pela Curva Pressão-Volume

Após obtenção dos parâmetros hemodinâmicos, foi injetado na veia cava inferior 0,3ml de KCl (3M) e o coração foi parado para obtenção da curva PV como descrito anteriormente (Flecher, 1981; Baldo et al., 2011). Uma cânula de dupla luz

(uma cânula PE 50 inserida em outra cânula PE200) foi introduzida no VE através da aorta. O sulco atrioventricular foi amarrado com fio de algodão juntamente com a cânula posicionada no VE. Uma incisão na parede do ventrículo direito (VD) foi realizada a fim de evitar acúmulo de líquido nesta câmara.

Cuidadosamente, o VE foi comprimido manualmente para expelir todo sangue da cavidade, o que era confirmado pelo aparecimento de pressão negativa, (aproximadamente 5mmHg) no interior da cavidade.

Uma bomba de infusão (BI 2000, Insight Equipamentos, Brasil), com velocidade constante de 0,68ml/min, foi conectada a um dos braços da cânula instalada no VE. A outra extremidade da cânula foi conectada ao transdutor de pressão. Uma solução de salina (NaCl 0,9%) foi injetada pela bomba no VE até que fosse atingida a pressão de 30mmHg. O desenho da curva foi acompanhado no monitor, onde ocorreu o aumento da pressão exercida pelo líquido na cavidade do ventrículo esquerdo ao longo do tempo.

Pelo menos duas curvas pressão-volume reprodutíveis foram obtidas e registradas no intervalo de tempo de 10 minutos desde a parada cardíaca, para evitar a influência do rigor mortis.

A figura 9 mostra de forma esquemática a preparação para a realização da curva pressão-volume.

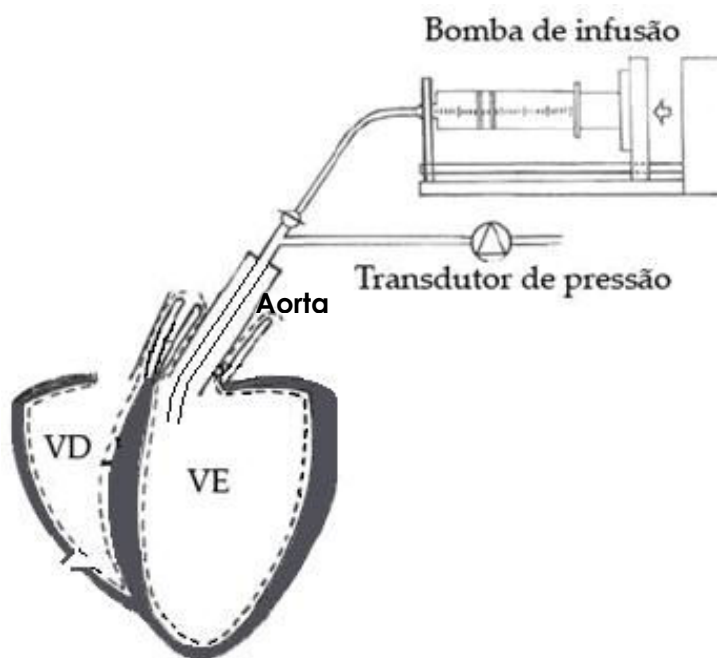


Figura 9: Representação de uma cânula de dupla luz conectada ao ventrículo esquerdo, a uma bomba de infusão e a um transdutor de pressão para realização da curva pressão-volume. (Adaptado de Jugdutt & Idikio, 2007).

Para a análise, foi calculado o volume infundido em valores fixos de pressão (0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30mmHg), sendo adotado o volume 0,05mL para o valor de 0mmHg. Para cada animal foi realizada a média de duas curvas. A dilatação ventricular foi verificada ajustando-se os dados da curva PV para uma regressão linear entre 0 e 5mmHg, obtendo a primeira constante (K1). Já para avaliar a rigidez ventricular, a curva foi ajustada utilizando um modelo monoexponencial entre 5 e 30mmHg, sendo a fórmula descrita como:

$$P = b \cdot e^{k \cdot v}, \text{ onde:}$$

P= pressão

b= taxa de crescimento exponencial

e= base dos logaritmos neperianos

k= constante de rigidez

v= volume

A Figura 10 mostra um registro típico da uma curva pressão-volume.

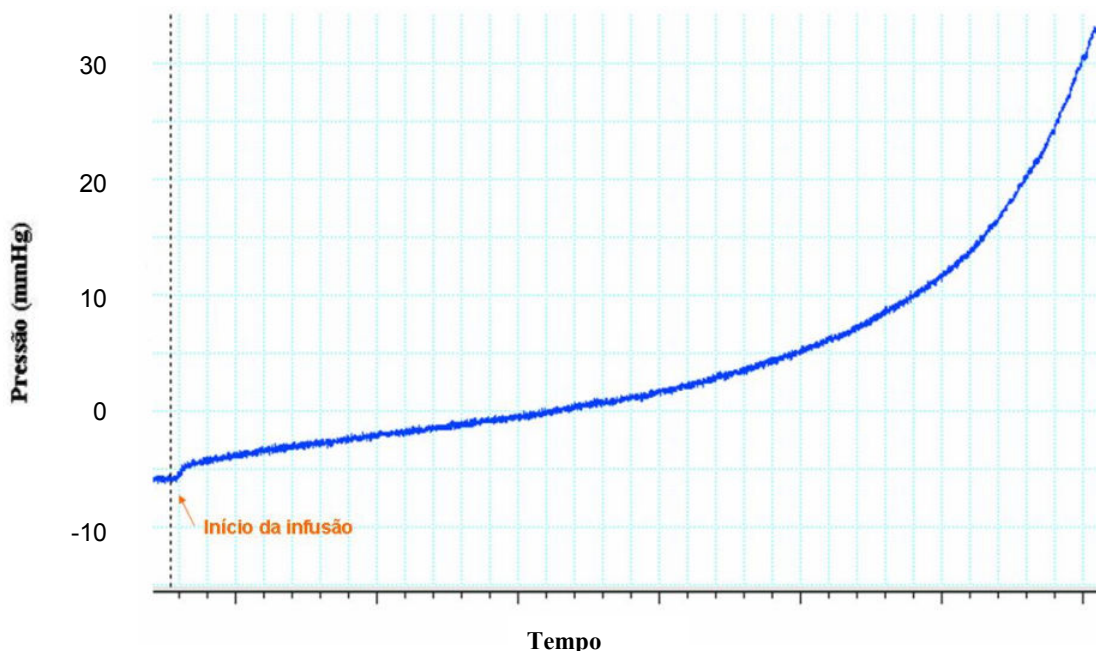


Figura 10: Registro típico da curva pressão-volume. Há um aumento da pressão exercida pela infusão de volume no ventrículo esquerdo ao longo do tempo.

Através da curva pressão-volume obteve-se também o Índice de Volume Diastólico Final do Ventrículo Esquerdo (IVDFVE). O IVDFVE compreende o volume

presente na cavidade ventricular esquerda que exerce a pressão diastólica final observada nas análises in vivo.

3.8 Medidas Ponderais

Após realização da curva PV, o coração foi retirado, lavado com solução salina e os átrios desprezados. Em seguida, foi feita a individualização dos ventrículos, sendo o septo interventricular considerado como parte do VE. O excesso de umidade foi removido com papel filtro e os ventrículos pesado em balança de precisão (Bioprecisa, FA-2104N, Brasil) para obtenção do peso úmido. Os pesos úmidos do VE e do VD foram obtidos separadamente. Por último, o VD foi colocado em estufa a 96°C por vinte e quatro horas para obtenção do peso seco, possibilitando o cálculo da porcentagem de água tecidual.

Os pesos úmido e seco dos pulmões e fígado também foram obtidos segundo a mesma padronização.

3.9 Histologia

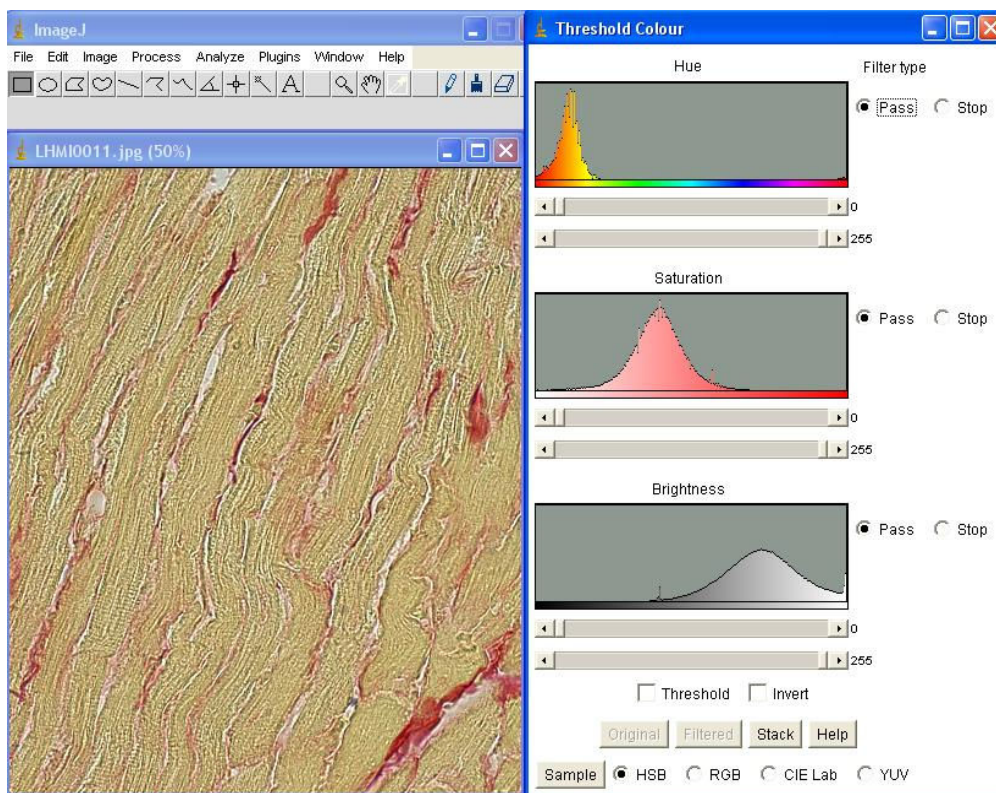
Após mensuração do peso úmido, o VE foi guardado em solução tampão de formaldeído a 10% (7,4pH) para análise histológica. As preparações histológicas foram realizadas por examinador cego em relação aos grupos. Três cortes transversais de aproximadamente 3mm da base, região média e ápice do coração passaram por processo de desidratação em banho de álcool, diafanização em banhos de xilol e inclusão em bloco com banhos de parafina. Em seguida, passaram pela microtomia com fatias de 6µm de espessura e coloração com Picrosirius red (Picrosirius Red, F3BA).

A quantidade de colágeno foi avaliada na região endocárdica, miocárdica e perivascular. Por meio de um microscópio (BEL Engineering, Top Light B2, Itália) foram feitas pelo menos 11 fotos de cada fatia do coração (máquina OLYMPUS, x-750, Indonésia), sendo 5 da região endocárdica, 4 da miocárdica, ambas com amplificação de 40x, e 2 fotos de vasos arteriais, com amplificação de 100x. De cada corte, ou seja, da base, região média e ápice, foram selecionadas duas fatias.

Totalizando assim, 30 fotos do endocárdio, 24 fotos do miocárdio e 12 fotos de vasos arteriais de cada animal. Todas as imagens foram obtidas de forma aleatória pelo analisador autor-cego.

Utilizando o software específico (Image J, 1.33u, EUA) adequadamente calibrado, foi quantificada a área percentual do colágeno da figura. Como o colágeno foi corado em vermelho, utilizou-se uma escala de cor para retirar as demais tonalidades, obtendo-se assim, o valor percentual de colágeno. O analisador autor-cego antecipadamente passou por um teste de qualificação, repetindo 4 vezes o cálculo de 15 imagens e obteve um erro estimado de 4%. A média total por região representou os valores de cada grupo.

A figura 11 apresenta uma imagem do software e da escala de cor utilizados para as análises.



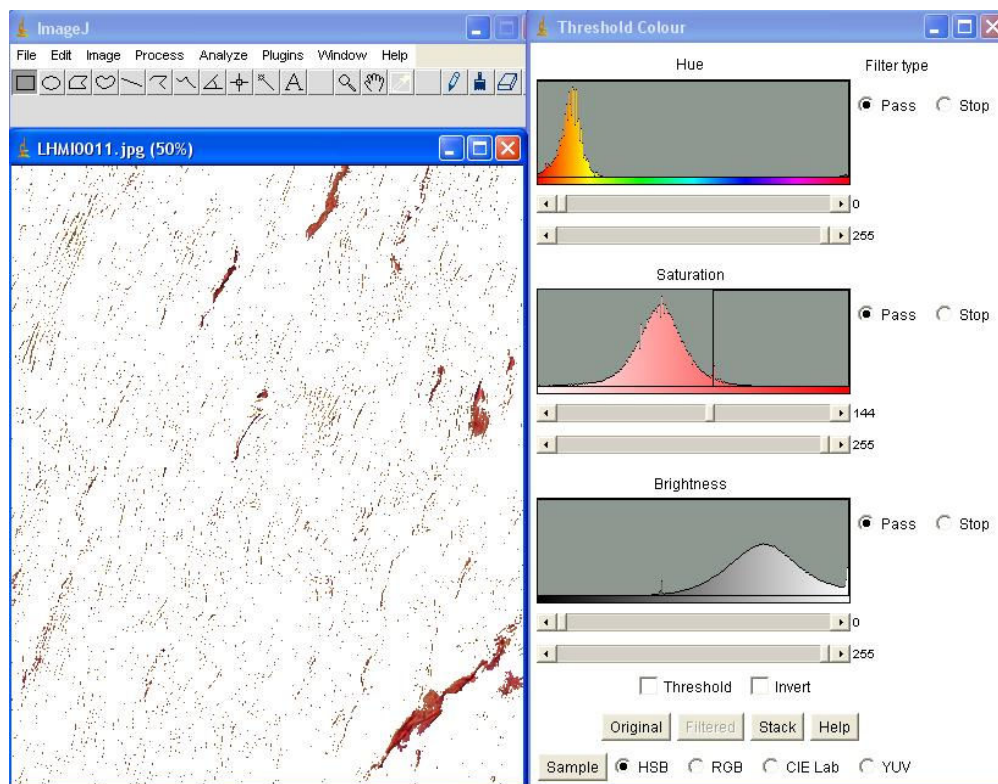


Figura 11: Imagem do software Image J antes e após a quantificação. Em vermelho está representado o colágeno.

3.10 Análise Estatística

Todos os valores estão expressos no texto e nos gráficos como média \pm erro padrão da media (E.P.M.). A análise de variância (ANOVA) de uma via foi utilizada nas comparações entre os três grupos experimentais. Para comparação entre as medidas repetidas do ecocardiograma foi utilizado ANOVA de duas vias seguida do teste de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

Para as análises foi utilizado o software SPSS para Windows (SPSS SOFTWARE VERSAO 13, EUA). Para construção dos gráficos, foi utilizado o software OriginPro versão 7.0 (ORIGINLAB CORPORATION, MA, EUA).

Resultados

.....

4 RESULTADOS

4.1 Mortalidade

Foram utilizados 155 ratos para a execução de todos os protocolos experimentais. Sendo 41 animais do grupo Controle, 65 do grupo ISO e 49 pertencentes ao grupo ISO+G-CSF. A mortalidade relacionada ao isoproterenol foi de 18,4%. Assim, dos 114 ratos que receberam ISO, 21 morreram (18,4%). Sendo 14 após a primeira dose (66,7%) e 7 após a segunda dose do agonista β -adrenérgico (33,3%).

Observaram-se com as aplicações de isoproterenol sinais de agitação, taquicardia, ereção dos pêlos, juntamente com perda de peso corporal (Controle, $291 \pm 5,33g$; ISO $268 \pm 4,62g$; ISO+G-CSF $266 \pm 4,13g$; $p < 0,05$).

4.2 Mobilização Leucocitária

O número de leucócitos no sangue periférico não diferiu na medida basal entre os grupos (Controle, $14,086 \pm 984$ céls./mm³; ISO, $14,182 \pm 1,059$ céls./mm³; ISO+G-CSF, $15,912 \pm 1,331$ céls./mm³). Após a segunda dose de isoproterenol, observou-se um aumento significativo no número de células nos dois grupos que receberam tratamento em relação ao grupo Controle (Controle, $14,572 \pm 0,888$ céls./mm³; ISO, $20,393 \pm 1,534$ céls./mm³; ISO+G-CSF, $18,987 \pm 1,541$; $p < 0,05$), um incremento de 1,4 vezes no grupo ISO e 1,3 vezes no grupo ISO+G-CSF. No décimo dia do protocolo (24 horas após a última dose de G-CSF) esse aumento foi mantido nos dois grupos, porém, com uma tendência de aumento após a última dose de G-CSF (Controle, $14,475 \pm 0,745$ céls./mm³; ISO, $18,353 \pm 1,068$ céls./mm³; ISO+G-CSF $20,834 \pm 1,591$ céls./mm³; $p < 0,05$). A contagem de leucócitos totais estava semelhante aos valores basais no último dia do protocolo (Controle, $14,425 \pm 0,797$ céls./mm³; ISO, $15,963 \pm 0,765$ céls./mm³; ISO+G-CSF $15,553 \pm 1,293$) (Figura 12).

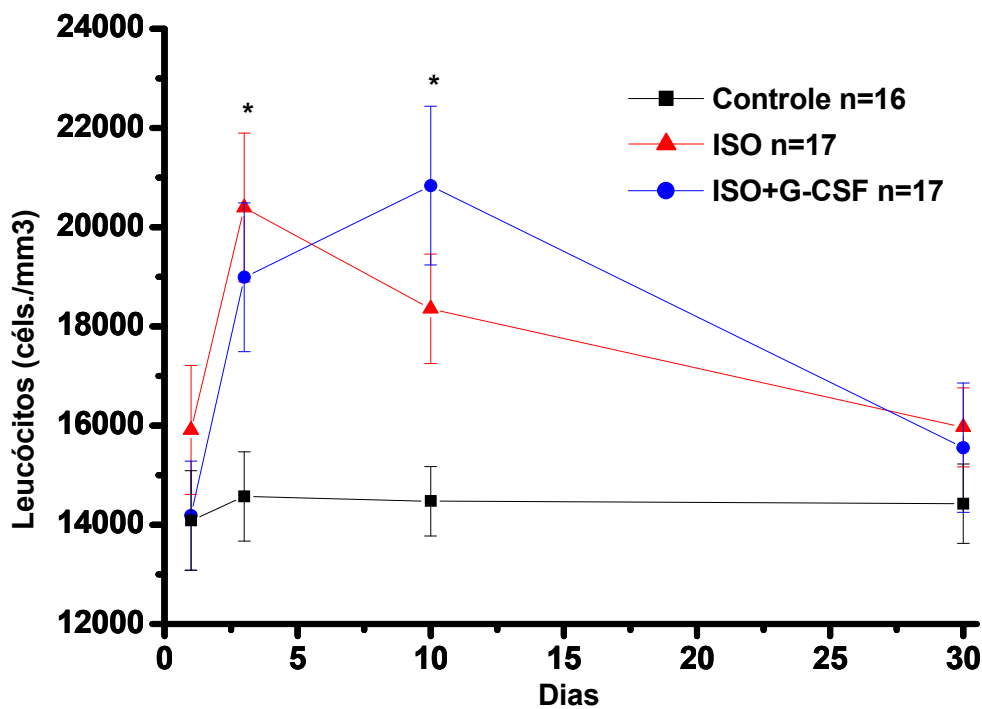


Figura 12. Contagem de leucócitos no 1º, 3º, 10º e 30º dia do protocolo. Dados apresentados como média \pm EPM.

* $p < 0,05$ vs. Controle.

4.3 Parâmetros Ponderais

O peso corporal inicial foi semelhante nos três grupos avaliados (Controle, $281 \pm 3,85$ g; ISO, $284 \pm 3,70$ g; ISO+G-CSF, $283 \pm 4,56$ g). Como descrito anteriormente, os animais submetidos ao tratamento com isoproterenol perderam aproximadamente 30g do peso corporal. No entanto, o ganho de peso ao longo do tempo desses animais foi maior do que no grupo Controle, de forma que, tornou-se semelhante a partir do 20º dia do protocolo e manteve-se equilibrado até o 30º dia (Controle $401 \pm 8,51$; ISO $411 \pm 6,83$; ISO+G-CSF $396 \pm 5,97$) (Figura 13).

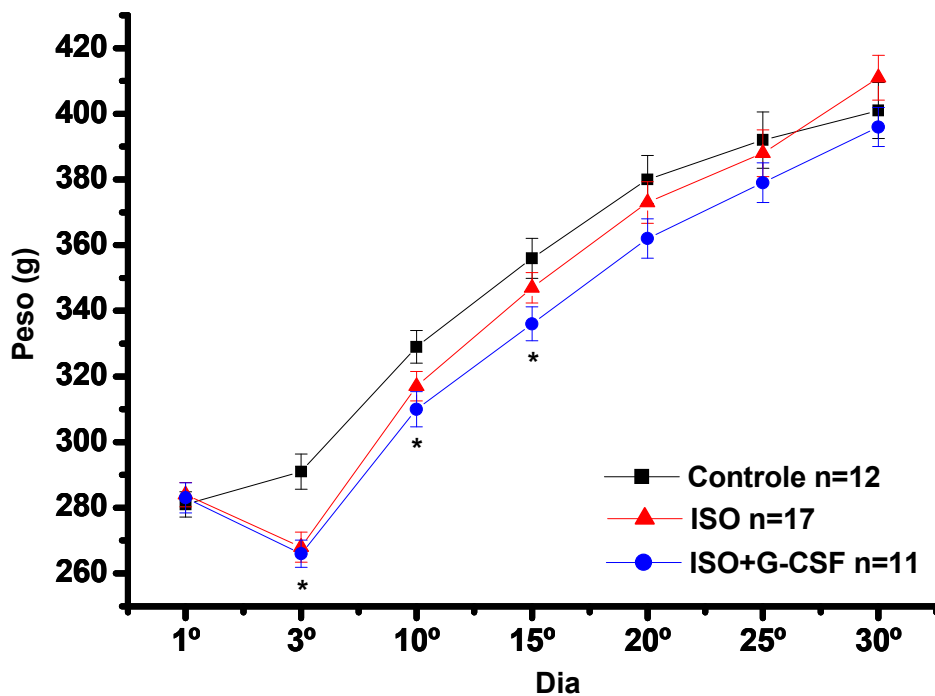


Figura 13. Peso corporal ao longo do tempo. Dados apresentados como média \pm EPM.
* $p < 0,05$ vs. Controle.

Objetivando avaliar um possível aumento da massa ventricular, o VE e o VD foram pesados no 30º dia do protocolo, mas não houve diferença significativa entre os grupos. A tabela 3 apresenta os parâmetros ponderais dos grupos Controle, ISO e ISO+G-CSF. Os demais parâmetros mensurados também não diferiram entre os grupos.

	Controle	ISO	ISO+G-CSF
	(n=21)	(n=25)	(n=24)
VE (mg)	788±20	788±36	775±41
VE/PC (mg/g)	1,99±0,04	2,01±0,03	2,03±0,04
VD (mg)	201±05	192±09	190±10
VD/PC (mg/g)	0,51±0,01	0,49±0,01	0,50±0,01
Pulmões (g)	2,1±0,06	2,0±0,06	2,0±0,09
Pulmões/PC (mg/g)	5,33±0,18	4,78±0,13	5,04±0,20
%H₂O Pulmões	79,9±0,14	80,0±0,16	80,2±0,25
Fígado (g)	15,9±0,51	15,8±0,48	15,3±0,35
Fígado/PC (mg/g)	40,11±0,92	38,75±0,91	38,78±0,64
%H₂O Fígado	72,6±0,27	72,4±0,22	72,4±0,21

Tabela 3. Parâmetros Ponderais. VE, ventrículo esquerdo; PC, peso corporal; VD, ventrículo direito.

4.4 Medidas Ecocardiográficas

A figura 14 apresenta cortes transversais do ventrículo esquerdo em modo M dos grupos Controle, ISO e ISO+G-CSF no 30º dia do protocolo, juntamente com o registro do eletrocardiograma. Observa-se na parte superior, a parede anterior do ventrículo esquerdo, e na inferior, a parede posterior. O espaço entre as regiões côncavas das paredes anterior e posterior do ventrículo esquerdo representa o diâmetro diastólico final. Já entre as regiões convexas tem-se o diâmetro sistólico final.

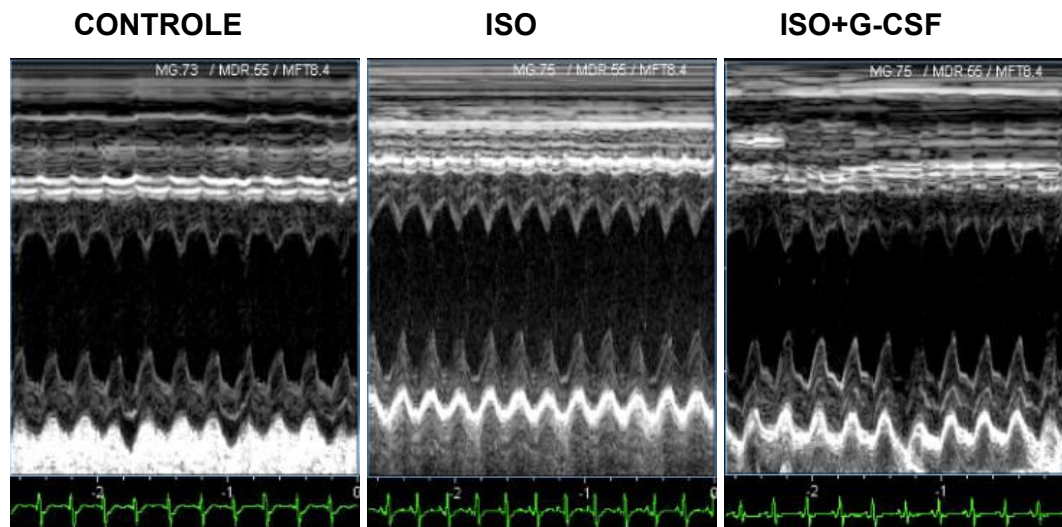


Figura 14. Ilustração do ecocardiograma. Cortes transversais do VE em modo M.

Visivelmente observa-se um aumento dos diâmetros sistólico e diastólico final no grupo ISO em relação ao grupo Controle. Analisando esses dados numericamente pela tabela 4, confirma-se o aumento do diâmetro diastólico final (Controle, $7,7 \pm 0,14$ mm; ISO, $8,7 \pm 0,16$ mm; ISO+G-CSF $7,8 \pm 0,09$; $p < 0,05$) e do diâmetro sistólico final (Controle, $3,9 \pm 0,21$ mm; ISO, $4,8 \pm 0,22$ mm; ISO+G-CSF $4,1 \pm 0,10$ mm) no grupo ISO em relação ao Controle, caracterizando a dilatação ventricular. Já no grupo ISO+G-CSF, o tratamento com G-CSF foi eficaz na prevenção do alargamento da cavidade ventricular esquerda, percebido através do diâmetro diastólico final.

Não foram detectadas diferenças entre os grupos nas medidas do septo, parede posterior, massa e frações de encurtamento e ejeção com 30 dias do protocolo.

Comparando a primeira com a segunda medida do ecocardiograma, vê-se aumento do diâmetro diastólico final nos três grupos estudados, do diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo no grupo ISO, e da massa do VE nos grupos Controle e ISO. Avaliando a massa, percebe-se que no grupo ISO houve uma tendência de aumento em relação ao grupo Controle, que poderia caracterizar hipertrofia ventricular, mas não houve diferença significativa, estando de acordo com os resultados obtidos nos parâmetros ponderais.

	Controle (n=8)	ISO (n=8)	ISO+G-CSF (n=7)
EDfPA(mm)	1,5±0,03 1,5±0,04	1,5±0,02 1,3±0,02*	1,5±0,02 1,4±0,03
EDfPP(mm)	1,5±0,02 1,5±0,02	1,4±0,02 1,3±0,02	1,4±0,03 1,4±0,05
DDfVE(mm)	7,0±0,24 7,7±0,14 [§]	7,1±0,12 8,7±0,16 ^{§,*‡}	7,2±0,11 7,8±0,09 ^{§,#}
DSVE(mm)	3,5±0,16 3,9±0,21	3,8±0,13 4,8±0,22 ^{§,*}	3,9±0,15 4,1±0,10
FE(%)	82,5±2,55 84,9±1,93	81,8±1,23 80,9±1,82	79,0±3,05 83,5±1,55
Massa VE (mg)	662,6±41,9 785,7±26,8 [§]	647,2±22,5 853,0±27,7 [§]	687,6±22,1 766,9±29,8
FS(%)	49,8±1,00 49,2±2,06	47,4±1,18 45,6±1,63	46,0±1,58 47,9±1,26

Tabela 4. Parâmetros ecocardiográficos. EDfPA, espessura distólica final da parede anterior; EDfPP, espessura diastólica final da parede posterior; DDfVE, diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo; DSVE, diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo; FE, fração de ejeção; FS, fração de encurtamento.

* p<0,05 vs. Controle

p<0,05 vs. ISO

‡ p<0,05 vs. ISO+G-CSF

§ p<0,05 vs. momento basal

4.5 Resultados Hemodinâmicos

Na tabela 5 estão apresentados os parâmetros hemodinâmicos avaliados. Não houve diferença significativa na frequência cardíaca, pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica, pressão sistólica do ventrículo esquerdo, pressão diastólica final do ventrículo esquerdo, volume diastólico final do ventrículo esquerdo, e derivadas máxima e mínima de pressão intraventricular esquerda.

	Controle (n=12)	ISO (n=19)	ISO+G-CSF (n=16)
FC (bpm)	245±5,7	241±6,3	235±6,5
PAS (mmHg)	114±4,1	113±2,9	113±2,9
PAD (mmHg)	84±4,1	82±2,9	83±2,4
PSVE (mmHg)	127±5,0	126±2,9	126±3,6
PDFVE (mmHg)	7±0,7	7±0,6	7±0,9
IVDFVE (μl)	331±37	381±56	306±33
dP/dt+ (mmHg/s)	4856±188	4806±133	4775±181
dP/dt- (mmHg/s)	-3369±196	-3731±173	-3593±177

Tabela 5. Parâmetros Hemodinâmicos. FC, frequência cardíaca; PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica; PSVE, pressão sistólica do ventrículo esquerdo; PDFVE, pressão diastólica final do ventrículo esquerdo; IVDFVE, Índice de Volume Diastólico Final do Ventrículo Esquerdo; dP/dt, derivada máxima de pressão.

4.6 Curva Pressão-Volume

A figura 15 ilustra a curva pressão-volume integral nos três grupos estudados

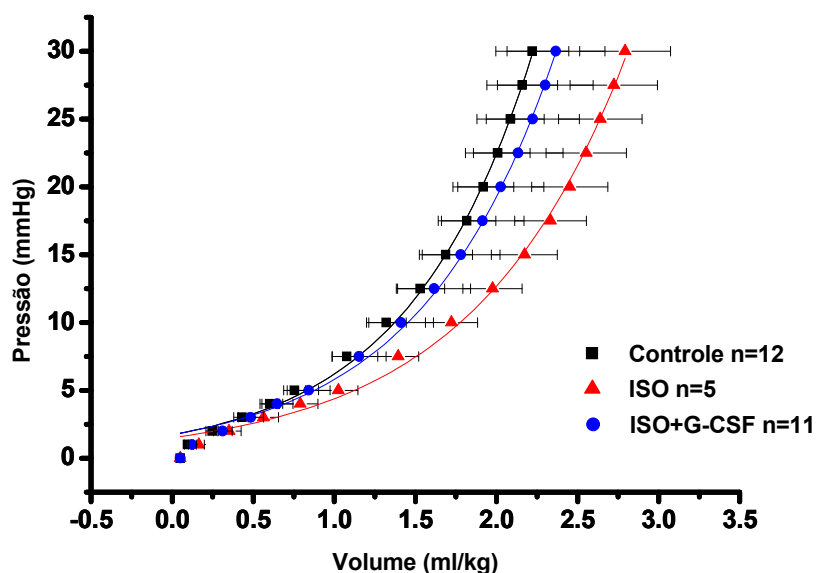


Figura 15: Curva pressão-volume. Dados apresentados como média ± EPM.

O segmento linear entre 0 e 5mmHg da curva pressão-volume, ilustrado na figura 16, nos permite avaliar a dilatação do ventrículo esquerdo. Há uma tendência do grupo ISO a dilatação por apresentar menor inclinação da reta em relação ao grupo Controle, mas não foi estatisticamente significativa (Controle $K1=6,79\pm0,60$; ISO $K1=5,31\pm1,04$; ISO+G-CSF $K1=7,49\pm1,24$ $P = 0,068$).

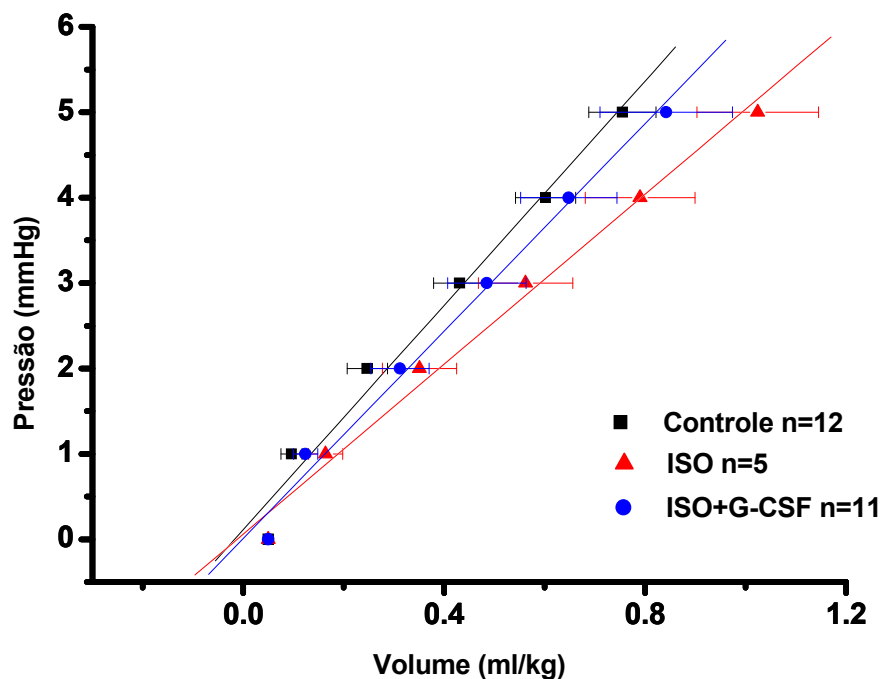


Figura 16: Ajuste linear da curva pressão-volume. Dados apresentados como média \pm EPM.

A figura 17 representa uma curva exponencial entre 5 e 30mmHg para análise da rigidez ventricular, não apresentando diferença estatística entre os grupos (Controle $K2=1,46\pm0,21$; ISO $K2=1,06\pm0,15$; ISO+G-CSF $K2=1,37\pm0,18$).

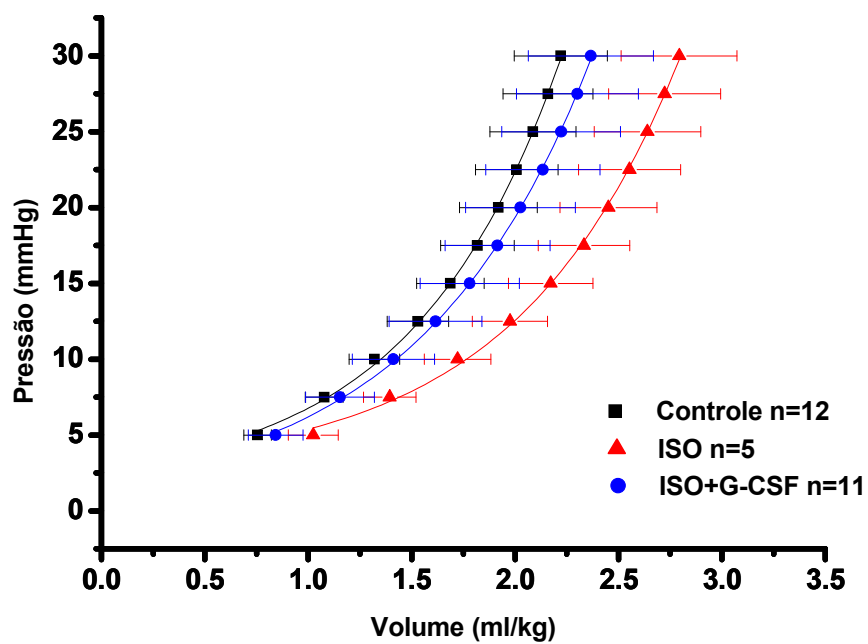


Figura 17: Ajuste monoexponencial da curva pressão-volume. Dados apresentados como média \pm EPM.

4.7 Parâmetros Histológicos

A figura 18 apresenta cortes histológicos da região endocárdica, miocárdica e perivascular nos três grupos estudados. Percebe-se visualmente uma elevação da quantidade de colágeno nos grupos que receberam ISO.

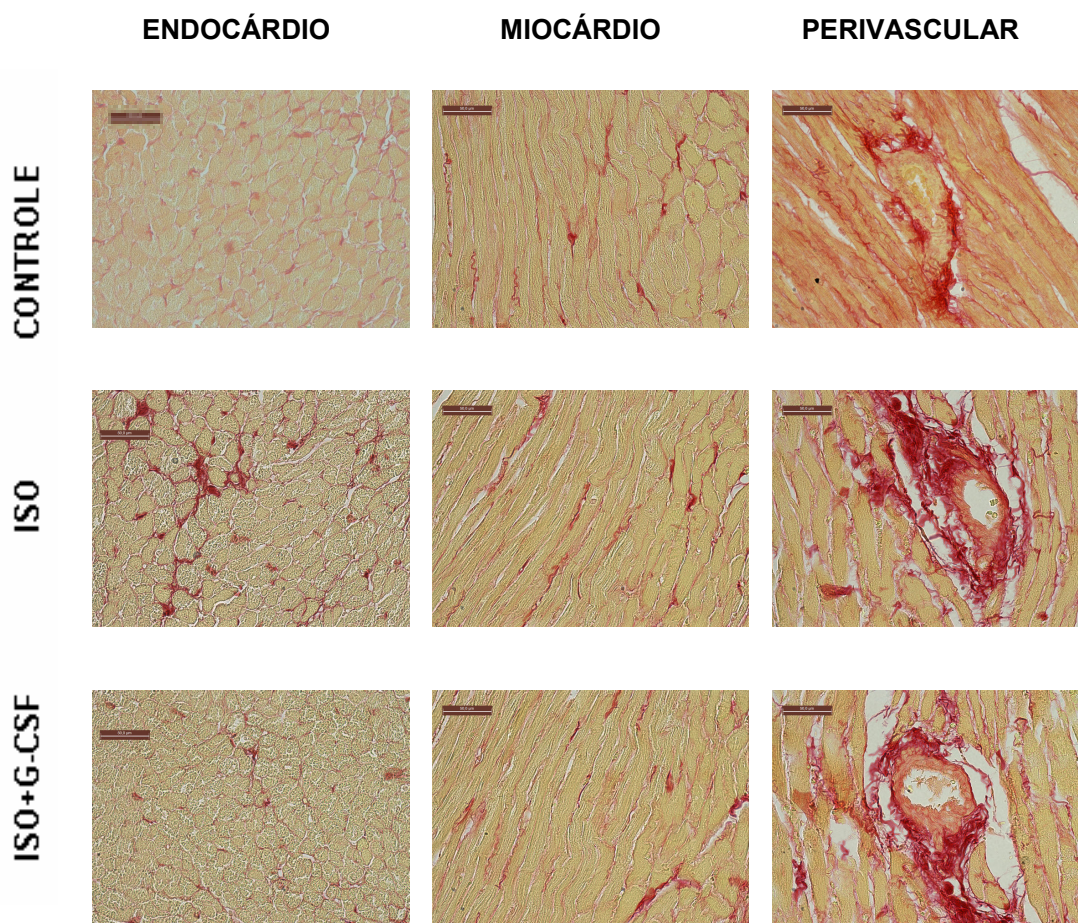


Figura 18. Cortes histológicas da região endocárdica, miocárdica e perivascular. Colágeno representado em vermelho. Legenda canto superior esquerdo 50.0 μ m.

A tabela 6 e figura 19 apresentam o percentual de colágeno da região endocárdica, miocárdica e perivascular, avaliado pela coloração com Picrosirius Red. No grupo ISO, a porcentagem de colágeno na região endocárdica foi elevada em relação ao grupo controle, e o tratamento com G-CSF preveniu em parte esse aumento. O colágeno da região miocárdica foi elevado no grupo ISO+G-CSF em relação ao Controle. Já na região perivascular houve um aumento acentuado da fração de colágeno dos grupos que receberam isoproterenol e o tratamento com G-CSF não produziu efeito.

	Controle (n=9)	ISO (n=8)	ISO+G-CSF (n=10)
Endocárdio(%)	2,0±0,18	9,1±0,81 ^{*‡}	5,9±0,58 ^{*#}
Miocárdio(%)	2,0±0,14	2,9±0,35	3,9±0,32 [*]
Perivascular(%)	6,6±0,89	10,6±0,58 [*]	10,4±0,41 [*]

Tabela 6. Parâmetros Histológicos. Diferença significativa com P<0,05 com o grupo controle (*), ISO (#), ISO+G-CSF (‡).

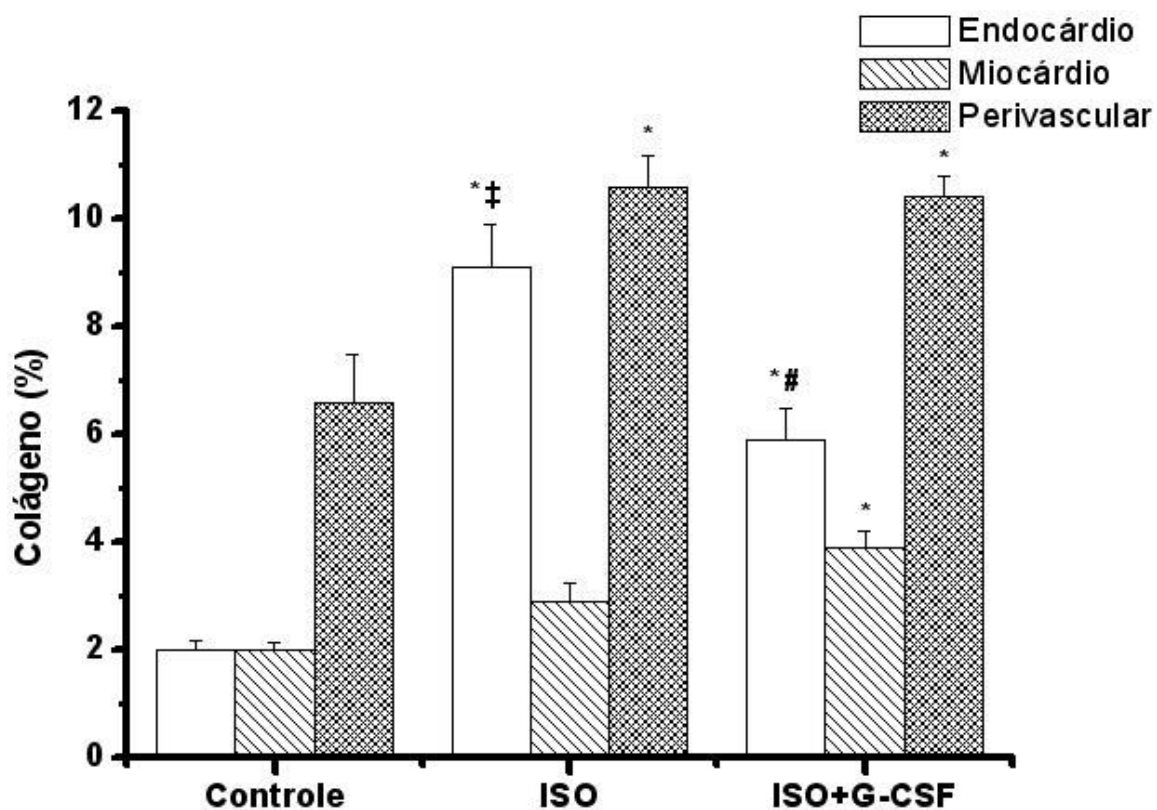


Figura 19: Ajuste monoexponencial da curva pressão-volume. Dados apresentados como média ± EPM. Diferença significativa com P<0,05 com o grupo controle (*), ISO (#), ISO+G-CSF (‡).

Discussão

.....

5. DISCUSSÃO

5.1 Principais Achados

Os principais achados deste estudo foi o simples tratamento com ISO determina importante mobilização de leucócitos a qual não foi ampliada pelo G-CSF. Nos animais submetidos ao ISO, o tratamento com G-CSF por 7 dias previne a dilatação ventricular e atenua de forma importante o acúmulo de colágeno, notadamente na região subendocárdica do ventrículo esquerdo, justamente a que é mais afetada pela agressão determinada pela catecolamina. Desta forma, os nossos dados indicam uma atenuação do remodelamento ventricular após injeção de doses tóxicas de ISO em ratos.

5.2 Aspectos Básicos

A CMD em humanos pode decorrer de herança genética, mas doenças inflamatórias ou efeitos tóxicos de medicamentos, álcool ou drogas ilícitas também aparecem entre as causas freqüentes. A CMD está associada à disfunção sistólica principalmente do ventrículo esquerdo com evolução progressiva, podendo levar a quadros graves de IC (Jefferies & Towbin, 2010; Awtry & Philippides, 2010). Atualmente não existe uma terapia totalmente eficaz para cura da doença, por isso, diversos estudos em modelos experimentais têm sido realizados visando retardar a progressão da doença, o que certamente apresenta impacto positivo na qualidade de vida dos pacientes.

Segundo Wexler & Greenberg (1978), a excessiva liberação endógena ou a administração exógena de catecolaminas deterina mudanças patofisiológicas no miocárdio que são comparáveis às determinadas pelo infarto do miocárdio em humanos. Desta forma, doses seqüenciais e altas de ISO têm sido empregadas visando testar diferentes esquemas terapêuticos visando atenuar a progressão da lesão.

São duas as fases da cardiotoxicidade induzida pelo ISO: a aguda e a crônica. Na fase aguda, os efeitos se desenvolvem dentro de minutos a horas após

a administração subcutânea e caracterizam-se por aumento dos sinais e relacionados à hiperativação do sistema nervoso simpático (SNS), ocorrendo também alterações microvasculares, principalmente na região subendocárdica do ápice do ventrículo esquerdo que, frequentemente evoluem para infarto. Os efeitos crônicos se desenvolvem após dias a meses, com o processo de remodelamento cardíaco, inicialmente apresentando dilatação da cavidade ventricular, mas sem alteração funcional. O comprometimento da contratilidade e da função ventricular ocorre mais tardiamente e de forma progressiva, levando à insuficiência cardíaca (Feng & Li, 2010; Sing et al. 2000).

Atualmente, não existem terapias para cura da CMD, sendo alta a indicação para o transplante cardíaco. Como a regeneração miocárdica é pequena, novas formas de tratamento estão sendo estudadas na cardiologia em busca de regeneração tissular, sendo a terapia celular a principal delas.

A terapia com células-tronco hematopoiéticas em associação com citocinas, como o G-CSF, tornou-se atrativa para a cardiologia a partir de trabalhos realizados por diversos grupos de pesquisadores, como o de Anversa e colaboradores nos Estados Unidos no início deste século (Orlic et al., 2001) demonstrando reparo de lesões cardíacas isquêmicas e melhora funcional em animais de experimentação. Adicionalmente outros estudos tentaram identificar estes mesmos efeitos benéficos apenas com o uso de citocinas, pois isso evitaria os procedimentos de injeção de células. Trabalhos sugeriam que o G-CSF poderia desempenhar várias funções nestas condições como o recrutamento de células derivadas da medula óssea, geração de novos vasos sanguíneos, proteção de cardiomiócitos dos processos de apoptose, diminuição da fibrose e até mesmo geração de novos cardiomiócitos. Um problema enfrentado nestes estudos, a exemplo do que ocorreu com os estudos com células, foi a diversidade de resultados descritos na literatura.

A realização deste estudo deve-se ao fato de que a literatura ainda não apresenta trabalhos descrevendo os efeitos do G-CSF na CMD induzida pelo efeito tóxico de catecolaminas. Neste caso, a agressão isquêmica ocorre em situação em que não há alteração da circulação coronariana. O esquema de utilização do G-CSF por 7 dias após o ISO está vinculado a informações providas por estudos anteriores (Deten et al., 2005; Sugano et al., 2005). A escolha da dose de 50µg/kg de G-CSF baseou-se em trabalho do nosso laboratório que mostrou redução de arritmias cardíacas e mortalidade de ratos submetidos ao IM e tratados com esta dose da

citocina (Baldo et al., 2008). Em outro estudo, também desenvolvido em nosso laboratório, mostrou-se que esta dose de G-CSF já produz a mobilização máxima de leucócitos polimorfonucleares para o sangue periférico (Freitas, 2010). As análises dos animais e do coração foram realizadas 30 dias após a agressão pelo ISO e três semanas após conclusão do tratamento com G-CSF para verificar se a citocina teria algum efeito em prevenir a dilatação progressiva do ventrículo esquerdo que é um processo progressivo e característico da CMD.

5.3 Mortalidade e Características Ponderais

A mortalidade com o uso de doses tóxicas de catecolaminas é geralmente alto. Assim, Grimm et al. (1998) avaliaram o efeito de uma única dose de ISO em ratas Sprague-Dawley nas doses de 50, 100, 150, 200, 250 e 300mg/kg e observaram aumento progressivo da mortalidade de 0, 10, 20, 50, 80 e 90%, respectivamente. Já Feng & Li (2010), trabalharam com ratos Wistar machos, recebendo duas doses de ISO com intervalo de 24 horas. Observaram mortalidade entre 10 e 20% na dose de 85/85mg/kg a qual aumentou para 40 a 50% nas doses de 85/340mg/kg. Em nosso estudo utilizamos dose um pouco maior (150 mg/kg) e a mortalidade situou-se próxima a 20%, sendo que a maior parte dos animais morria nas 24 horas subseqüentes à primeira administração da catecolamina.

O peso corporal foi similar nos três grupos no início do estudo, ocorrendo perda do peso corporal com as aplicações de ISO. A perda aguda de peso foi totalmente recuperada ao longo do processo de acompanhamento dos animais. Resultado semelhante foi encontrado por Teerlink et al (1994) em ratos Wistar tratados com duas doses de ISO (170mg/kg) e acompanhados ao longo do tempo, não apresentando diferença em relação ao grupo controle na segunda, sexta e décima sexta semana após a administração do ISO.

Embora haja um aumento progressivo do peso corporal com a idade, o agonista β parece não ter efeito sob o crescimento do animal. Sugere-se que a perda aguda de peso pode ser decorrente de efeito anorético da catecolamina, de acentuação do processo de lipólise ou ainda decorrente da própria lesão cardíaca. Não há dados em nosso trabalho que possam identificar tais processos. Mas estudos anteriores mostram que níveis elevados de catecolaminas depletam as

reservas energéticas das células musculares, levando a alterações bioquímicas e estruturais que causam dano celular irreversível (Rona, 1985). Como observado nos achados histopatológicos de Ribeiro et al. (2009), em que a zona infartada apresentava edema intersticial, com presença de neutrófilos e extensa degeneração miofibrilar.

Segundo o trabalho de Zhang et al, (2005) a infusão contínua de isoproterenol na dose de 1000ng/kg/min por 30 minutos aumentou a frequência cardíaca em aproximadamente 48% e foi mantida durante toda a infusão. Sinais de agitação, ereção de pêlos e taquicardia também foram observados em nosso estudo, sugerindo hiperatividade simpática após a administração de ISO.

Alguns estudos mostram que utilizando baixa dose de ISO por 7 dias, há desenvolvimento de hipertrofia ventricular (Krishnamurthy et al., 2007; Krenek et al., 2009). Brooks & Conrad (2009) viram com apenas uma dose alta de ISO (85mg/kg) hipertrofia do ventrículo direito e esquerdo (VE), confirmada pela relação do peso desses com o peso corporal (PC). Grimm et al (1998) utilizaram uma única dose de 150mg/kg em ratos e detectaram aumento aproximado de 50% na relação VE/PC com duas semanas da aplicação. Esse aumento do peso ventricular permaneceu ao longo do protocolo experimental, existindo uma diferença de 37% na décima sexta semana, mas sem alteração no ventrículo direito.

Já nos experimentos de Teerlink (1994), não há diferença no peso do VE após quinze dias da segunda dose de ISO nas doses de 85mg/kg, 170mg/kg e 340mg/kg, sugerindo que a perda do miocárdio foi totalmente compensada pela deposição de fibrose e/ou pela hipertrofia nos miócitos remanescentes. Porém, 16 semanas após a aplicação de ISO, foi observado aumento do peso ventricular de maneira dose dependente. Em nosso estudo não detectamos hipertrofia cardíaca no grupo tratado com ISO, nem na avaliação da espessura de parede no ecocardiograma e nem no peso ventricular obtido 4 semanas após o tratamento. O peso ventricular, entretanto, não é bom parâmetro para análise de hipertrofia neste modelo experimental pois o tratamento com ISO pode levar à redução no número total de miócitos nas câmaras cardíacas. Neste caso, a confirmação ou não de hipertrofia deveria ser feita pela análise histológica dos miócitos.

Observamos também que não houve alteração de peso úmido e porcentagem de água nos pulmões e fígado, indicando ausência de congestão hepática ou edema pulmonar. Esses dados estão de acordo com os achados do cateterismo cardíaco e

do ecocardiograma que não demonstraram prejuízo funcional no grupo submetido ao ISO, indicando que as análises hemodinâmicas foram feitas ainda dentro de uma fase compensada da cardiomiopatia. Nossos resultados corroboram com os dados relatados por Grimm et al. (1998), em que apenas doses iguais ou superiores a 200mg/kg de ISO levam a um quadro de edema pulmonar e necrose em rins e fígado.

5.4 Mobilização Celular

O processo de cicatrização após IM envolve uma complexa cascata de respostas moleculares, celulares e fisiológicas. Nas primeiras 24 horas do insulto, os sinais inflamatórios recrutam neutrófilos, monócitos e macrófagos para a zona de infarto. Esses leucócitos degradam os componentes da matriz extracelular, os cardiomiócitos mortos e seus detritos, auxiliando a formação do tecido de granulação (Nahrendorf et al., 2007).

Estudos recentes em modelo de infarto do miocárdio produzido por ligadura da artéria coronária indicam que o G-CSF mobiliza células hematopoiéticas e progenitoras residentes em nichos específicos da medula óssea para a circulação periférica o que permite aceleração do processo de cicatrização (Sugano et al., 2005; Lee et al., 2009; Werneck-de-Castro et al., 2006; Deindl et al., 2006; Cheng et al. 2008). No infarto produzido por ligadura coronária em diversas espécies de animais o recrutamento é dependente do uso do G-CSF, sendo diferente dos animais infartados submetidos a placebo. Um quadro diferente foi observado no animais tratados com ISO em que apenas a catecolamina já produziu aumento significativo de leucócitos no sangue periférico sugerindo ou um efeito direto da catecolamina na medula ou ainda que o a lesão produzida pelo ISO no coração teria um caráter predominantemente inflamatório, e não isquêmico, com liberação de citocinas mobilizadoras de células progenitoras da medula óssea. Interessante observar que o G-CSF não conseguiu adicionar efeito ao ISO, sugerindo que a medula já estaria em seu grau mais elevado de estimulação. A migração dessas células para o local da injúria depende de moléculas de adesão, como por exemplo, as selectinas e integrinas (Nian et al., 2004).

Minatoguchi et al. 2004 observaram em coelhos submetidos a um modelo de isquemia seguida por reperfusão, nenhum aumento no número de linfócitos, apenas de granulócitos e monócitos com o G-CSF. Esse aumento acelerou a absorção do tecido necrosado no coração e conseqüentemente o processo de reparo tecidual.

Uma pesquisa em humanos com quadro de IC causada por CMD ou isquêmica utilizou quatro períodos de tratamento com G-CSF com duração de 10 dias cada. A contagem leucocitária total e a de células CD34+ (um marcador de células-tronco) foi realizada por citometria de fluxo. Verificou-se que a administração de G-CSF foi seguida por um rápido aumento nas células brancas sanguíneas. Já as células CD34+ tiveram um pico geralmente observado no sexto dia após aplicação da citocina. A mobilização das células-tronco hematopoiéticas variou amplamente entre os pacientes, mas permaneceu constante de ciclo a ciclo em cada indivíduo.

Assim, está claramente descrito na literatura a mobilização de células da linhagem hematopoiéticas da medula óssea para a circulação periférica após um insulto cardiovascular, e um aumento acentuado desse processo por citocinas, como o G-CSF, após administração exógena, acelerando o processo de cicatrização.

Um trabalho recente desenvolvido em nosso laboratório comparou a mobilização leucocitária diante de diferentes doses de G-CSF. Foi observado que a dose de 50mg/kg exercia efeito similar à dose de 25mg/kg e 100mg/kg, com aumento de 290% nas células da circulação periférica (Freitas, 2010). A elevação de células no período inicial de ação da droga reflete a mobilização de neutrófilos maduros pré-formados. No entanto, a elevação da contagem de leucócitos no período tardio reflete a proliferação e a diferenciação de células progenitoras da medula óssea (Ohdo et al., 1998).

No presente trabalho, observamos que a administração de ISO aumentou em cerca de 40% a contagem leucocitária. A mobilização apresentou tendência a aumento após as aplicações de G-CSF. Ao final de 30 dias, os valores retornaram ao basal. Entretanto, como descrito nos trabalhos acima, no modelo de IM por ligadura da artéria coronária o grupo não tratado com G-CSF apresenta pouca ou nenhuma mobilização celular causado pela cirurgia de obstrução da artéria coronária. Já em nosso trabalho o insulto produzido pelo ISO aumentou o número de leucócitos na circulação periférica. Isso nos leva a pensar que a aplicação do ISO poderia estimular a mobilização celular.

A participação do SNS na mobilização de células da medula óssea já foi descrita. A ativação de receptores β -adrenérgicos de células estromais da medula óssea tem funções específicas durante a mobilização de células progenitoras hematopoiéticas, colaborando para o incremento na mobilização em situações de estresse. O mecanismo pelo qual isso ocorre não é bem descrito, mas é provável que esteja relacionado com o eixo CXCL12-CXCR4 porque é o único par de receptores de quimiocinas capaz de atrair células progenitoras hematopoiéticas e o seu rompimento é suficiente para induzir a mobilização (Katayama et al., 2006; Spiegel et al., 2007; Méndez-Ferrer et al., 2010).

Experimentos em andamento em nosso laboratório têm mostrado que o pré-tratamento de ratos com antagonista beta-adrenérgico (propranolol) reduz a mobilização leucocitária produzida pelo G-CSF. Desta forma, a mobilização de células da medula no estresse poderia ser determinado diretamente pelo aumento de catecolaminas circulantes atuando em receptores beta.

5.5 Dilatação Ventricular Esquerda

O processo de remodelamento ocorre com uma resposta adaptativa no qual o miocárdio alteraria a sua estrutura para manter a função da bomba cardíaca. A presença de segmentos da parede com material não contrátil gera uma sobrecarga para as áreas remanescentes da câmara cardíaca, o que induz hipertrofia com padrão ecêntrico nessas regiões que, acompanhada do deslizamento de fileiras de miócitos, leva ao aumento volumétrico da câmara. O processo de remodelamento é influenciado por estresse mecânico, resposta inflamatória, ativação neurohumoral e ativação de metaloproteinases de matriz.

Teerlink et al (1994) descreveram o curso temporal das alterações funcionais e estruturais do coração após uma única administração subcutânea de ISSO em doses elevadas. Foi observada dilatação progressiva da cavidade ventricular esquerda, porém sem repercussões hemodinâmicas. Ocorreu um deslocamento progressivo para direita em todas as doses de ISO analisadas. Entretanto, a dose de 85mg/kg não levou a uma dilatação significativa após 2 semanas da injeção mas apenas após 6 semanas. Já em doses maiores (175 e 340mg/kg) houve aumento do volume do ventricular já na segunda semana.

Os resultados do presente trabalho mostram que os animais submetidos à aplicação de ISO apresentaram apenas tendência para deslocar a curva PV para direita, mas sem diferença estatisticamente significativa. Comparando com os resultados de Teerlink et al. (1994), nós utilizamos duas aplicações de ISO com intervalo de 24 horas, uma concentração intermediária de 150mg/kg, e tempo de verificação de 4 semanas. Acreditamos que a cavidade ventricular esquerda esteja em processo de remodelamento, com alargamento progressivo, e que o método utilizado da curva pressão-volume não foi sensível o suficiente para detecção das alterações.

Já as medidas da dilatação ventricular vistas através do ecocardiograma evidenciaram alargamento da cavidade ventricular esquerda ao longo do tempo nos animais que receberam ISO. O tratamento com G-CSF logo após a administração de ISO preveniu essa dilatação. Achados semelhantes foram observados por Li et al. (2007) administrando G-CSF em ratos com CMD induzida por doxorubicina. Os animais que receberam a droga tiveram os diâmetros do VE aumentados, e o tratamento com G-CSF impediu a dilatação.

Em nossos achados, não ocorreram alterações na função ventricular esquerda feita através das análises hemodinâmicas e ecocardiográficas. A intenção do estudo era realmente avaliar os possíveis efeitos do G-CSF na fase compensada da CMD. Assim, apesar da dilatação ventricular no grupo ISO a função estava preservada. Acreditamos que em uma fase mais tardia o coração entre na fase descompensada da cardiomiopatia. Entretanto, Teerlink et al. (1994) observaram um aumento da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo de forma concentração-dependente, mesmo com uma dose inferior a utilizada nesse estudo (85mg/kg), e nenhuma mudança tempo-dependente.

Li et al. (2006) observaram a persistência dos efeitos benéficos do G-CSF na função cardíaca a longo prazo em animais infartados. Baseado nisso, um estudo já em andamento em nosso laboratório pretende avaliar se com 6 meses após o insulto provocado pelo ISO os animais apresentarão alterações funcionais, se a preservação da dilatação ventricular produzida pelo G-CSF é mantida, e se o G-CSF atuaria melhorando essas alterações hemodinâmicas.

Park et al. (2007) estudaram os efeitos do G-CSF em cães em estágio avançado de CMD e detectaram melhora da função cardíaca, da pressão arterial e da motilidade da parede ventricular após 5 dias de administração da citocina.

Miyata et al. (2006) relataram resultados semelhantes em hamsters, com melhora da função ventricular acompanhada de diminuição do diâmetro diastólico final. Tatsumi et al. (2008) observaram em camundongos transplantados com células da medula óssea de doadores saudáveis e submetidos à infusão por 7 dias de ISO (150mg/kg), que o tratamento com G-CSF melhora temporariamente a função cardíaca, independente do transplante. Isso reforça a idéia que o efeito benéfico do G-CSF não foi devido a regeneração da injúria miocárdica por repovoamento com cardiomiócitos intactos, mas por aumento do recrutamento de células tronco derivadas da medula óssea para a área da injúria com possíveis efeitos parácrinos, controle da apoptose ou neovascularização.

5.6 Redução do Colágeno

A matriz extracelular miocárdica é constituída por complexa rede de proteínas interconectadas, incluindo colágeno (principalmente dos tipos I e III), elastina e fibronectina interagindo com integrinas na junção matriz/célula. Promove suporte arquitetônico para as células musculares, vasos sanguíneos e linfáticos, e tem um papel importante na função miocárdica, proporcionando o deslizamento celular, transdução de força e proteção contra ruptura (Weber et al., 1994).

Após um insulto, o tecido responde com inflamação e liberação de citocinas para modular o reparo e a adaptação tecidual. Essas citocinas não são normalmente expressas no coração e sua produção representa uma resposta à injúria. Agudamente, a elaboração de citocinas contribui para sobrevivência ou morte de miócitos, modulação da contratilidade cardíaca, alterações do endotélio vascular, e recrutamento de células circulatórias para o miocárdio. Isso leva a estresse oxidativo local adicional, mas também inicia o processo de cicatrização (Nian et al., 2004).

Os níveis dessas citocinas normalmente diminuem para valores basais após a primeira semana da injúria. A presença sustentada de TNF- α , interleucinas e fator beta de transformação de crescimento (TGF- β), por exemplo, leva a ativação de metaloproteinases da matriz (MMP) e dos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs), além da formação de colágeno, modificando a matriz intersticial. A degradação e a produção de colágeno constituem a maior mudança protéica na matriz miocárdica, estando associados com remodelamento estrutural do ventrículo

esquerdo. A formação de fibrose pode determinar o aparecimento de distúrbios de condução com comprometimento da função da bomba cardíaca (Peng et al., 2002; Nian et al., 2004).

O estudo de Pauschinger et al. (1999) em humanos, detectou através de pequena biópsia endomiocárdica em pacientes com diagnóstico de CMD um aumento no RNAm do colágeno tipo I e III e de TGF- β . Feng & Li (2010) observaram após 8 semanas de seguimento, intensa fibrose no miocárdio de ratos tratados com ISO por dois dias consecutivos. Em nosso estudo, após 4 semanas de acompanhamento, observamos um aumento da fração de colágeno na região endocárdica e perivascular. Esse aumento de fibrose após tratamento com ISO pode estar associado à injúria miocárdica gerada por esse tratamento. Pode-se especular, baseado em estudos anteriores, que esse aumento ocorreu como consequência do aumento de citocinas profibróticas, como TNF- α , TGF- β e interleucinas, juntamente com o aumento do número de receptores AT1 e a ativação do SRAA (Feng & Li, 2010; Grimm et al, 1998; Sampath & Vijayaragavan, 2008; Yogeeta et al., 2006; Ribeiro et al., 2009).

Células da medula óssea contêm precursores endoteliais com características fenotípicas e funcionais de hemangioblastos embrionários, e esses podem ser utilizados diretamente na indução de formação de novos vasos sanguíneos no leito infartado (vasculogênese) e proliferação da vasculatura preexistente (angiogênese) após IM experimental. A neoangiogênese promove diminuição da apoptose na região peri-infartada, sobrevivência do miocárdio viável e redução na deposição de colágeno com melhora sustentável na função cardíaca. Mediadores inflamatórios incluindo o G-CSF estão envolvidos na indução do recrutamento de células-tronco primitivas derivadas do sangue (Kocher et al., 2001).

Estudos com diferentes animais, doses, seguimento, fases e tempos de administração do G-CSF, após IM por ligadura da artéria coronária, demonstraram que o tratamento é benéfico por atuar no remodelamento cardíaco, diminuindo a apoptose (Hasegawa et al., 2006), produzindo arteriogênese (Deindl et al., 2006), reduzindo as áreas de colágeno (Minatoguchi et al., 2004; e Okada et al., 2008), e melhorando a sobrevida (Baldo et al., 2008).

No modelo de CMD produzido pela doxirrubicina, Hou et al. (2006) e Tomita et al. (2004) identificaram alterações morfológicas típicas desse tipo de lesão, como aumento de mitocôndrias, vacuolização do citoplasma, dilatação do sistema

sarcotubular e aumento da apoptose. O tratamento com G-CSF por 8 dias após a droga aumentou a migração de células da medula óssea para o coração, diminuiu a apoptose e atenuou a cardiotoxicidade. Li et al. (2007) observaram nesse mesmo modelo, que o tratamento com G-CSF impediu parcialmente a deposição de colágeno induzida pela doxorubicina. Além disso, verificaram aumento dos G-CSFR e inibição da COX-2 através da ativação da via ERK. Coletivamente esses achados indicaram que a fibrose e a inflamação induzidas pela droga poderiam ser regulados pela COX-2, e que as ações anti-atrótica/degenerativa do G-CSF em cardiomiócitos seriam acompanhados da expressão da ERK, sendo esses os efeitos benéficos do G-CSF contra a disfunção cardíaca.

Minatoguchi et al. (2006) relacionaram a diminuição da granulação, da cicatriz e do colágeno após tratamento com G-CSF no modelo de infarto seguido de reperfusão, com a expressão aumentada de MMP. Essas enzimas atuam no processo de remodelamento cardíaco por degradarem macromoléculas que compõem a matriz intersticial, entre elas o colágeno. Li et al. (2006) observaram redução da fibrose miocárdica após o tratamento com G-CSF iniciado precoce ou tardiamente após o IM em camundongos.

Entretanto, Kanellakis et al. (2006) não perceberam alteração na quantidade de colágeno do miocárdio após tratamento com G-CSF e SCF. Já Sugano et al. (2005) e Cheng et al. (2008) observaram aumento acentuado dessa fração.

O G-CSF determinou em camundongos com cardiomiopatia chagásica diminuição da inflamação e da fibrose (Macambira et al., 2009). Usando células transplantadas de camundongos, perceberam a presença de α -miosina cardíaca, indicando que seria possível a geração de novos cardiomiócitos a partir de células-tronco endógenas ou mesmo proliferação de cardiomiócitos maduros residentes (Soares et al., 2007). Já no modelo induzido pela DOX, essa hipótese foi descartada por que não houve sinal de regeneração de cardiomiócitos, células endoteliais ou células musculares lisas (Li et al., 2007).

Em nosso estudo, observou-se que o G-CSF foi capaz de prevenir a deposição de colágeno somente na região endocárdica. Mas também foi nessa região que o ISO determinou maior aumento de área ocupada pela matriz colágena. Esses dados sugerem que nessa região a inflamação poderia ser diminuída pela mobilização celular, juntamente com efeitos anti-apoptóticos produzidos pela ativação de G-CSFR cardíacos, podendo causar uma diminuição na produção de

citocinas, e aumento na degradação de componentes da matriz extracelular pela estimulação de MMP. É possível que a atuação das MMP pelo G-CSF ocorra com mais intensidade no endocárdio e miocárdio da região lesada, porque essas enzimas são secretadas por células que migraram para região para combater a inflamação, entre elas os fibroblastos. Já o aumento da fração de colágeno na região perivascular, vista pelo ISO, está relacionada com a presença dos fatores que contribuem para deposição de colágeno, como TGF- β e receptores AT1 encontrados no endotélio, músculo liso vascular e fibroblastos. Além da maior atuação de enzimas inibidoras das MMP e baixa atuação das MMP.

A redução da deposição de colágeno com o G-CSF seria essencial para atenuar o processo de remodelamento ventricular porque a lesão provocada pelo ISO é progressiva e a deposição do colágeno é fisicamente e estruturalmente diferente ao colágeno encontrado em condições fisiológicas. Além disso, seu acúmulo não é uniforme no coração. Essas alterações de matriz, portanto, corroboram com a idéia de que o efeito benéfico do G-CSF no coração deveria mais especificamente a ações parácrinas produzidas pela mobilização celular ou ainda de efeitos diretos do G-CSF em seus receptores cardíacos.

Conclusão

.....

Conclusão

Concluimos com esse estudo que o tratamento com G-CSF por sete dias após administração de duas doses tóxicas de ISO é capaz de atenuar a dilatação ventricular esquerda dificultando o processo de remodelamento patológico que levaria à perda da eficiência da bomba cardíaca. Essa ação do G-CSF provavelmente decorre de ação protetora no início da lesão, com mobilização leucocitária e diminuição da quantidade de colágeno na região endocárdica.

Referências

.....

Referências

Avalos BR. Molecular analysis of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Blood* 1996; 88: 761-777.

____. The granulocyte colony-stimulating factor receptor and its role in disorders of granulopoiesis. *Leuk Lymphoma* 1998; 28: 265-273.

Awtry EH, Philippides GJ. Alcoholic and cocaine-associated cardiomyopathies. *Prog Cardiovasc Dis* 2010; 52: 289-299.

BALDO, Marcelo Perim - **Efeitos do Pre-Tratamento com o Fator Estimulante de Colonia de Granulocitos (G-CSF) Sobre o Desenvolvimento do Infarto do Miocardio em Ratos**. 2008. 119f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória

Baldo MP, Davel APC, Nicoletti-Carvalho JE, Bordim S, Rossoni LV, Mill JG. Granulocyte colony-stimulating factor reduces mortality by suppressing ventricular arrhythmias in acute phase of myocardial infarction in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2008; 52: 375-380.

Baldo MP, Rodrigues SL, Mill JG. Granulocyte colony-stimulating factor for ischemic heart failure: should we use it? *Heart Fail Rev* 2010; 6: 613-623.

Baldo MP, Zaniqueli D, Forechi L, Machado RC, Rodrigues SL, Mill JG. Effect of spironolactone in adult spontaneously hypertensive rats submitted to high salt intake. *Clinics* 2011; In press

Blanchard EG, Corey SJ. Filgrastim therapy: a bone of contention. *Blood* 2007; 109: 3125-3126.

Brigden W. Uncommon myocardial diseases. The non-coronary cardiomyopathies. *Lancet* 1957; 273: 1179-1184.

Idem: 1243-1249.

Brooks WW, Conrad C. Isoproterenol-Induced Myocardial Injury and diastolic dysfunction in mice: structural and functional correlates. *Comp Med* 2009; 59: 339-343.

Cheng Z, Ou Lailiang, Liu Y, Liu X, Li F, Sun B, Che Y, Kong D, Yu Y, Steinhoff G. Granulocyte colony-stimulating factor exacerbates cardiac fibrosis after myocardial infarction in a rat model of permanent occlusion. *Cardiovasc Res* 2008; 80: 425-434.

Clarke M, Bennett M, Littlewood T. Cell death in the cardiovascular system. *Heart* 2007; 93: 659-664.

Deindl E, Zaruba MM, Brunner S, Huber B, Mehl U, Assmann G, Hoefler IE, Mueller-Hoecker J, Franz W. G-CSF administration after myocardial infarction in mice attenuates late ischemic cardiomyopathy by enhanced arteriogenesis. *FASEB J* 2006; 20: 27-36.

Demetri GD, Griffin JD. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood* 1991; 78: 2791-2808.

Deten A, Volz HC, Clamors S, Leiblein S, Briest W, Marx G, Zimmer H. Hematopoietic stem cells do not repair the infarcted mouse heart. *Cardiovasc Res* 2005; 65: 52-63.

Elliott P. Diagnosis and management of dilated cardiomyopathy. *Heart* 2000; 84: 106-112.

____. The 2006 american heart association classification of cardiomyopathies is not the gold standard. *Circ Heart Fail* 2008; 1: 77-80.

Feng W, Li W. The study of ISO induced heart failure rat model. *Exp Mol Pathol* 2010; 88: 299-304.

Fletcher PJ, Pfeffer JM, Pfeffer MA, Braunwald E. Left ventricular diastolic pressure-volume relations in rats with healed myocardial infarction. Effects on systolic function. *Circ Res* 1981; 49: 618-626.

Frederico MJ, Justo SL, Da Luz G, Da Silva S, Medeiros C, Barbosa VA, Silva LA, Boeck CR, De Pinho RA, De Souza CT. Exercise training provides cardioprotection via a reduction in reactive oxygen species in rats submitted to myocardial infarction induced by isoproterenol. *Free Radic Res* 2009; 43: 957-964.

FREITAS, Rúbia Mara Pevidor de. **Influência da Castração na Mobilização de Leucócitos Induzida pelo Fator Estimulante de Colônia de Granulócitos (G-CSF) em Ratos**. 2010. 62f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória.

Goodwin JF. Cardiac function in primary myocardial disorders - parte I. *Brit Med J* 1964; 1: 1527-1533.

Idem - parte II. *Brit Med J* 1964; 1: 1595-1597.

____. Congestive cardiomyopathy. Introduction, problems and aims of the multicentre research project. *Postgrad Med J* 1978; 54: 431-432.

____, Oakley CM. The cardiomyopathies. *Br Heart J* 1972; 34: 545-552.

____. Prospects and predictions for the cardiomyopathies. *Circulation* 1974; 50: 210-219.

____. The frontiers of cardiomyopathy. *Br Heart J* 1982; 48: 1-18.

Grimm D, Elsner D, Schunkert H, Pfeifer M, Griese D, Bruckschlegel G, Muders F, Riegger GAJ, Kromer EP. Development of heart failure following isoproterenol administration in the rat: role of the rennin-angiotensin system. *Cardiovasc Res* 1998; 37: 91-100.

Harada M, Qin Y, Takano H, Minamino T, Zou Y, Toko H, Ohtsuka M, Matsuura K, Sano M, Nishi J, Iwanaga K, Akazawa H, Kunieda T, Zhu W, Hasegawa H, Kunisada K, Nagai T, Nakaya H, Yamauchi-Takahara K, Komuro I. G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. *Nat Med* 2005; 11: 305-311.

Hasegawa H, Takano H, Iwanaga K, Ohtsuka M, Qin Y, Niitsuma Y, Ueda K, Toyoda T, Tadokoro H, Komuro I. Cardioprotective effects of granulocyte colony-stimulating factor in swine with chronic myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47: 842-849.

Heather LC, Catchpole AF, Stuckey DJ, Cole MA, Carr CA, Clarke K. Isoproterenol induces in vivo functional and metabolic abnormalities; similar to those found in the infarcted rat heart. *J Physiol Pharmacol* 2009; 60: 31-39.

Hosenpud JD, Bennett LE, Keck BM, Fiol B, Novick RJ. The registry of the international society for heart and lung transplantation: fourteenth official report-1997. *J Heart Lung Transplant* 1997; 16: 691-712.

Hou XW, Son J, Wang Y, Ru YX, Lian Q, Majiti W, Amazouzi A, Zhou YL, Wang PX, Han ZC. Granulocyte colony-stimulating factor reduces cardiomyocyte apoptosis and improves cardiac function in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. *Cardiovasc Drugs Ther* 2006; 20: 85-91.

Ieishi K, Nomura M, Kawano T, Fujimoto S, Ikefuji H, Noda Y, Nishikado A, Ito S. The effect of G-CSF in a myocardial ischemia reperfusion model rat. *J Med Invest* 2007; 54:177-183.

Jefferies JL, Towbin JA. Dilated cardiomyopathy. *Lancet* 2010; 27: 752-762.

Jugdutt BI, Idikio H. Therapeutic drugs during healing after myocardial infarction modify infarct collagens and ventricular distendibility at elevated pressures. *Mol Cell Biochem* 2007; 304: 79-91.

Kanellakis P, Slater NJ, Du X, Bobik A, Curtis DJ. Granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor improve endogenous repair after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2006; 70: 117-125.

Kasper DL, Fauci AS, Longo DL, Braunwald E, Hauser SL, Jameson JL. *Harrison Medicina interna*. 16 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil Ltda, 2006. Vol1.

Katayama Y, Battista M, Kao W, Hidalgo A, Peired AJ, Thomas SA, Frenette PS. Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell* 2006; 124: 407-421.

Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 2001; 4: 430-436.

Kovacic JC, Muller DWM, Graham RM. Actions and therapeutic potential of G-CSF and GM-CSF in cardiovascular disease. *J Mol Cell Cardiol* 2007; 42: 19-33.

Krenek P, Kmecova J, Kucerova D, Bajuszova Z, Musil P, Gazova A, Ochodnický P, Klimas J, Kyselovic J. Isoproterenol-induced heart failure in the rat is associated with nitric oxide-dependent functional alterations of cardiac function. *Eur J Heart Fail* 2009; 11: 140-146.

Krishnamurthy P, Subramanian V, Singh M, Singh K. β 1 Integrins modulate β -Adrenergic Receptor-Simulated Cardiac Myocyte Apoptosis and Myocardial Remodeling. *Hypertension* 2007; 49: 865-872.

Lameris TW, Zeeuw S, Alberts G, Boomsma F, Duncker DJ, Verdouw PD, Veld AJ, Meiracker AH. Time course and mechanism of myocardial catecholamine release during transient ischemia in vivo. *Circulation* 2000; 101: 2645-2650.

Lee T, Chen C, Chang N. Granulocyte colony-stimulating factor increases sympathetic reinnervation and the arrhythmogenic response to programmed electrical stimulation after myocardial infarction in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 297: H512-522.

Lenhoff S, Rosberg B, Olofsson T. Granulocyte interactions with GM-CSF and GSF secretion by endothelial cells and monocytes. *Eur Cytokine Netw* 1999; 10: 525-532.

Li L, Takemura G, Li Y, Miyata S, Esaki M, Okada H, Kanamori H, Ogino A, Maruyama R, Nakagawa M, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H. Granulocyte colony-stimulating factor improves left ventricular function of doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Lab Invest* 2007; 87: 440-455.

Liongue C, Hall CJ, O'Connell BA, Crosier P, Ward AC. Zebrafish granulocyte colony-stimulating factor receptor signaling promotes myelopoiesis and myeloid cell migration. *Blood* 2009; 113: 2535-2546.

Li Y, Takemura G, Okada H, Miyata S, Esaki M, Maruyama R, Kanamori H, Li L, Ogino A, Misao Y, Khai NC, Mikami A, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H. Treatment with granulocyte colony-stimulating factor ameliorates chronic heart failure. *Lab Invest* 2006; 86: 32-44.

Louzada RA, Oliveira PF, Cavalcanti-de-Albuquerque JP, Cunha-Carvalho L, Baldanza MR, Kasai-Brunswick TH, Goldenberg RC, Campos-de-Carvalho AC, Werneck-de-Castro JP. Granulocyte-colony stimulating factor treatment of chronic myocardial infarction. *Cardiovasc Drugs Ther* 2010; 24: 121-130.

Luk A, Ahn E, Soor GS, Butany J. Dilated cardiomyopathy: a review. *J Clin Pathol* 2009; 62: 219-225.

Macambira SG, Vasconcelos JF, Costa CRS, Klein W, Lima RS, Guimarães P, Vidal DTA, Mendez LC, Ribeiro-dos-Santos R, Soares MBP. Granulocyte colony-stimulating factor treatment in chronic Chagas disease: preservation and improvement of cardiac structure and function. *FASEB J* 2009; 23: 3843-3850.

Mady C, Fernandes F. Cardiomyopathies. A critical vision of the classification concept. *Arq Bras Cardiol* 1997; 69: 299-300.

Maisch B, Ristic AD, Hufnagel G, Funck R, Alter P, Tontsch D, Pankuweit S. Dilated cardiomyopathies as a cause of congestive heart failure. *Herz* 2002; 27: 113-134.

Méndez-Ferrer S, Battista M, Frenette PS. Cooperation of β 2- and β 3-adrenergic receptors in hematopoietic progenitor cell mobilization. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1192: 139-144.

Metcalf D. Hematopoietic cytokines. *Blood* 2008; 111: 485-491.

Mill JG, Stefanon I, Leite CM, Vassallo DV. Changes in performance of the surviving myocardium after left ventricular infarction in rats. *Cardiovasc Res* 1990; 24: 748-753.

Minatoguchi S, Takemura G, Chen XH, Wang N, Uno Y, Koda M, Arai M, Misao Y, Lu C, Suzuki K, Goto K, Komada A, Takahashi T, Kosai K, Fujiwara T, Fujiwara H. Acceleration of the healing process and myocardial regeneration may be important as a mechanism of improvement of cardiac function and remodeling by postinfarction granulocyte colony-stimulating factor treatment. *Circulation* 2004; 109: 2572-2580.

Miyata S, Takemura G, Kawase Y, Li Y, Okada H, Maruyama R, Ushikoshi H, Esaki M, Kanamori H, Li L, Misao Y, Tezuka A, Toyo-Oka T, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H. Autophagic cardiomyocyte death in cardiomyopathic hamsters and its prevention by granulocyte colony-stimulating factor. *Am J Pathol* 2006; 168: 386-397.

Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima HO, Rubart M, Pasumarthi KB, Virag JI, Bartelmez SH, Poppa V, Bradford G, Dowell JD, Williams DA, Field LJ. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 2004; 428: 664-668.

Nagata S, Tsuchiya M, Asano S, Kaziro Y, Yamazaki T, Yamamoto O, Hirata Y, Kubota N, Oheda M, Nomura H, et al. Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor. *Nature* 1986; 319: 415-418.

Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocytes subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med* 2007; 12: 3037-3047.

Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ Res* 2004; 94: 1543-1553.

Nicola NA, Metcalf D. Binding of the differentiation-inducer, granulocyte-colony-stimulating factor, to responsive but not unresponsive leukemic cell lines. *Proc Natl Acad Sci* 1984; 81: 3765-3769.

____, ____ Matsumoto M, Johnson GR. Purification of a factor inducing differentiation in murine myelomonocytic leukemia cells: identification as granulocyte colony-stimulating factor. *J Biol Chem* 1983; 258: 9017-9023.

Nygren JM, Jovinge S, Breitbach M, Säwén P, Röhl W, Hescheler J, Taneer J, Fleischmann BK, Jacobsen SE. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med* 2004; 10: 494-501.

Oakley CM. Clinical definitions and classification of cardiomyopathies. *Postgrad Med J* 1972; 48: 703-713.

____. Profiles in cardiology. *Clin Cardiol* 1994; 17: 348-349. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/clc.4960170615/pdf>>. Acessado em: 20/10/2010.

Ohdo S, Arata N, Furukubo T, Yukawa E, Higuchi S, Nakano S, Ogawa N. Chronopharmacology of granulocyte colony-stimulating factor in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 285: 242-246.

Ohtsuka M, Takano H, Zou H, Akazawa H, Qin Y, Suzuki M, Hasegawa H, Nakaya H, Komuro I. Cytokine therapy prevents left ventricular remodeling and dysfunction after myocardial infarction through neovascularization. *FASEB J*, 2004; 18:851-853.

Okada H, Takemura G, Li Y, Ohno T, Li L, Maruyama R, Esaki M, Miyata S, Kanamori H, Ogino A, Nakagawa M, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H. Effect of a long-term treatment with a low-dose granulocyte colony-stimulating factor on post-infarction process in the heart. *J Cell Mol Med* 2008; 12: 1271-1283.

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, Mckay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410:701-705.

____, ____ , Chimenti S, Limna F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98 (18):10344-10349.

Park C, Yoo J, Jeon H, Kang B, Kim J, Jung D, Lim C, Lee J, Hahm D, Woo E, Park H. Therapeutic trial of granulocyte-colony stimulating factor for dilated cardiomyopathy in three dogs. *J Vet Med Sci* 2007; 69: 951-955.

Paredes-Gamero EJ, Leon CMMP, Borojevic R, Oshiro MEM, Ferreira AT. Changes in Intracellular Ca²⁺ Levels Induced by Cytokines and P2 Agonists Differentially Modulate Proliferation or Commitment with Macrophage Differentiation in Murine Hematopoietic Cells. *J Biol Chem* 2008; 283: 31909-31919.

Pauschinger M, Knopf D, Petschauer S, Doerner A, Poller W, Schwimmbeck PL, Kühl U, Schultheiss H. Dilated cardiomyopathy is associated with significant changes in collagen type I/III ratio. *Circulation* 1999; 99: 2750-2756.

Peng J, Gurantz D, Tran V, Cowling RT, Greenberg BH. Tumor necrosis factor- α -induced AT1 receptor upregulation enhances angiotensin II-mediated cardiac fibroblast responses that favor fibrosis. *Circ Res* 2002; 91: 1119-1126.

Prince PSM, Priscilla H, Devika PT. Gallic acid prevents lysosomal damage in isoproterenol induced cardiotoxicity in Wistar rats. *Eur J Pharmacol* 2009; 139: 139–143.

Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, Finato N, Beltrami CA, Nadal-Ginard B, Kajstura J, Annarosa L, Anversa P. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med* 2002; 346: 5-15.

Report of the WHO/ISFC task force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Br Heart J* 1980; 44: 672-673.

Ribeiro DA, Buttros JB, Oshima CTF, Bergamaschi CT, Campos RR. Ascorbic acid prevents acute myocardial infarction induced by isoproterenol in rats: role of inducible nitric oxide synthase production. *J Mol Hist* 2009; 40: 99-105.

Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyarfás I, Martin I, Nordet P. Report of the 1995 World health organization/international society and federation of cardiology task force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Circulation* 1996; 93: 841-842.

Rona G, Catecholamine cardiotoxicity. *J Moll Cell Cardiol* 1985; 17: 291-300.

_____, Boutet M, Hüttner I, Peters H. Pathogenesis of isoproterenol-induced myocardial alterations: functional and morphological correlates. *Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab* 1973; 3: 507-525.

_____, Chappel CI, Balazs T, Gaudry R. An infarct-like myocardial lesion and other toxic manifestations produced by isoproterenol in the rat. *AMA Arch Pathol* 1959; 67: 443-455.

Sampath PD, Vijayaragavan K. Ameliorative prospective of alpha-mangostin, a xanthone derivative from *Garcinia mangostana* against β -adrenergic catecholamine-induced myocardial toxicity and anomalous cardiac TNF- α and COX-2 expressions in rats. *Exp Toxicol Pathol* 2008; 60: 357–364.

Sato T, Suzuki H, Kusuyama T, Omori Y, Soda T, Tsunoda F, Shoji M, Iso Y, Koba S, Geshi E, Katagiri T, Kawachi K, Wakabayashi K, Takeyama Y. G-CSF after myocardial infarction accelerates angiogenesis and reduces fibrosis in swine. *Int J Cardiol* 2008; 127: 166-173.

Schneider A, Krüger C, Steigleder T, Weber D, Pitzer C, Laage R, Aronowski J, Maurer MH, Gassler N, Mier W, Hasselblatt M, Kollmar R, Schwab S, Sommer C, Bach A, Kuhn HG, Schäbitz WR. The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis. *J Clin Invest*. 2005. 115: 2083-2098.

Schwarzmeier JD. The role of cytokines in haematopoiesis. *Eur J Haematol Suppl* 1996; 60: 69-74.

Senthil S, Sridevi M, Pugalendi KV. Cardioprotective effect of oleanolic acid on isoproterenol-induced myocardial ischemia in rats. *Toxicol Pathol* 2007; 35: 418-423.

Singh K, Communal C, Sawyer DB, Colucci WS. Adrenergic regulation of myocardial apoptosis. *Cardiovasc Res* 2000; 45: 713-719.

____, Xiao L, Remondino A, Sawyer DB, Colucci WS. Adrenergic regulation of cardiac myocyte apoptosis. *J Cell Physiol* 2001; 189: 257-265.

Soares MB, Garcia S, Campos de Carvalho AC, Ribeiro dos Santos R. Cellular therapy in Chagas' disease: potential applications in patients with chronic cardiomyopathy. *Regen Med* 2007; 3:257-264.

Spiegel A, Shvitiel S, Kalinkovich A, Ludin A, Netzer N, Goichberg P, Azaria Y, Resnick I, Hardan I, Ben-Hur H, Nagler A, Rubinstein M, Lapidot T.

Catecholaminergic neurotransmitters regulate migration and repopulation of immature human CD34+ cells through Wnt signaling. *Nat Immunol* 2007; 10: 1123-1131.

Srinivas G, Anversa P, Frishman WH. Cytokines and myocardial regeneration. A novel treatment option for acute myocardial infarction. *Cardiol Rev* 2009; 17: 1-9.

Sugano Y, Anzai T, Yoshikawa T, Maekawa Y, Kohno T, Mahara K, Naito K, Ogawa S. Granulocyte colony-stimulating factor attenuates early ventricular expansion after experimental myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2005; 65: 446-456.

Takano H, Hasegawa, Nagai T, Komuro I. Implication of cardiac remodeling in heart failure: mechanisms and therapeutic strategies. *Intern Med* 2003; 42: 465-469.

Tatsumi K, Otani H, Sato D, Enoki C, Iwasaka T, Imamura H, Taniuchi S, Kaneko K, Adachi Y, Ikehara S. Granulocyte-colony stimulating factor increases donor mesenchymal stem cells in bone marrow and their mobilization into peripheral circulation but does not repair dystrophic heart after bone marrow transplantation. *Circ J* 2008; 72: 1351-1358.

Teerlink JR, Pfeffer JM, Pfeffer MA. Progressive ventricular remodeling in response to diffuse isoproterenol-induced myocardial necrosis in rats. *Circ Res* 1994;75:105-113.

Theml H, Diem H, Haferlach, T. *Color atlas of hematology. Practical microscopic and clinical diagnosis*. New York: Thieme; 2004.

Thiene G, Basso C, Calabrese F, Angelini A, Valente M. Twenty years of progress and beckoning frontiers in cardiovascular pathology cardiomyopathies. *Cardiovasc Pathol* 2005; 14: 165-169.

Tomita S, Ishida M, Nakatani T, Fukuhara S, Hisashi Y, Ohtsu Y, Suga M, Yutani C, Yagihara T, Yamada K, Kitamura S. Bone marrow is a source of regenerated cardiomyocytes in doxorubicin-induced cardiomyopathy and granulocyte colony-

stimulating factor enhances migration of bone marrow cells and attenuates cardiotoxicity of doxorubicin under electron microscopy. *J Heart Lung Transplant* 2004; 23: 577-584.

Towbin JA, Bowles NE. The failing heart. *Nature* 2002; 415: 227-233.

Ueda K, Takano H, Hasegawa H, Niitsuma Y, Qin Y, Ohtsuka M, Komuro I. Granulocyte Colony Stimulating Factor Directly Inhibits Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury Through Akt-Endothelial No Synthase Pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: e108-e113.

Vilas-Boas F, Feitosa GS, Soares MB, Mota A, Pinho-Filho JA, Almeida AJ, Andrade MV, Carvalho HG, Dourado-Oliveira A, Ribeiro-dos-Santos R. Early results of bone marrow cell transplantation to the myocardium of patients with heart failure due to Chagas disease. *Arq Bras Cardiol* 2006; 87: 159-166.

Weber KT, Sun Y, Tyagi SC, Cleutjens JP. Collagen network of the myocardium: function, structural remodeling and regulatory mechanisms. *J Mol Cell Cardiol* 1994; 26: 279-292.

Welte K, Platzer E, Lu L, Gabilove JL, Levi E, Mertelsmann R, Moore MAS. Purification and biochemical characterization of human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci* 1985; 82: 1526-1530.

Werneck-de-Castro JP, Costa-e-Sousa RH, Oliveira PF, Pinho-Ribeiro V, Mello DB, Peçanha R, Mattos E, Olivares EL, Maia ACV, Mill JG, Goldenberg RCS, Campos-deCarvalho AC. G-CSF does not improve systolic function in a rat model of acute myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 2006; 101:494-501.

Wexler BC, Greenberg BP. Protective effects of clofibrate on isoproterenol-induced myocardial infarction in arteriosclerotic and non-arteriosclerotic rats. *Atherosclerosis* 1978; 29: 373-395.

Wexler RK, Elton T, Pleister A, Feldman D. Cardiomyopathy: an overview. *Am Fam Physician* 2009; 79: 778-784.

Wittstein IS, Thiemann DR, Lima JAC, Baughman KL, Schulman SP, Gerstenblith G, Wu KC, Rade JJ, Bivalacqua TJ, Champion HC. Neurohumoral features of myocardial stunning due to sudden emotional stress. *N Engl J Med* 2005; 352: 539-548.

Yogeeta SK, Gnanapragasam A, Kumar SS, Subhashini R, Sathivel A, Devaki T. Synergistic interactions of Ferulic acid with Ascorbic acid: Its cardioprotective role during isoproterenol induced myocardial infarction in rats. *Mol Cell Biochem* 2006; 283: 139-146.

Zhang G, Kimura S, Nishiyama A, Shokoji T, Rahman M, Yao L, Nagai Y, Fujisawa Y, Miyatake A, Abe Y. Cardiac oxidative stress in acute and chronic isoproterenol-infused rats. *Cardiovasc Res* 2005; 65: 230– 238.