



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ



Curso de pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e
Medicina Investigativa

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO
DO TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS DERIVADAS DE TECIDO
ADIPOSO NA CARDIOPATIA CHAGÁSICA
CRÔNICA EXPERIMENTAL

TICIANA XAVIER FERREIRA

Salvador – Brasil

2011

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

**Curso de pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e
Medicina Investigativa**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO
DO TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS DERIVADAS DO TECIDO
ADIPOSO NA CARDIOPATIA CHAGÁSICA
CRÔNICA EXPERIMENTAL**

TICIANA XAVIER FERREIRA

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Ribeiro dos Santos

Co-orientadora: Profa. Dra. Milena Botelho Pereira Soares

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – Fiocruz, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa.

Salvador – Brasil

2011

Eu gostaria de dedicar este trabalho
à minha filha Catarina, dádiva de Deus, razão pela
qual acordo todas as manhãs disposta a sorrir e a
abraçar o mundo;
aos meus pais, Cristina e Luiz Antônio, por todo o
incentivo e por acreditarem que eu conseguiria;
aos meus irmãos, Ricardo, Daniel, Luísa e Pedro,
fontes de inspiração, alegria e amor incondicional;
a Leonardo, meu porto seguro, companheiro de
todas as horas;
e, sobretudo, aos pacientes portadores de doença de
Chagas, pelos quais continuarei estudando e
pesquisando cada vez mais.

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, à minha pequena Catarina, que pacientemente abriu mão de muitas horas ao lado de sua mãe, para que ela pudesse dedicar-se a esta pós-graduação.

À Dra. Márcia Noya, que me mostrou a importância do desenvolvimento da carreira científico-acadêmica e me incentivou desde o princípio.

À Dra. Simone Garcia, por toda a sua disponibilidade em ajudar em todos os momentos, me ensinando que só se faz ciência quando se tem persistência e quando se aprende a superar as dificuldades.

À Dra. Milena Botelho Pereira Soares, meu grande exemplo de pesquisadora, por sempre ter sido tão solícita e por ter me acolhido como sua co-orientanda no laboratório.

À Dr. Ricardo Ribeiro dos Santos, meu orientador, por seu vasto conhecimento, por ter-me dado a oportunidade de vivenciar um pouco de sua experiência científica e, sobretudo, pelo grande amigo que veio a ser.

Aos amigos do laboratório, principalmente Cristina Aragão, Bruno Solano, Carine Azevedo, Carla Kaneto, Daniele Freitas, Daniela Nascimento, Sissi Furtado, Murilo Fagundes, Alice Kiperstok, Alberto Barbosa Neto, Alcemir Júnior, Adriano Alcântara, Lucas Mendez e Daniel Vidal, pelo acolhimento carinhoso e, principalmente, pela paciência em ensinar uma médica clínica a trabalhar com modelos experimentais.

Aos professores do curso de pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, aqui representados por Luiz Alcântara, Edson Duarte, Maria Fernanda Grassi, Luciano Kalabric, Maria da Conceição de Almeida e Marilda Gonçalves, por terem partilhado comigo seus conhecimentos, enriquecendo muito a minha caminhada.

Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz, motivo de orgulho para a população baiana, pela seriedade do seu trabalho e pelo seu compromisso com a saúde coletiva.

Por fim, aos meus camundongos, que me ajudaram com extrema resignação, principalmente nas fases iniciais, me ensinando muito sobre a cardiopatia chagásica crônica.

Ensinamentos de mãe:

“Devemos viver conforme a lei dos três ‘erres’:

Respeito pelos outros, Reverência pela vida e

Reflexão sobre si mesmo”.

Cristina Xavier Ferreira

FERREIRA, Ticiania Xavier. Avaliação do potencial terapêutico do transplante de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo na cardiopatia chagásica crônica experimental. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2011.

RESUMO

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, é uma das mais importantes causas de insuficiência cardíaca na América. A terapia celular vem sendo investigada como uma possível opção terapêutica para pacientes com doenças cardiovasculares. Neste estudo foram avaliados os efeitos da terapia com células-tronco mesenquimais em um modelo experimental de cardiomiopatia chagásica crônica. Camundongos C57BL/6 foram infectados com 1000 tripomastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi* e, após seis meses de infecção, foram tratados com células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo humano (CTTAs) ou com meio DMEM (controle). Antes e após 1 e 2 meses de tratamento, os animais chagásicos e controles normais foram submetidos à avaliação cardíaca, incluindo eletrocardiograma, ecocardiograma e teste ergoespirométrico. O grupo tratado recebeu duas injeções intraperitoneais de CTTAs (1×10^6 células / dose), com um mês de intervalo entre as duas doses. Todos os animais foram sacrificados sob anestesia após 2 meses de tratamento, para análise histopatológica do coração. Não foi observada melhora de arritmias e da função cardiovascular no grupo tratado com CTTAs, porém secções de corações de camundongos deste grupo apresentaram uma redução significativa do número de células inflamatórias ($p < 0,0001$) e da área de fibrose ($p < 0,01$) em comparação com animais chagásicos tratados com DMEM. A dosagem de 22 citocinas séricas dois meses após o tratamento mostrou um aumento da maioria destas citocinas em animais chagásicos crônicos quando comparados aos controles não-infectados, sendo algumas destas moduladas após a terapia celular. Deste modo, conclui-se que as CTTAs foram capazes de reduzir inflamação e fibrose no coração de camundongos cronicamente infectados por *T. cruzi*, porém não teve efeitos na função cardíaca dois meses após o transplante.

PALAVRAS-CHAVE: cardiomiopatia chagásica, terapia celular, células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo.

FERREIRA, Ticiana Xavier. Evaluation of the therapeutic potential of adipose-derived mesenchymal stem cells transplantation in experimental chronic chagasic cardiomyopathy. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2011.

ABSTRACT

Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, is one of the most important causes of heart failure in America. Cell therapy has been investigated as a possible therapeutic option for patients with cardiovascular diseases. This study evaluated the effects of therapy with mesenchymal stem cells in an experimental model of chronic Chagas cardiomyopathy. C57BL/6 mice were infected with 1000 trypomastigotes of the Colombian strain of *T. cruzi* and, after six months of infection, were treated with mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue (ADSCs) or DMEM (control). Before and after 1 and 2 months of treatment, chagasic mice and normal controls underwent cardiac evaluation including electrocardiogram, echocardiography and cardiopulmonary exercise test. The treated group received two intraperitoneal injections of ADSCs (1×10^6 cells / dose), with one month interval. All animals were sacrificed under anesthesia after two months of treatment for histopathology analysis of the heart. No improvement was observed for arrhythmias and cardiovascular function in mice treated with ADSCs, but sections of hearts in this group had a significantly reduced number of inflammatory cells ($p < 0.0001$) and area of fibrosis ($p < 0.01$), compared to animals treated with DMEM. The measurement of 22 serum cytokines two months after treatment showed an increase of most of these cytokines in chronic chagasic animals when compared to uninfected controls, and some of which modulated after cell therapy. Thus, we conclude that the ADSCs were able to reduce inflammation and fibrosis in the hearts of mice chronically infected with *T. cruzi*, but had no effect on cardiac function two months after transplantation.

KEYWORDS: chagasic cardiomyopathy, cell therapy, adipose-derived mesenchymal cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fig. 1.	Ciclo evolutivo do <i>T. cruzi</i>	16
Fig. 2.	Origem das células-tronco.....	25
Fig. 3.	Possíveis mecanismos de imunomodulação induzida pelas CTMs.....	28
Fig. 4.	Possíveis mecanismos de ação das células-tronco transplantadas em cardiomiopatia chagásica crônica.	30
Fig. 5.	Desenho do estudo.....	39
Fig. 6.	Caracterização celular por microscopia confocal.....	44
Fig. 7.	Avaliação da sobrevida em animais não infectados e chagásicos crônicos tratados com meio (DMEM) ou com células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTTAs) nas diferentes fases do tratamento.	46
Fig. 8.	Avaliação dos intervalos eletrocardiográficos em animais não infectados e chagásicos crônicos.	47
Fig. 9.	Avaliação de frequência cardíaca em animais não infectados e chagásicos crônicos	47
Fig. 10.	Traçados eletrocardiográficos.....	49
Fig. 11.	Avaliação de arritmias entre animais não-infectados e chagásicos crônicos.....	50
Fig. 12.	Avaliação dos dados ergométricos em animais não-infectados e chagásicos crônicos (6 meses pós-infecção).	51
Fig. 13.	Avaliação dos dados ergoespirométricos em animais não-infectados e chagásicos crônicos.	52
Fig. 14.	Avaliação dos parâmetros ecocardiográficos em animais não-infectados e chagásicos crônicos.	53
Fig. 15.	Avaliação dos intervalos eletrocardiográficos em animais chagásicos crônicos tratados com meio (DMEM) ou com CTTAs nas diferentes fases do tratamento.	54
Fig. 16.	Avaliação de frequência cardíaca em animais chagásicos crônicos tratados com meio (DMEM) ou com células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTTAs) nas diferentes fases do tratamento.	55
Fig. 17.	Traçados eletrocardiográficos de animais chagásicos crônicos	57
Fig. 18.	Avaliação de arritmias em animais chagásicos crônicos tratados com meio (DMEM) ou com CTTAs nas diferentes fases do tratamento.	58
Fig. 19.	Avaliação dos dados ergométricos em animais chagásicos crônicos tratados com meio (DMEM) ou com CTTAs nas diferentes fases do tratamento.	59
Fig. 20.	Avaliação de VO ₂ e VCO ₂ em animais chagásicos crônicos tratados com meio (DMEM) ou com CTTAs nas diferentes fases do tratamento.	60

Fig. 21. Avaliação de gasto energético e quociente respiratório em animais chagásicos 61 crônicos tratados com meio (DMEM) ou com CTTAs nas diferentes fases do tratamento.	61
Fig. 22. Avaliação dos parâmetros ecocardiográficos em animais chagásicos crônicos 62 tratados com meio (DMEM) ou com CTTAs nas diferentes fases do tratamento.	62
Fig. 23. Histologia de secções de corações de camundongos sacrificados dois meses após a 64 terapia celular.	64
Fig. 24. Avaliação morfométrica de secções de corações de animais não-infectados e 65 chagásicos tratados com meio (DMEM) ou com CTTAs.	65
Fig. 25. Avaliação morfométrica de secções de músculo esquelético de animais chagásicos 66 tratados com meio (DMEM) ou com células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTTAs).	66
Fig. 26. Histologia de secções de músculo esquelético de camundongos sacrificados dois 67 meses após a terapia celular.	67
Fig. 27. Concentrações séricas de IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-9 e IL-10 69	69
Fig. 28. Concentrações séricas de IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-17, G-CSF, GM-CSF, 70 IFN γ e TNF α .	70
Fig. 29. Concentrações séricas de KC, MCP1, MIP1 α , MIP1 β , RANTES e Eotaxina 71	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAV	Bloqueio átrio-ventricular
BPM	Batimentos por minuto
CBTC	Centro de Biotecnologia e Terapia Celular
CCC	Cardiomiopatia chagásica crônica
CMO	Células de medula óssea
CTM	Células-tronco mesenquimais
CTTA	Célula-tronco derivada de tecido adiposo
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole
DC	Débito cardíaco
DDFVE	Diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DSFVE	Diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo
ECG	Eletrocardiograma
FE	Fração de ejeção
G-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócito (Granulocyte Colony Stimulating Factor)
GE	Gasto energético
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócito macrófago (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor)
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos (Hepatocyte growth factor)
IC	Insuficiência cardíaca
IFN-γ	Interferon- γ
IGF	Fator de crescimento semelhante a insulina (Insulin-like growth factor)
IL	Interleucina
KC	Quimiocina derivada de queratinócitos (keratinocyte chemoattractant)
MCP-1	Proteína quimiotática monocítica-1 (monocyte chemotactic protein-1)
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade (Major Histocompatibility Complex)
MIP	Proteína inflamatória macrófágica (macrophage inflammatory protein)
NIH	National Institutes of Health
NK	Natural Killer
NYHA	Associação do coração de Nova York (New York Heart Association)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Salina tamponada com fosfato (Phosphate Buffer Saline)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction)

PGE₂	Prostaglandina E ₂
QR	Quociente respiratório
QTc	Intervalo QT corrigido
RANTES	Regulated upon activation normal T-cell expressed, and presumably secreted
SEM	Erro padrão da média (Standard Error of the Mean)
TGF-β	Fator de crescimento transformador-β (transforming growth factor-β)
TMO	Transplante de medula óssea
TNF-α	Fator de necrose tumoral-α (Tumor Necrosis Factor-α)
VCO₂	Produção de dióxido de carbono
VD	Ventrículo direito
VE	Ventrículo esquerdo
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial (Vascular endothelial growth factor)
VO₂	Consumo de oxigênio

SUMÁRIO

1. Introdução	15
1.1. A doença de Chagas	15
1.1.1. Aspectos gerais	15
1.1.2. Transmissão	16
1.1.3. Fase aguda	18
1.1.4. Fase crônica	19
1.2. Células-tronco	24
1.2.1. Aspectos gerais	24
1.2.2. Células-tronco mesenquimais	26
1.3. Terapia celular em doenças cardiovasculares	29
2. Justificativa	34
3. Hipótese	35
4. Objetivos	36
4. 1. Objetivo geral	36
4.2. Objetivos específicos	36
5. Materiais e métodos	37
5.1. Animais	37
5.2. Infecção de camundongos por <i>Trypanosoma cruzi</i>	37
5.3. Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo	37
5.4. Caracterização celular através de microscopia confocal	38
5.5. Tratamento dos animais chagásicos crônicos	39
5.6. Avaliação eletrocardiográfica	39
5.7. Avaliação funcional por ergometria	40
5.8. Avaliação funcional por ecocardiograma transtorácico	41
5.9. Avaliações histológica e morfométrica	41
5.10. Avaliação dos níveis séricos de citocinas	42
5.11. Análise estatística	42

6. Resultados	43
6.1. Caracterização celular por microscopia confocal	43
6.2. Caracterização do modelo de cardiomiopatia chagásica crônica	45
6.2.1. Mortalidade	45
6.2.2. Resultados eletrocardiográficos	46
6.2.3. Avaliações ergométricas	50
6.2.4. Avaliações ecocardiográficas	52
6.3. Avaliação dos efeitos da terapia celular	53
6.3.1. Avaliações de função cardíaca	54
6.3.1.1. Resultados eletrocardiográficos	54
6.3.1.2. Resultados da avaliação funcional ergoespirométrica	58
6.3.1.3. Resultados ecocardiográficos	61
6.3.2. Avaliações histológicas e morfométricas	62
6.3.3. Avaliação da produção de citocinas	68
7. Discussão	72
8. Conclusão	77
9. Referências bibliográficas	78

1. INTRODUÇÃO

1.1. A doença de Chagas

1.1.1. Aspectos gerais

A doença de Chagas (tripanossomíase americana) é desencadeada após a infecção pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, parasito pertencente à classe Kinetoplastidae, ordem Trypanosomatida, e família Trypanosomatidae. O nome do agente etiológico foi escolhido pelo seu primeiro observador, o médico brasileiro Carlos Chagas, em 1909, em homenagem ao epidemiologista Oswaldo Cruz.

A despeito de sua preferência por células musculares esqueléticas e cardíacas, o *T. cruzi* é capaz de infectar diferentes tipos celulares, inclusive células hepáticas e esplênicas (BRENER *et al.*, 2000; COURA *et al.*, 2009). Caracteriza-se por um grande polimorfismo genético, o que contribui para que a doença de Chagas tenha um amplo espectro de apresentações clínicas (BUSCAGLIA, *et al.*, 2003; MACEDO *et al.*, 2004).

Apesar da intensificação dos esforços para o controle da infecção nos últimos anos, pela Iniciativa do Cone Sul desde 1991 (DIAS *et al.*, 2002), ela ainda representa um grave problema de saúde pública. A doença afeta de 16 a 18 milhões de pessoas na América Latina (RASSI *et al.*, 2010), sendo que, no Brasil, o número de infectados pode chegar a 5 milhões. Estima-se que, nos países endêmicos, cerca de 20.000 pacientes morram a cada ano, por complicações associadas à cardiomiopatia chagásica crônica (SALVATELLA, 2006), para a qual ainda não existe uma terapêutica suficientemente eficaz (URBINA, 2003).

A prevenção está voltada primariamente ao combate ao vetor (DIAS *et al.*, 2002), principal fonte de transmissão da doença. As medidas preventivas incluem a melhoria das moradias rurais e das condições de higiene, o afastamento dos animais das casas e a limpeza frequente das palhas e roupas, locais que poderiam alojar o inseto. Além disso, os programas de prevenção vêm intensificando o controle sorológico de forma mais efetiva nos bancos de sangue, cujo mecanismo de transmissão é responsável por 5 a 20% dos casos, contribuindo

para uma redução significativa dos novos casos da doença de Chagas (NOBRE e SERRANO, 2005).

1.1.2. Transmissão

Em cerca de 80 a 90% dos casos de doença de Chagas, a transmissão ocorre através de um inseto hematófago vetor, o triatomíneo, conhecido popularmente como “barbeiro”. Atualmente são conhecidos 17 gêneros e 130 espécies de triatomíneos, sendo que os gêneros mais importantes para a transmissão da doença são o *Triatoma*, o *Panstrongylus* e o *Rhodnius* (CARCANVALLO *et al.*, 2001).

A doença é adquirida através das fezes contaminadas com formas tripomastigotas, que são depositadas próximo ao local da picada do inseto no momento do seu repasto sanguíneo. Quando o inseto hematófago alimenta-se do sangue de um hospedeiro infectado, ele ingere as formas tripomastigotas do *T. cruzi*, que se transformam em epimastigotas no trato digestivo do vetor. Após três a quatro semanas, estas formas multiplicam-se e transformam-se em tripomastigotas metacíclicos, que são as formas infectantes eliminadas juntamente com as fezes do inseto no momento em que ele pica o hospedeiro.

No ser humano, os tripomastigotas invadem diferentes tipos celulares, onde se transformam em amastigotas. Ocorre então a multiplicação destas formas no citoplasma, e subsequente transformação em tripomastigotas, após o que elas destroem as células e passam a circular na corrente sanguínea. A partir deste ponto, as formas tripomastigotas podem invadir outras células do hospedeiro ou ser novamente ingeridas pelo triatomíneo hematófago (BRENER, 1971). O ciclo evolutivo encontra-se resumido na figura 1.

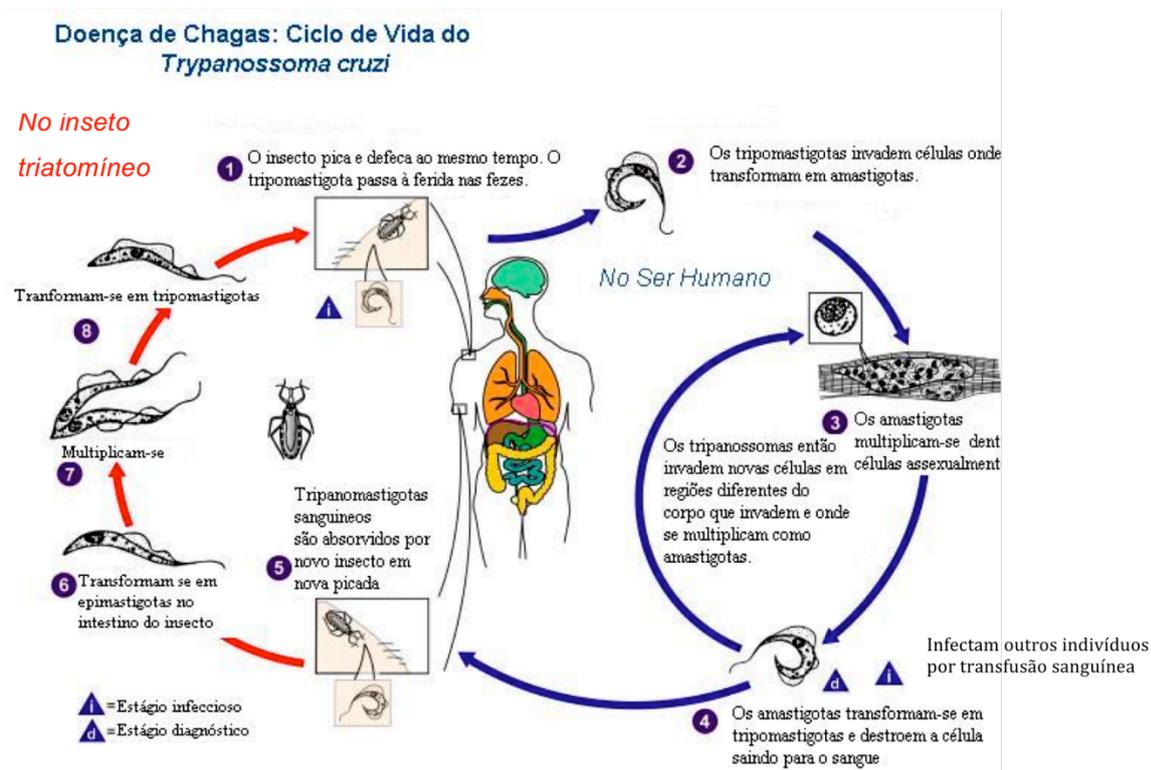


Figura 1: Ciclo evolutivo do *T. cruzi*.

Fonte: Adaptado de http://pt.wikipedia.org/wiki/Trypanosoma_cruzi

(Adaptado de: www.dpd.cdc.gov/dpdx)

As demais formas de transmissão são mais raras, a saber: a forma laboratorial, devido à manipulação inadequada de material contaminado; o transplante de órgãos infectados, principalmente coração e rins; a forma transplacentária; e a forma oral, por aleitamento materno ou, em relatos isolados, por ingestão de alimentos contaminados pelo parasito, reportada em regiões não endêmicas do Brasil (cana de açúcar e açaí). Existem relatos de casos agudos da doença em áreas ditas livres do protozoário, demonstrando alta patogenicidade, inclusive com insuficiência cardíaca (IC) aguda (BRITO, 2008).

Em 2005, foi detectado um surto relacionado ao consumo de caldo de cana no Estado de Santa Catarina, com 24 pessoas infectadas, sendo que três foram a óbito. No ano de 2006, houve a confirmação de 115 casos de doença de Chagas aguda, nas regiões norte e nordeste, sendo 94 casos de transmissão por via oral, devido ao consumo, na maioria dos casos, de açaí

contaminado. Registrou-se nesse período também surto pela ingestão de cana-de-açúcar (BRITO, 2008).

Em 2007, a Secretaria de Vigilância em Saúde divulgou quatro Notas Técnicas relatando casos de surtos ocorridos na região amazônica. Foram notificados 100 casos de doença de Chagas aguda, com quatro óbitos, relacionados a surtos ocorridos em 11 municípios da região norte do país, sendo o alimento mais frequentemente envolvido o açaí (BRITO, 2008).

O período de incubação da doença de Chagas varia de acordo com a via de transmissão: de 5 a 15 dias, na vetorial; de 30 a 40 dias, na transfusional; do quarto ao nono mês de gestação, na transplacentária; e cerca de 7 a 22 dias, na via oral. A infecção divide-se temporalmente em fases aguda e crônica, separadas por um período onde a infecção recebe a classificação de forma indeterminada, de comportamento ainda não bem esclarecido, podendo o paciente permanecer assintomático durante toda a vida (IANNI e MADY, 1997).

1.1.3. Fase aguda

A fase aguda inicia-se após o período de incubação e se perpetua até o fim da parasitemia detectável. Caracteriza-se principalmente pela presença de formas tripomastigotas do parasito no sangue periférico e formas amastigotas multiplicando-se no interior das células do hospedeiro. Durante este período, ocorre um importante crescimento populacional do parasito e um intenso parasitismo no coração, em torno do 12^o dia após a contaminação (MELO *et al.*, 2003; FABRINO *et al.*, 2004).

Na fase aguda, citocinas associadas à resposta Th1, tais como a IL-2, o IFN- γ e o TNF- α , são estimuladoras das atividades microbidas dos macrófagos e, conseqüentemente, estão relacionadas ao controle da parasitemia (SILVA *et al.*, 1995). O dano patológico ao miocárdio na fase aguda parece estar associado à presença do parasito e à resposta imune desenvolvida (revisto por TANOWITZ *et al.*, 1992). Nesta fase foram também descritas alterações em componentes do sistema β -adrenérgico cardíaco de transdução de sinais, que incluem a redução da concentração plasmática de catecolaminas, a diminuição de afinidade do agonista pelo receptor β -adrenérgico cardíaco e a elevação dos níveis de AMPc na célula cardíaca (BUSTAMANTE *et al.*, 2003; LO PRESTI, 2006).

Clinicamente, esta fase está associada a um conjunto de sinais e sintomas de intensidade e quantidade variáveis, podendo existir chagoma de inoculação (sinal de Romaña), hepatoesplenomegalia, linfadenopatias e sinais inespecíficos, principalmente febre. A miocardite difusa é a principal manifestação cardíaca, podendo estar associada a pericardite ou endocardite. Ao eletrocardiograma, pode ser observada taquicardia sinusal, complexos QRS de baixa voltagem e/ou alterações da repolarização ventricular (BRENER *et al.*, 2000).

Em humanos, a fase aguda habitualmente regride de forma espontânea após aproximadamente 12 meses, com a redução do percentual de parasitos no sangue e nos tecidos (KOBBERLE, 1968; MARIN-NETO *et al.*, 1999). Observa-se, em menos de 5% dos pacientes, morte súbita, devido à falência cardíaca associada à miocardite, ou meningoencefalite (ZACKS *et al.*, 2005).

1.1.4. Fase crônica

- **Prevalência da doença em indivíduos infectados**

Hoje sabe-se que, 10 anos após a infecção, aproximadamente 80% dos pacientes permanecem com a forma indeterminada da infecção, caracterizada pela ausência de manifestações clínicas, eletrocardiográficas ou radiológicas de comprometimento cardíaco ou digestivo. Cerca de 50% da população infectada jamais desenvolve sinais e sintomas clinicamente relevantes associados a esta infecção. Os motivos pelos quais este fenômeno acontece ainda não estão completamente esclarecidos (MARIN-NETO *et al.*, 1998 e 1999).

Aproximadamente 30% dos pacientes evoluem com cardiomiopatia chagásica crônica (CCC), caracterizada predominantemente por infiltrados inflamatórios focais e disseminados, miocitólise, mionecrose e fibrose progressiva, alterações descritas desde a década de 1950 (ANDRADE *et al.*, 1955 e 1963; KOBBERLE *et al.*, 1968).

- **Patogênese**

Na forma indeterminada, foi observado que a regulação da função cardíaca pela noradrenalina também está comprometida, e, provavelmente, associada a modificações no

sistema adrenérgico. Além disso, a cepa do parasito, fatores genéticos do hospedeiro e reinfecções nas fases aguda e indeterminada podem agravar o comprometimento cardíaco (BUSTAMANTE *et al.*, 2002, 2003 e 2007). Segundo Gironès e Fresno (2003), a cronicidade da lesão ao miocárdio decorre da ativação da resposta imune contra os antígenos parasitários. Na realidade, o mimetismo molecular entre os antígenos do hospedeiro e do parasito resultaria em resposta das células T e B efectoras contra antígenos cardíacos, levando à lesão do miocárdio. Essa agressão crônica ao coração culmina em dano progressivo às fibras miocárdicas e conseqüente formação de cicatriz fibrótica.

Diferentes fatores na fase aguda e na forma indeterminada da doença de Chagas podem contribuir para o desenvolvimento da forma cardíaca crônica, na qual existe um baixo parasitismo tecidual. Em alguns trabalhos não foi demonstrada uma correlação entre a presença de parasitos ou de seus antígenos, na forma aguda, e o grau de inflamação no tecido cardíaco de pacientes com CCC (JONES *et al.*, 1993; BARBOSA JR & ANDRADE, 1984), à despeito da utilização de técnicas tão sensíveis quanto PCR e imunistoquímica (OLIVAREZ-VILLAGOMEZ *et al.*, 1998; PALOMINO *et al.*, 2000).

Entretanto, alguns autores demonstraram a importância direta da continuidade do parasito no desenvolvimento da CCC, a partir da observação de que reinfecções e exposição contínua ao agente etiológico provocam uma piora da doença em modelos experimentais e estudos clínicos (HIGUCHI *et al.*, 2003; KIERSZENBAUM, 2005). Além disso, foi demonstrado que os tratamentos que reduzem a carga parasitária acarretam também amenização dos sinais da doença (GARCIA *et al.*, 2005).

Diante do intenso processo inflamatório no músculo cardíaco, associado à persistência ou não de parasitos tanto na circulação quanto no miocárdio, fatores como a auto-imunidade contra antígenos cardíacos, a doença arterial coronariana e a destruição do gânglio do sistema nervoso autônomo têm sido associados à CCC (SOARES *et al.*, 2001; ENGMAN *et al.*, 2002; KIERSZENBAUM, 2005).

Um estudo publicado em 2002 demonstrou que a indução de um reforço da tolerância imunológica contra antígenos cardíacos em camundongos posteriormente infectados com cepa Colombiana de *T. cruzi* levou a uma miocardite crônica menos intensa do que a observada nos animais apenas infectados, reforçando o papel de respostas autoreativas na patogênese da CCC (PONTES-DE-CARVALHO *et al.*, 2002).

- **Manifestações clínicas da cardiomiopatia chagásica crônica**

Os sinais e sintomas característicos desta forma da doença podem ser divididos em três grupos de síndromes: insuficiência cardíaca, arritmias cardíacas e eventos tromboembólicos (RASSI JR *et al.*, 2009). A insuficiência cardíaca, geralmente biventricular, manifesta-se por dispnéia progressiva aos esforços físicos evoluindo para dispnéia em repouso, ortopnéia, dispnéia paroxística noturna, edema de membros inferiores, congestão hepática e estase de jugulares (MARIN-NETO *et al.*, 1999).

O paciente com CCC pode apresentar ainda palpitações e síncope, decorrentes de arritmias graves, incluindo taquiarritmias ventriculares, bradicardia e bloqueio atrioventricular, por destruição das fibras do sistema de condução pelo processo inflamatório. Nestes casos, o paciente pode evoluir com morte súbita, caso não seja implantado um marcapasso ou, eventualmente, um cardiodesfibrilador (GIRONES *et al.*, 2003; GASCÓN *et al.*, 2007).

Os eventos tromboembólicos arteriais originam-se das próprias câmaras cardíacas, pelo turbilhonamento e acúmulo de sangue em áreas com alterações da contratilidade, acinesia ou aneurisma, levando não apenas a acidentes vasculares cerebrais, mas também à isquemia de outros leitos arteriais, como, por exemplo, a isquemia mesentérica e a de membros inferiores (ROSENBAUM *et al.*, 1964; OLIVEIRA *et al.*, 1981). O tromboembolismo pulmonar, complicação freqüente e grave da CCC, geralmente decorre de trombose venosa profunda, ocasionada por redução crônica do débito cardíaco (MARIN-NETO *et al.*, 1999; RASSI JR *et al.*, 2009).

- **Diagnóstico da CCC**

O diagnóstico da cardiomiopatia chagásica baseia-se em dados clínicos e epidemiológicos, demonstração direta de anticorpos contra antígenos do *T. cruzi* (na fase aguda) ou testes sorológicos (imunofluorescência indireta, hemaglutinação indireta, fixação do complemento e teste imunoenzimático). Fazem parte da avaliação inicial o eletrocardiograma de 12 derivações, cujos achados mais sugestivos incluem bloqueio atrioventricular, bloqueio completo do ramo direito e bloqueio divisional ântero-superior do

ramo esquerdo (ROSENBAUM *et al.*, 1955; MOIA *et al.*, 1960), e a radiografia de tórax, que pode evidenciar um aumento de área cardíaca e congestão venocapilar pulmonar (GASCÓN *et al.*, 2007).

O ecocardiograma transtorácico vem sendo utilizado de forma sistemática na avaliação da função ventricular de pacientes portadores de cardiomiopatia chagásica. Trata-se de um exame complementar que utiliza ultrassom para gerar imagens em tempo real do coração e dos vasos da base. A ausência de efeitos colaterais, o relativo baixo custo e a facilidade de manuseio tornaram o ecocardiograma um excelente instrumento propedêutico, com informações fundamentais sobre o diagnóstico, a função miocárdica, o status hemodinâmico e a gravidade da patologia estudada, auxiliando na condução clínico-terapêutica (SILVA *et al.*, 2003).

O teste ergoespirométrico vem ganhando cada vez mais espaço na avaliação de pacientes portadores de CCC, principalmente para a avaliação funcional, e demonstra a redução da capacidade funcional máxima, além de propensão ao desenvolvimento de arritmias ventriculares esforço-induzidas (MADY *et al.*, 2005).

- **Tratamento da CCC**

O tratamento atual da síndrome de insuficiência cardíaca (IC) está direcionado à interferência sobre os mecanismos neurohormonais que a perpetuam e agravam ao longo do tempo. Além de cuidados relacionados aos hábitos de vida, especialmente dietéticos, vários medicamentos têm a propriedade de interferir favoravelmente no curso natural da doença e aumentar a longevidade de seus portadores. Inibidores da enzima conversora da angiotensina, bloqueadores dos receptores da angiotensina, bloqueadores da aldosterona e β -bloqueadores proporcionaram novas perspectivas de vida a estes pacientes (NOBRE e SERRANO, 2005).

A terapia específica disponível para a doença de Chagas consiste no uso de compostos nitroheterocíclicos (nitrofurano e nifurtimox) ou de derivado de nitroimidazol (benzonidazol), medicamentos com atividade anti-*T. cruzi*, eficazes na erradicação do parasito na fase aguda da doença (MARIN-NETO *et al.*, 1999). No entanto, sua eficácia na eliminação do parasito na fase crônica é bastante discutida (CANÇADO, 1999; CALDAS *et al.*, 2008), apesar de ensaios experimentais recentes apontarem para um efeito benéfico do uso do benzonidazol na

fase crônica, ao reduzir os distúrbios cardíacos característicos da CCC (GARCIA *et al.*, 2005).

Em 2004 foi iniciado o BENEFIT, um ensaio clínico multicêntrico, randomizado, duplo-cego, placebo-controlado, em andamento, com previsão de inclusão de cerca de 3.000 pacientes. Este estudo tem o objetivo de avaliar se a terapia antitripanocida com benzonidazol proporciona redução de eventos cardiovasculares maiores e morte em pacientes portadores de cardiomiopatia chagásica (MARIN-NETO *et al.*, 2008).

Na CCC, casos refratários à terapêutica clínica podem se beneficiar de procedimentos intervencionistas não-farmacológicos. Neste sentido, o transplante cardíaco ortotópico, procedimento complexo e de alto custo, é considerado o padrão-ouro de tratamento. Embora se saiba que a sobrevida do paciente após transplante cardíaco em portadores de cardiomiopatia chagásica seja mais longa do que em pacientes com insuficiência cardíaca por outras etiologias (BOCCHI e FIORELLI, 2001), em portadores de CCC há o agravante de que o uso de imunossupressores pós-transplante pode reativar a infecção devido ao parasitismo tecidual persistente. Além do mais, ainda hoje esta técnica cirúrgica beneficia um pequeno número de indivíduos, por sua dependência de doadores compatíveis, resultando em um número de transplantes bem menor que do que a demanda.

Outros procedimentos, tais como a cardiomioplastia e a ventriculectomia, não demonstraram eficácia sustentada, em longo prazo, pois não modificaram ou até aumentaram as taxas de mortalidade (BESTETTI *et al.*, 1997; BRAILE *et al.*, 2000).

Por estes motivos, é de fundamental importância o estudo de novas alternativas terapêuticas para os pacientes portadores de cardiomiopatia chagásica crônica, levando em consideração a sua alta prevalência, com elevada morbi-mortalidade, e o grande impacto sócio-econômico causado por esta doença.

Linhagens de camundongos (*Mus musculus*) vêm sendo utilizadas para a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da doença de Chagas, bem como para avaliar a eficácia de novas intervenções terapêuticas (POSTAN *et al.*, 1983). Estudos realizados em diferentes linhagens de camundongos mostram a presença de lesões inflamatórias e degenerativas no coração do hospedeiro, sendo esse comprometimento muito semelhante ao existente em humanos (ANDRADE *et al.*, 1990).

Camundongos são também muito utilizados como modelo de CCC por estes terem uma rápida evolução da doença, pela sua reprodução em larga escala, baixo custo e fácil manuseio.

1.2. Células-tronco

1.2.1. Aspectos gerais

As células-tronco são células não especializadas, cujas características principais são a propriedade de auto-renovação e a capacidade de diferenciação em células especializadas. Os dois tipos principais de células-tronco são as células embrionárias, derivadas das células da camada interna dos blastocistos, e as células-tronco adultas, que podem ser isoladas dos tecidos pós-natais. As células-tronco adultas podem ser encontradas em diversos órgãos e tecidos, incluindo coração, cérebro, rins, baço e medula óssea (revisto por SALEM e THIEMERMANN, 2010).

Quanto à sua origem, as células-tronco podem ser classificadas como totipotentes, pluripotentes ou multipotentes (Fig. 2). As células totipotentes e pluripotentes são capazes de formar todos os tipos celulares do organismo adulto, sendo que as totipotentes podem também originar células de tecidos extraembrionários e placenta. As células multipotentes podem formar todos os tipos celulares diferenciados de um determinado tecido (revisto por WATT e DRISKELL, 2010).

Nos últimos anos, tem surgido como uma nova possibilidade terapêutica a utilização das células-tronco pluripotentes induzidas. Demonstrou-se que a transdução, mediada por retrovírus, de fibroblastos de camundongos com fatores de transcrição altamente expressos em células-tronco embrionárias podem transformar estes fibroblastos em células pluripotentes (TAKAHASHI *et al.*, 2006 e 2007). Atualmente já se sabe que células de uma grande variedade de tecidos podem ser reprogramadas, e novas tecnologias estão sendo desenvolvidas para aumentar a eficácia e a segurança deste procedimento, inclusive visando eliminar a necessidade da utilização de vetores retrovirais no processo de reprogramação (revisto por WATT e DRISKELL, 2010).

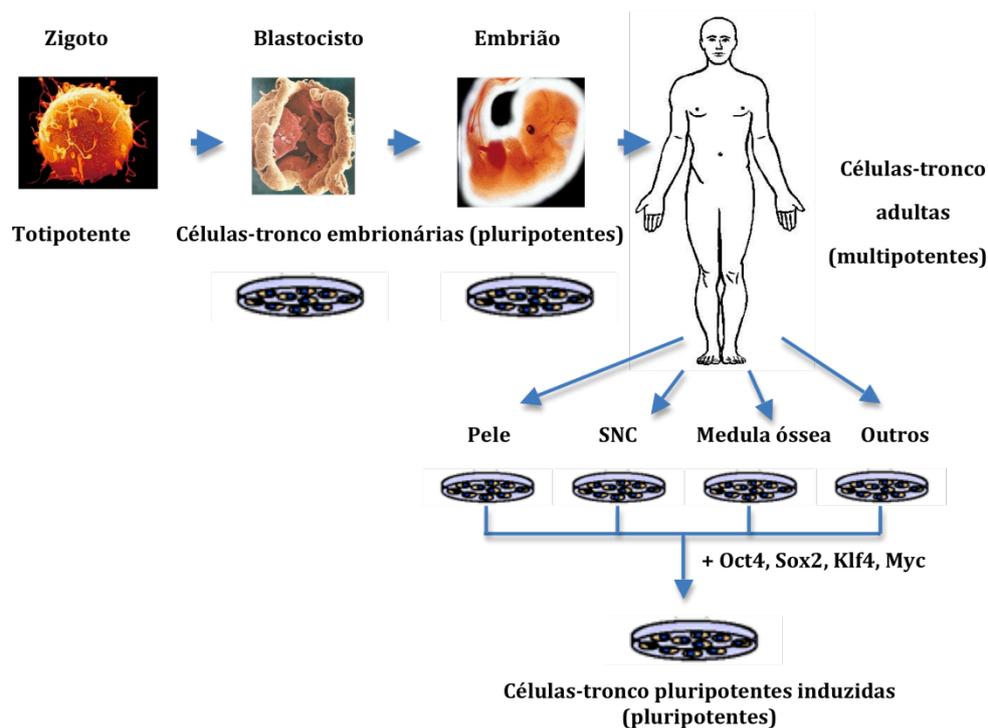


Figura 2: Origem das células-tronco. Adaptado de Watt e Driskell, 2010.

Foram propostos inicialmente dois mecanismos de atuação das células-tronco, através dos quais estas teriam efeito direto na regeneração do tecido lesado - a fusão e a transdiferenciação celular (ORLIC *et al.*, 2001; ALVAREZ-DOLANO *et al.*, 2003). Nos últimos anos, vem sendo muito estudado o mecanismo de ação das células-tronco através da produção e a secreção de uma série de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e de proliferação celular, com importante influência na modulação da angiogênese, da inflamação e da fibrose, da morte celular e da regeneração tecidual, denominado de efeito parácrino (KINNAIRD *et al.*, 2004; GNECCHI *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2009).

Ainda existem muitos aspectos que precisam ser esclarecidos no que concerne ao comportamento das células-tronco. No entanto, já está bem estabelecido que estas células podem diferenciar-se em tipos celulares distintos na dependência do nicho ou microambiente onde estas se encontrem (WATT *et al.*, 2000). Os microambientes ou nichos, determinantes fundamentais do comportamento e da dinâmica das células em geral, são locais no tecido ou no órgão onde há a interação célula-célula ou entre a célula e a matriz extracelular, e também onde são secretados citocinas, fatores de crescimento e de proliferação, dentre outros (WATT

et al., 2000; KIROUAC *et al.*, 2009). Considerando como exemplo as células-tronco hematopoiéticas, pode ser citada a interação entre o receptor de tirosina quinase c-Kit e o seu ligante, o fator de célula-tronco, que regula a proliferação, a adesão, a migração, a diferenciação e a ativação funcional destas células (SHARMA *et al.*, 2006).

As células-tronco caracterizam-se pela expressão ou não de alguns marcadores de superfície, como, por exemplo, CD105, CD90, c-Kit, que possibilitam a identificação, o isolamento e a purificação dessas populações celulares (POULSOM *et al.*, 2002; GUO *et al.*, 2003). Várias sub-populações de células podem expressar diferentes marcadores, que podem torná-las mais adequadas para a utilização como terapia em doenças distintas, como as células AC133⁺ e CD34⁻, conhecidas pelo seu alto potencial indutor de angiogênese (STAMM *et al.*, 2003).

Entre as células-tronco da medula óssea, as mais estudadas até o momento, podem ser encontradas não apenas células-tronco hematopoiéticas, mas também as CTMs ou estromais, em proporção muito menor, descritas mais recentemente como sendo as células-tronco progenitoras de tecidos esqueléticos (BIANCO *et al.*, 2001; HAM *et al.*, 2006).

1.2.2. Células-tronco mesenquimais

As células-tronco mesenquimais (CTMs), encontradas no estroma de vários órgãos, incluindo a medula óssea, vêm sendo intensamente estudadas quanto às suas características e ao seu potencial terapêutico em diversos modelos experimentais. A facilidade com que podem ser obtidas e expandidas *in vitro* faz com que sejam excelentes candidatas à utilização em terapia celular.

Para a uniformização do conceito de células mesenquimais estromais, a *International Society for Cellular Therapy* propôs em 2006 a utilização de critérios mínimos, sendo eles: a capacidade de aderir ao plástico quando mantidas em condições de cultura padrão; a capacidade de expressar CD105, CD73 e CD90, já reconhecidos como marcadores de células mesenquimais, com ausência de expressão de CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19 e moléculas de superfície HLA-DR; e a capacidade de diferenciação *in vitro* em osteoblastos, adipócitos e condrócitos (DOMINICI *et al.*, 2006).

Já foi proposto que as CTMs possam ter a capacidade de diferenciação *in vitro* em diversos tipos celulares, tais como neurônios (KOPEN *et al.*, 1999), hepatócitos (LEE *et al.*,

2004; SATO *et al.*, 2005), cardiomiócitos (MAKINO *et al.*, 1999), células do músculo liso (GALMICHE *et al.*, 1993), abrangendo células diferenciadas características dos três folhetos germinativos (PITTENGER *et al.*, 1999; BIANCO *et al.*, 2001).

Os efeitos benéficos da terapia com CTMs, através do seu potencial regenerativo, já foram demonstrados em diversos estudos clínicos e experimentais, como, por exemplo, em doenças dos tecidos ósseo e cartilaginoso (revisto por LARSEN *et al.*, 2010), insuficiência renal (revisto por CHOI *et al.*, 2010), doenças cardiovasculares (revisto por BOYLE *et al.*, 2010), hepáticas (revisto por SOUZA *et al.*, 2009), e pulmonares (revisto por HACKETT *et al.*, 2010), dentre outras.

Além do potencial regenerativo, foi identificada ainda a atividade imunossupressora das CTMs (UCCELLI *et al.*, 2007), o que tem despertado grande interesse na comunidade científica. Diversos estudos evidenciaram que as CTMs são capazes de modular a função dos linfócitos T, fundamentais para o desenvolvimento da resposta imune adaptativa. Sabe-se hoje que habitualmente as CTMs não expressam MHC classe II (revisto por SALEM e THIEMERMANN, 2010), porém estes antígenos, presentes no interior das CTMs, podem ser expressos na superfície das células após indução com interferon-gama (LE BLANC *et al.*, 2003). Tal propriedade ganha importância à medida em que ocorre uma acentuada elevação desta citocina em muitas doenças caracterizadas pela presença de inflamação.

As CTMs também não expressam as moléculas co-estimulatórias clássicas de linfócitos T, tais como CD80, CD86 e CD40, o que pode contribuir para a anergia e a imunotolerância (revisto por SALEM e THIEMERMANN, 2010). As propriedades imunomoduladoras das CTMs podem ser resumidas na figura 3.

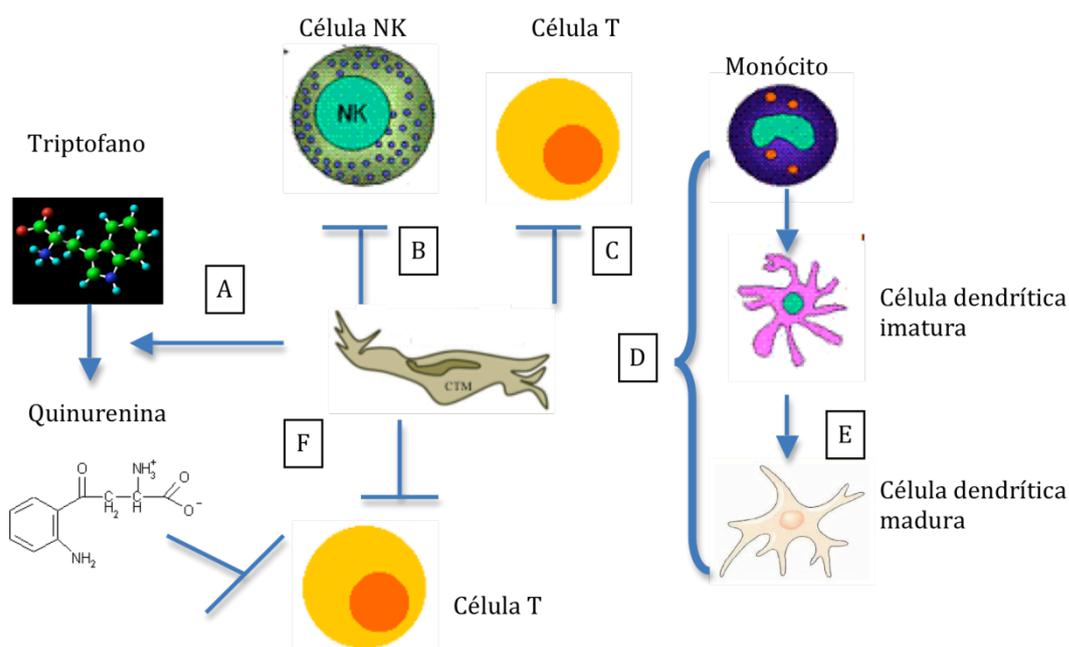


Figura 3: Possíveis mecanismos de imunomodulação induzida pelas CTMs.

A: Indolamina 2,3-dioxigenase catalisa a conversão do triptofano, via inibitória para a proliferação de células T.

B: Contato direto célula-célula inibe a proliferação celular.

C: Contato direto célula-célula através de moléculas de adesão e integrinas e ausência de moléculas co-estimulatórias modulam a atividade das células T e levam à anergia.

D: CTMs inibem a secreção pelas células dendríticas de TNF- α , IFN- γ e IL-12.

E: Inibição da maturação de células dendríticas pelas CTMs.

F: Liberação de fatores solúveis pelas CTMs inibe a proliferação de células T: TGF- β , IGF, VEGF, HGF, óxido nítrico, IL-10, PGE₂.

Adaptado de: Salem e Thiernemann, 2010.

As CTMs de medula óssea já têm sido testadas em seres humanos, em ensaios clínicos para diferentes doenças, nos quais foi demonstrada a segurança da sua utilização (KATRITSIS *et al.*, 2005; VILQUIN & ROSSET, 2006; CHEN *et al.*, 2006). Em doenças cardiovasculares, estão em andamento alguns estudos clínicos utilizando as CTMs para o tratamento de: infarto do miocárdio, através de injeção transendocárdica; insuficiência cardíaca, testando diferentes doses de CTMs alogênicas também por via transendocárdica; insuficiência cardíaca congestiva, através de injeção intramiocárdica; e disfunção ventricular esquerda em pacientes submetidos à cirurgia cardíaca - estudo PROMETHEUS (revisto por SALEM e THIEMERMANN, 2010).

O tecido adiposo tem sido descrito como sendo uma fonte alternativa de células-tronco com grande potencial terapêutico e com baixo risco para a sua obtenção. Quando comparado à medula óssea, o tecido adiposo tem a capacidade de fornecer um maior número

de células-tronco, reduzindo substancialmente o tempo de expansão em cultura (ZUK *et al.*, 2001). A população de células-tronco derivadas de tecido adiposo humano após digestão por colagenase (fração estromal-vascular) pode se diferenciar em múltiplas linhagens celulares, incluindo cardiomiócitos (MADONNA *et al.*, 2008; VAN DIJIK *et al.*, 2008).

Sabe-se hoje que as células estromais derivadas de tecido adiposo (CTTAs) constituem uma população de células aderentes ao plástico que inclui células vasculares (pericitos e células progenitoras endoteliais), células progenitoras de adipócitos (pré-adipócitos) e CTMs multipotentes adultas (GIMBLE *et al.*, 2007).

Vários autores têm descrito a caracterização funcional e molecular das CTTAs, bem como os seus mecanismos de diferenciação, potenciais efeitos e resultados obtidos até o momento no que tange a reparo tecidual, principalmente cardiovascular (SCHÄFFLER *et al.*, 2007; MADONNA *et al.*, 2009; MADONNA *et al.*, 2010).

1.3. Terapia celular em doenças cardiovasculares

Diversas pesquisas sobre o potencial terapêutico do transplante de células-tronco têm sido realizadas nos últimos anos, sobretudo na área das doenças cardiovasculares. Dentre os tecidos onde as células-tronco podem ser encontrados, a medula óssea, o tecido adiposo, a polpa do dente decíduo, o cordão umbilical e a placenta têm se destacado como as fontes mais comumente utilizadas nos estudos experimentais (revisto por SOARES *et al.*, 2009).

Em 1995, Soonpaa e colaboradores demonstraram que células exógenas podem se integrar ao miocárdio hospedeiro (SOONPAA *et al.*, 1995). Há mais de 10 anos tem sido demonstrado um papel importante das células de medula óssea na formação de cardiomiócitos, na angiogênese e na melhora funcional em animais com modelo de infarto do miocárdio (ASAHARA *et al.*, 1999; TOMITA *et al.*, 1999). A partir dos anos 2000, outros estudos em modelo experimental de doença arterial coronariana confirmaram que o transplante de células-tronco da medula óssea era capaz de causar a melhora funcional de corações infartados (JACKSON *et al.*, 2001; KOCHER *et al.*, 2001; ORLIC *et al.*, 2001 e 2002).

Os mecanismos de ação destas células no coração também vêm sendo extensamente estudados (Fig. 4), sendo que a regeneração cardíaca por células derivadas da medula óssea tem sido questionada (MURRY *et al.*, 2004; NYGREN *et al.*, 2004; BALSAM *et al.*, 2004).

Cada vez mais vem sendo considerado um possível efeito parácrino das células derivadas de medula óssea no coração, para explicar os efeitos benéficos da terapia celular observados (MANGI *et al.*, 2003; GNECCHI *et al.*, 2005).

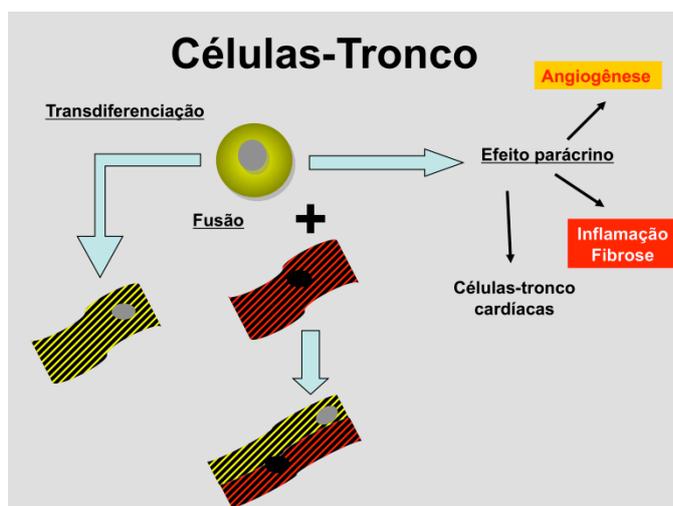


Figura 4: Possíveis mecanismos de ação das células-tronco transplantadas em cardiomiopatia chagásica crônica. Adaptado de Soares *et al.*, 2009.

A injeção de células-tronco mononucleares autólogas de medula óssea também já vem sendo testada em humanos há vários anos, com resultados promissores. O transplante intracoronariano destas células demonstrou ser capaz de promover a regeneração miocárdica após infarto, com melhora da função cardíaca (STRAUER *et al.*, 2002). A injeção deste mesmo tipo de células nas bordas da lesão miocárdica em seis pacientes infartados também propiciou a melhora da função ventricular (STAMM *et al.*, 2003). Em 14 pacientes com doença arterial coronariana crônica e quadro grave de disfunção ventricular, o transplante autólogo das células mononucleares de medula óssea levou a uma melhora importante tanto na função ventricular quanto na qualidade de vida (PERIN *et al.*, 2003).

Mais recentemente, vem sendo testadas as células-tronco derivadas de tecido adiposo como possível fonte alternativa de reparo tecidual cardíaco. Em modelo de infarto agudo do miocárdio em coelhos, foi demonstrado que as CTTAs autólogas transplantadas para o tecido cicatricial miocárdico diferenciaram-se em cardiomiócitos após cinco semanas, reduziram o

tamanho da cicatriz transmural, induziram a angiogênese e melhoraram a função cardíaca, avaliada através da fração de ejeção ventricular esquerda (ZHANG *et al.*, 2007).

Em ratos Sprague-Dawley, também em modelo de infarto agudo do miocárdio, com ligadura permanente da artéria coronária descendente anterior, a terapêutica com 1×10^6 CTTAs humanas por injeção local levou a uma significativa melhora da função ventricular esquerda, redução do remodelamento cardíaco e aumento da neovascularização (HWANGBO *et al.*, 2010).

Limitações importantes ao alcance de uma melhora funcional cardíaca desejada com a terapia celular na doença cardíaca isquêmica são a baixa retenção e a pequena sobrevivência destas células nos tecidos isquêmicos. Para tentar aumentar a eficácia desta terapêutica, foi desenvolvido um estudo utilizando a combinação de CTTAs com um arcabouço de fibrina em modelo de infarto agudo do miocárdio em ratos, sendo a co-injeção realizada na parede ventricular esquerda. Após quatro semanas, o grupo de animais que recebeu a combinação CTTA + fibrina apresentou maior retenção celular local e melhora importante da função cardíaca quando comparado ao grupo que recebeu apenas CTTA (ZHANG *et al.*, 2010).

Além da doença arterial coronariana, muitos estudos vem sendo desenvolvidos com outros modelos de cardiomiopatia, como na doença de Chagas. Foi demonstrado anteriormente que o transplante de células da medula óssea singênicas causa a melhora da miocardite chagásica em camundongos cronicamente infectados por *T. cruzi* (SOARES *et al.*, 2004), tendo como possível mecanismo de ação a indução de apoptose das células mononucleares do infiltrado inflamatório, com redução da inflamação e do percentual de fibrose.

Posteriormente, Goldenberg e colaboradores (2008) demonstraram, através de ressonância nuclear magnética, que a injeção de 10^7 células mononucleares de medula óssea foi capaz de prevenir e reverter a dilatação ventricular direita em animais com cardiomiopatia dilatada por *T. cruzi*.

Guarita-Souza e colaboradores (2006) publicaram um estudo com modelo experimental de cardiomiopatia dilatada chagásica, utilizando ratos Wistar, no qual foi testado o co-transplante autólogo de células mesenquimais e mioblastos esqueléticos, através de injeção local, na parede ventricular. Os resultados evidenciaram melhora da fração de ejeção e redução dos volumes diastólico e sistólico finais do ventrículo esquerdo, avaliados por ecocardiograma transtorácico. Demonstrou-se, ainda neste trabalho, que as células foram

capazes de migrar para outras áreas de lesão no miocárdio, o que confere grande vantagem no tratamento de patologias que acometem múltiplos pontos no órgão em questão, como a doença de Chagas.

Também já foi demonstrado o efeito do fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), que mobiliza as células da medula para o sangue periférico. A terapêutica com G-CSF em camundongos com cardiomiopatia chagásica crônica mostrou-se eficaz em reduzir o processo inflamatório e a fibrose, melhorar os distúrbios de condução do estímulo elétrico no coração e propiciar melhora funcional nos parâmetros avaliados através da ergoespirometria – tempo de exercício, distância percorrida, taxa de troca respiratória, produção de gás carbônico e consumo de oxigênio (MACAMBIRA *et al.*, 2009).

Com base nos resultados dos estudos experimentais, foram realizados estudos clínicos nos quais foi feita a injeção de células mononucleares autólogas de medula óssea, em pacientes portadores de cardiomiopatia chagásica crônica, com disfunção ventricular. O ensaio clínico de fase I incluiu no total 28 pacientes, avaliando os efeitos do transplante autólogo de células de medula óssea, via intracoronária, em pacientes com insuficiência cardíaca de etiologia chagásica. Também foram administradas injeções de G-CSF, com o objetivo de promover a mobilização das células da medula óssea para o sangue periférico. O primeiro paciente transplantado apresentou melhora não apenas dos parâmetros ecocardiográficos (aumento de fração de ejeção e redução dos diâmetros sistólico e diastólico finais de ventrículo esquerdo), mas também da qualidade de vida, avaliada pelo escore de Minnesota, e da classe funcional (New York Heart Association). Não foram relatados eventos adversos (VILAS-BOAS *et al.*, 2004). Os 28 pacientes tiveram melhora da fração de ejeção, discreta, porém com significância estatística, com melhora também da classe funcional (NYHA), do escore de qualidade de vida de Minnesota e da distância percorrida no teste de caminhada de seis minutos. Estes resultados foram observados após dois meses do tratamento (VILAS-BOAS *et al.*, 2006), tendo se mantido após seis meses (VILAS-BOAS *et al.*, comunicação pessoal). Deste modo, concluiu-se que a terapia com células mononucleares de medula óssea via intracoronária é segura e exequível em indivíduos portadores de cardiomiopatia chagásica crônica. Este trabalho não foi desenhado para que se pudesse chegar a conclusões quanto à eficácia, porém abriu as portas para a realização de novos ensaios.

Foi iniciado, então, um estudo de fase III, vinculado ao Ministério da Saúde, denominado Miheart Study (Multicenter randomized trial of cell therapy in cardiopathies), com o objetivo de avaliar o efeito da injeção de células mononucleares de medula óssea em quatro doenças cardíacas: cardiomiopatia dilatada, cardiomiopatia chagásica, doença arterial coronariana crônica e infarto agudo do miocárdio. Os ensaios clínicos são independentes, multicêntricos, randomizados, duplo-cegos e controlados por placebo, com a proposta inicial de incluir 300 pacientes por ensaio (TURA *et al.*, 2007). Os resultados do MiHeart Study, em cardiomiopatia chagásica, não mostraram diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados ou não com células mononucleares de medula óssea, no que tange à avaliação de função ventricular e aos dados de classe funcional e qualidade de vida (resultados ainda não publicados).

Diante de todos os resultados encontrados até o momento, muito se questiona sobre a terapia celular mais apropriada para a abordagem de pacientes portadores de doença de Chagas. É necessário definir qual a melhor célula a ser utilizada, qual a via de administração ideal, qual deve ser a posologia em termos de quantidade de células e número de doses, enfim, qual protocolo deve ser instituído para alcançar melhores resultados terapêuticos (SOARES *et al.*, 2007; SOARES E DOS SANTOS, 2009; CAMPOS DE CARVALHO *et al.*, 2009).

Caracterizando-se a cardiomiopatia chagásica pela presença de miocardite intensa, é possível que a modulação da resposta auto-agressora pelo transplante celular possa contribuir para a diminuição da lesão cardíaca. Pelo já citado potencial imunossupressor das CTMs, é possível que estas apresentem um potencial terapêutico na cardiopatia chagásica. Neste trabalho foram investigados os efeitos do transplante de CTMs no modelo de cardiomiopatia chagásica crônica experimental, com a finalidade de subsidiar o desenvolvimento de protocolos terapêuticos mais eficazes para o tratamento desta doença.

2. JUSTIFICATIVA

A cardiomiopatia chagásica crônica é uma doença endêmica e debilitante, que leva a uma perda estimada de cerca de 750 mil anos de vida produtiva anualmente, por morte prematura, nos países da América Latina (SCHOFIELD e DIAS, 1991). Estima-se que mais de 60 milhões de pessoas estejam sob risco de transmissão da doença de Chagas em cerca de 18 países endêmicos (WHO, 2002).

Apesar da grande evolução para o tratamento da insuficiência cardíaca nos últimos 20 anos, ainda não foi demonstrada uma estratégia terapêutica suficientemente eficaz para os pacientes portadores de cardiopatia chagásica crônica.

Para o desenvolvimento de novas terapias que possam ser utilizadas em pacientes, é fundamental o auxílio da pesquisa em modelos experimentais, utilizando modelos animais que reproduzam condições semelhantes às observadas em seres humanos. Para a doença de Chagas, especificamente, já tem sido muito estudado o modelo de infecção pela cepa Colombiana de *T. cruzi* em camundongos (SOARES *et al.*, 2001).

O surgimento de um protocolo terapêutico eficaz capaz de alcançar uma melhora importante na capacidade funcional dos portadores de cardiomiopatia chagásica crônica, bem como na qualidade de vida e na função ventricular, poderá contribuir para uma menor morbimortalidade e uma menor taxa de hospitalizações por insuficiência cardíaca.

3. HIPÓTESE

O presente estudo testou a hipótese de que a terapia com células-tronco mesenquimais humanas derivadas de tecido adiposo é capaz de reduzir inflamação e fibrose e melhorar a função cardiovascular em um modelo experimental de cardiomiopatia chagásica crônica em camundongos.

4. OBJETIVO

4.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial terapêutico do transplante com células-tronco mesenquimais humanas derivadas de tecido adiposo em um modelo experimental de cardiomiopatia chagásica crônica induzida pela infecção com a cepa Colombiana de *T. cruzi* em camundongos C57BL/6.

4.2. Objetivos específicos

- Avaliar a função cardiovascular de camundongos chagásicos crônicos transplantados ou não com CTTAs;
- Avaliar o grau de inflamação através da contagem de células inflamatórias e o percentual de fibrose em corações de camundongos chagásicos crônicos transplantados ou não com CTTAs;
- Avaliar o perfil de citocinas e quimiocinas em camundongos chagásicos crônicos transplantados ou não com CTTAs.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Animais

Trinta camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 foram mantidos no biotério do CBTC (Centro de Biotecnologia e Terapia Celular) com água e comida *ad libitum*, sob condições ideais de temperatura e luminosidade. Todo o protocolo foi acompanhado por veterinário do biotério do CBTC, e as manipulações foram feitas de acordo com as normas de manipulação de animais do National Institutes of Health (NIH).

5.2. Infecção de camundongos por *T. cruzi*

Vinte camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 com 6 a 8 semanas de idade foram inoculados por via intraperitoneal com 1000 tripomastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi* (FEDERICI *et al.*, 1964), obtidos do sobrenadante de cultura de células da linhagem LCC-MK2 infectadas.

A avaliação da infecção aguda foi feita através da parasitemia periódica. Os níveis parasitêmicos dos camundongos infectados foram acompanhados a partir do 15º dia pós-infecção pela contagem em microscópio óptico dos parasitos presentes em 50 campos (magnitude de 400x) em uma lâmina contendo 5 µl de sangue periférico obtido da cauda do animal e coberto com uma lamínula 24 x 24 mm (MELO *et al.*, 1978).

5.3. Células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo

A linhagem de células-tronco do tecido adiposo (CTTA) humanas foi obtida a partir de material de descarte de lipoaspiração. Foram colhidos 40 a 50 mL de material proveniente de tecido adiposo, e a amostra foi processada imediatamente após ter sido coletada. Após incubação com colagenase (Blendzyme1, Roche), a preparação foi centrifugada, e as células foram cultivadas em meio DMEM acrescido de L-glutamina (2 mM/L), gentamicina (50 µg/mL), HEPES (10 mM) e 2 g/L de bicarbonato de sódio, enriquecido com 10% de soro fetal

bovino, sendo mantidas em estufa a 37°C a 5% de CO₂. As CTTAs foram isoladas de outras células mononucleares por sua capacidade de aderência ao plástico e de expansão.

O cultivo celular foi monitorado sob microscopia de contraste de fase, e o meio trocado três vezes por semana até que a confluência celular atingisse 80 a 100%, quando as células foram colhidas por tripsinização e novamente plaqueadas (1ª passagem) até que atingissem a quarta passagem, quando as células foram tripsinizadas e coletadas para a infusão nos camundongos.

As CTTAs foram avaliadas previamente quanto à expressão de marcadores de superfície por citometria de fluxo, potencial de diferenciação osteogênica e adipogênica e estabilidade cromossômica, comprovando as suas características de células mesenquimais (NOGUEIRA, 2009).

5.4. Caracterização celular através de microscopia confocal

As células foram cultivadas em placas de 24 poços, fixadas em paraformaldeído 4% (Eletron Microscopy Science) por 30 minutos e lavadas com PBS (Phosphate Buffered Saline). Em seguida foram bloqueadas as ligações inespecíficas com PBS/BSA 5% durante 30 minutos, e adicionados os seguintes anticorpos primários: mouse anti-CD44 (1:50, Zymed), mouse anti-CD90 (1:50, BD Bioscience), mouse anti-CD73 (1:50, BD Bioscience), mouse anti-CD34 (1:50, Zymed), mouse anti-CD45 (1:50, Biosource), mouse anti-CD105 (1:50, BD Bioscience), rabbit anti-CD117 (1:50, Abcam), rabbit anti-CD133 (1:150, Abcam), rabbit anti-miosina esquelética (1:200, Sigma), rabbit anti-GFAP (1:100, Neomarkers) e rabbit anti-citoqueratina 18 (1:50, Santa Cruz Biotechnology).

Os anticorpos foram incubados “overnight” a 4°C. Após o período de incubação, as células foram lavadas com PBS e incubadas com os anticorpos secundários: goat anti-mouse IgG conjugado com Alexa Fluor 568 (Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) ou goat anti-rabbit IgG conjugado com Alexa Fluor 546 (Molecular Probes), ambos diluídos 1:200. Juntamente com os anticorpos secundários adicionou-se faloidina conjugada com Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, 1:50) para visualização do citoesqueleto. Após 1 hora de incubação em temperatura ambiente, os anticorpos secundários foram lavados com PBS e as lamínulas montadas com Vectashield (Vector Labs, Burlingame, CA, USA) contendo DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) para marcação dos núcleos. Os resultados foram analisados

em microscópio confocal FluoView 1000 (Olympus, Tokyo, Japão), e as marcações positivas foram fotografadas.

5.5. Tratamento dos animais chagásicos crônicos

Cada camundongo fêmea C57BL/6 na fase crônica da infecção por *T. cruzi* foi transplantado com 1×10^6 CTTAs derivadas de tecido adiposo humano, por via intraperitoneal. O transplante foi repetido após trinta dias.

O grupo controle de animais infectados foi tratado com meio DMEM, também por via intraperitoneal (Figura 5).

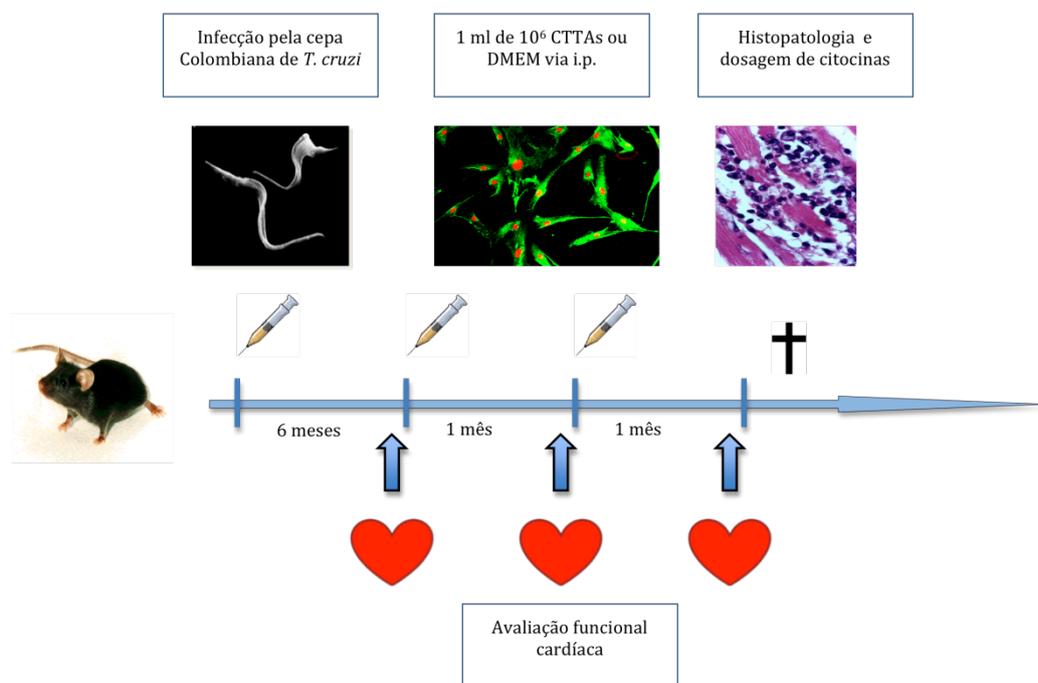


Figura 5: Desenho do estudo.

5.6. Avaliação eletrocardiográfica

Após a indução de anestesia utilizando o sistema de isoflurano (0,5 a 2%), foi iniciada a aquisição dos registros eletrocardiográficos. Os registros de eletrocardiogramas foram adquiridos usando um equipamento Bio Amp PowerLab System (PowerLab 2/20;

ADInstruments, Castle Hill, Australia), que permite o registro de sinais biológicos em animais com total isolamento elétrico. Os dados foram adquiridos e armazenados em computador, analisados no programa Chart 5 for Windows (Power Lab; ADInstruments, Castle Hill, Australia).

As análises de ECG incluíram as medidas de frequência cardíaca, dos intervalos PR e QT corrigido e a avaliação quanto à presença de distúrbios de condução e arritmias.

Como os ECGs de roedores não apresentam a onda T separada do complexo QRS (BESTETTI *et al.*, 1990), o intervalo QTc foi mensurado no lugar da duração do complexo de QRS. O intervalo de QT foi medido utilizando como referência o início do complexo QRS e o final da onda T. Para encontrar o QTc, utilizou-se a medida do QT dividida pela raiz quadrada do intervalo RR. Para minimizar interferências, foi utilizado filtro de 0,1 a 1 Hz.

5.7. Avaliação funcional por ergometria

Para os estudos de ergometria, foi utilizado o equipamento LE 8700 – CO (Panlab, Barcelona, Espanha), com fluxo de ar na câmara controlado por um trocador de gases (LE 400, Panlab). A amostra de gases foi levada por um circuito fechado ao analisador de gases (OXYLET 00, Panlab), sendo os dados enviados ao computador através de um amplificador contendo uma placa analógico-digital (ML 820, PowerLAB, ADInstruments, Austrália). Os dados foram armazenados em computador para análise no programa Chart 5 for Windows – Metabolism for PowerLab System.

Os animais foram colocados na esteira 20 minutos antes de iniciar o exercício. A velocidade inicial foi de 12 cm/s, com incrementos na velocidade de 6 cm/s a cada 5 minutos. O primeiro estágio foi estabelecido com a velocidade inicial de 12 cm/s. Após 5 minutos, o animal passava para o segundo estágio, com velocidade de 18 cm/s, e assim sucessivamente. Os testes foram realizados até os animais entrarem em exaustão, permanecendo por 5 segundos ou mais na área de choque. Para minimizar interferências, foi utilizado filtro de 0,1 a 1 Hz.

Os parâmetros avaliados foram tempo de exercício, distância percorrida, velocidade final, estágio máximo alcançado, consumo de oxigênio, produção de dióxido de carbono, quociente respiratório e gasto energético.

5.8. Avaliação funcional por ecocardiograma transtorácico

Para aquisição das imagens, foi utilizado equipamento desenhado para pequenos roedores, o Vevo da Visual Sonics (Toronto, Canadá), que dispõe de transdutor de 30 Mhz e propicia elevado detalhamento da anatomia cardíaca. Os exames foram gravados no disco rígido do próprio equipamento.

Para a realização do estudo ecocardiográfico, os animais foram anestesiados com isofluorano (0,5 a 2%) por via inalatória, sendo controlada a concentração do anestésico ofertado pela frequência cardíaca, que deveria manter-se acima de 350 bpm (STYPMANN *et al.*, 2007). Apesar de o anestésico deprimir a frequência cardíaca, a relação frequência cardíaca/fração de encurtamento mantém-se constante (ROTTMAN *et al.*, 2007), tendo os dados sido corrigidos pela frequência cardíaca. Anestesiado, o animal foi colocado em decúbito dorsal em mesa móvel, facilitando a aquisição da imagem nas diferentes janelas acústicas, e aquecida a 37° C, com o intuito de evitar hipotermia. A avaliação ecocardiográfica transtorácica foi realizada utilizando como ferramentas os modos unidimensional (modo-M) e bidimensional, e o doppler pulsado.

A função sistólica do ventrículo esquerdo (VE) foi avaliada utilizando as janelas paraesternal longitudinal, paraesternal transversal e paraesternal direita, sendo a medida de fração de ejeção calculada pelo método de Simpson. O diâmetro ventricular foi mensurado em cinco ciclos cardíacos seguidos.

5.9. Avaliações histológica e morfométrica

Após eutanásia dos animais, os corações e fragmentos de músculo esquelético foram removidos e fixados em formalina 4%, para processamento histológico. Secções dos corações e dos músculos dos animais foram coradas por hematoxilina e eosina e analisadas por microscopia de campo claro, para a contagem de células inflamatórias, ou por tricrômio de Masson, para avaliação do percentual de fibrose.

As quantificações foram realizadas em quatro cortes de 5 micrômetros de coração inteiro, com 20 a 30 micrômetros entre cada corte, depois de escaneamento utilizando o sistema Aperio ScanScope (Aperio Technologies, Vista, CA). As imagens foram analisadas com o programa Image Pro Plus (versão 7.0, Media Cybernetics, San Diego, CA).

5.10. Avaliação dos níveis séricos de citocinas

O perfil de citocinas produzido nos diferentes grupos experimentais foi analisado em amostras de soro dos animais, usando o kit Bio-Plex de citocinas para camundongos (Bio-Rad), de acordo com as instruções do fabricante.

Foram analisadas as seguintes citocinas: IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-17, Eotaxina, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , KC, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, RANTES e TNF- α .

As amostras de soro, diluídas 1:4, assim como as citocinas recombinantes, foram incubadas com microesferas fluorescentes ligadas a anticorpos, e depois com o anticorpo de detecção conjugado com biotina, seguido de incubação com estreptavidina-ficoeritrina. As microesferas foram contadas no Sistema Bio-Plex 200 (Bio-Rad), sendo os dados analisados com auxílio do software Bio-Plex Manager.

5.11. Análise estatística

Os dados obtidos foram avaliados considerando distribuição paramétrica, com o auxílio dos programas Graphpad Prism 5 (2007) e BioCalc. Para as comparações de intervalo PR, duração do QRS e frequência cardíaca foi utilizado o one-way ANOVA com pós-teste Tukey. O teste de Fisher foi utilizado para comparar os percentuais de animais com arritmias. Foram feitas análises utilizando o ANOVA (repeated measures) com o pós-teste Tukey nas avaliações ecocardiográficas. O teste t não pareado foi utilizado na ergometria, ecocardiografia e histopatologia para comparar os animais crônicos com os controles não infectados de mesma idade e para comparar os animais chagásicos crônicos dos dois grupos. A avaliação das citocinas foi feita através do teste ANOVA seguido de teste de comparações múltiplas de Neuwan-Keuls. Os resultados foram considerados significantes quando $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. Caracterização celular por microscopia confocal

Para a análise da caracterização celular por microscopia confocal, foram adicionados os seguintes anticorpos primários: mouse anti-CD44, mouse anti-CD90, mouse anti-CD73, mouse anti-CD34, mouse anti-CD45, mouse anti-CD105, rabbit anti-CD117, rabbit anti-CD133, rabbit anti-miosina esquelética, rabbit anti-GFAP e rabbit anti-citoqueratina 18.

Os anticorpos secundários utilizados foram: goat anti-mouse IgG conjugado com Alexa Fluor 568 ou goat anti-rabbit IgG conjugado com Alexa Fluor 546. Adicionou-se faloidina conjugada com Alexa Fluor 488 para visualização do citoesqueleto. As lamínulas foram montadas com Vectashield contendo DAPI para marcação dos núcleos (Figura 6).

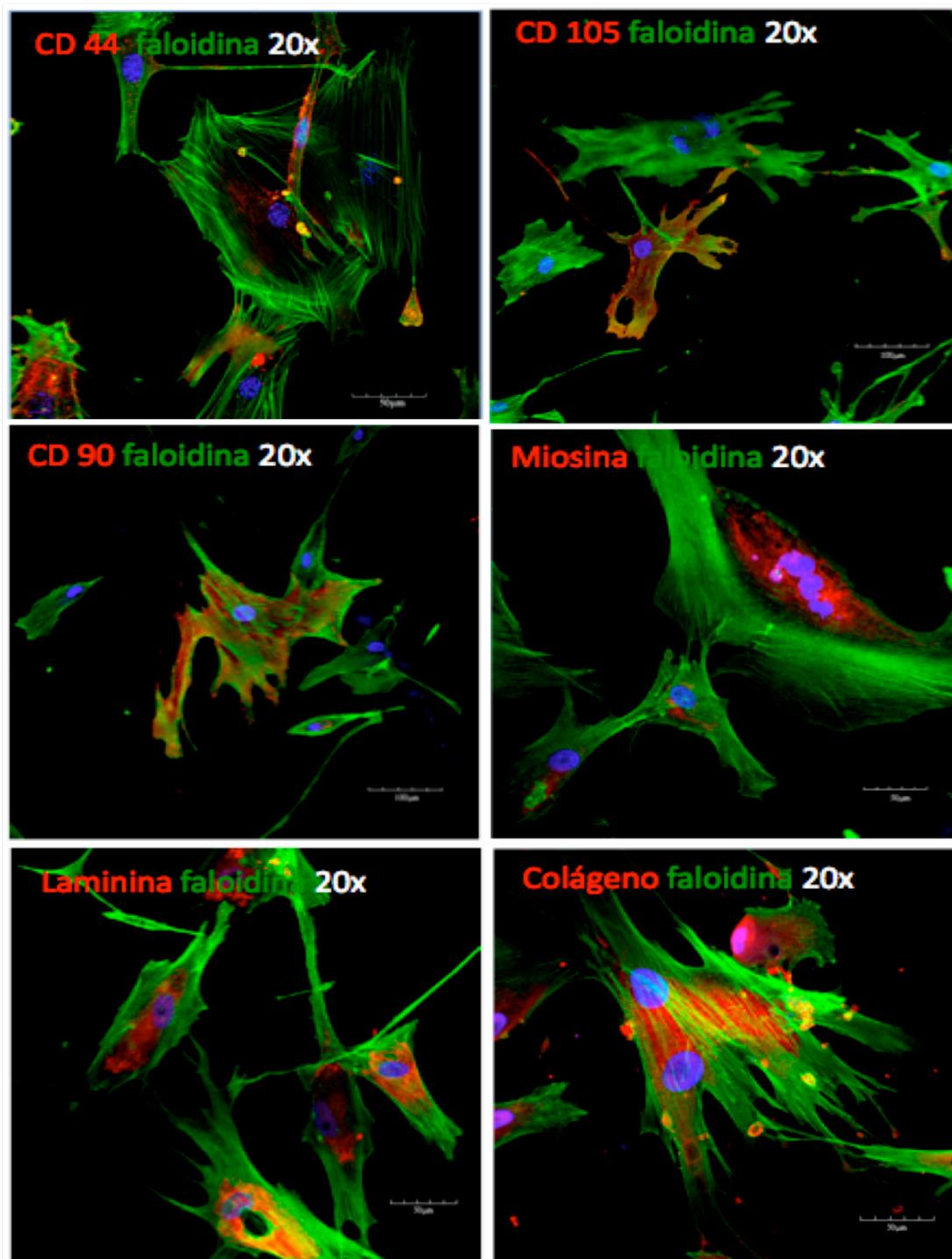


Figura 6: Caracterização celular por microscopia confocal. Fotos ilustrativas das marcações para CD44, CD 105, CD 90, miosina, laminina e colágeno.

6.2. Caracterização do modelo de cardiomiopatia chagásica crônica

Camundongos da linhagem C57BL/6 foram infectados com 1000 tripomastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi*. A avaliação da infecção aguda foi feita através da parasitemia periódica, sendo a parasitemia dos camundongos infectados detectável a partir do 15º dia pós-infecção, tendo sido observado o pico de parasitemia por volta do 30º dia.

Cerca de 6 meses pós-infecção, todos os animais infectados e controles normais foram submetidos à avaliação cardiológica composta por eletrocardiograma, teste ergoespirométrico e ecocardiograma transtorácico para caracterização da cardiomiopatia chagásica crônica neste modelo experimental.

6.2.1. Mortalidade

O estudo foi iniciado com 30 camundongos da linhagem C57BL/6, divididos em três grupos: controles não infectados (n = 10), chagásicos crônicos tratados com DMEM (n = 10) e chagásicos crônicos tratados com CTTAs (n = 10). Não houve óbitos entre os animais não infectados e os tratados com DMEM. Foram observados dois óbitos no grupo de animais tratados com CTTAs, sendo que um deles ocorreu ainda em fase considerada pré-tratamento, por acidente hemorrágico abdominal durante a infusão intraperitoneal das células-tronco. O segundo óbito neste grupo ocorreu cerca de 1 mês após o transplante das CTTAs, por motivo não identificado. Não houve significância estatística no índice de sobrevivência entre os grupos (Figura 7).

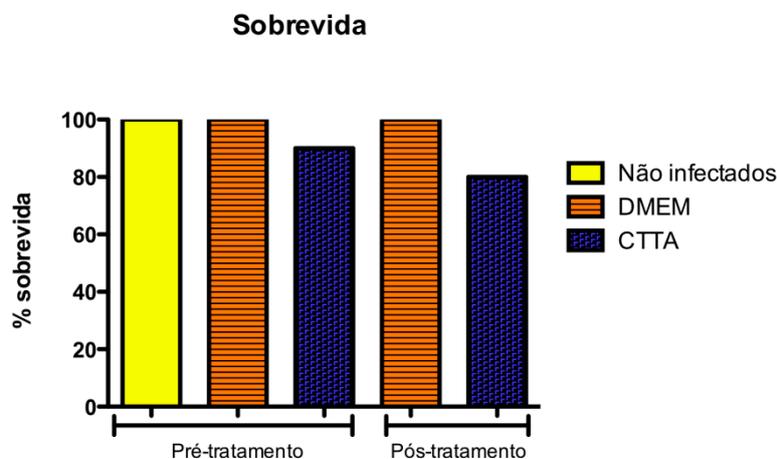


Figura 7: Avaliação da sobrevida em animais não infectados e chagásicos crônicos tratados com meio (DMEM) ou com células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTTAs) nas diferentes fases do tratamento. Percentual de sobrevida nos camundongos não-infectados e em chagásicos crônicos (6 meses). Resultados expressos em percentuais com n inicial de 10 animais em cada grupo.

6.2.2. Resultados eletrocardiográficos

Na cardiomiopatia chagásica, é essencial que seja avaliada a duração do intervalo PR e do complexo QRS, para a determinação quanto à presença de retardo na condução atrioventricular e intraventricular, respectivamente. Pela dificuldade em mensurar a duração do QRS em roedores, neste trabalho foi utilizado o intervalo QT corrigido.

Para esta análise, foram utilizados os eletrocardiogramas de melhor qualidade técnica, sem interferências, que permitiram a avaliação fidedigna dos intervalos medidos, de animais controles não infectados (n = 7) e de animais chagásicos crônicos do grupo DMEM, na fase pré-tratamento (n = 10).

O prolongamento do intervalo PR, que indica o retardo na condução entre os átrios e os ventrículos, foi observado apenas nos animais chagásicos crônicos, que tiveram duração do intervalo PR significativamente maior do que os animais não-infectados (Figura 8A). Não houve diferença entre os animais dos dois grupos quanto à duração do intervalo QTc (Figura 8B).

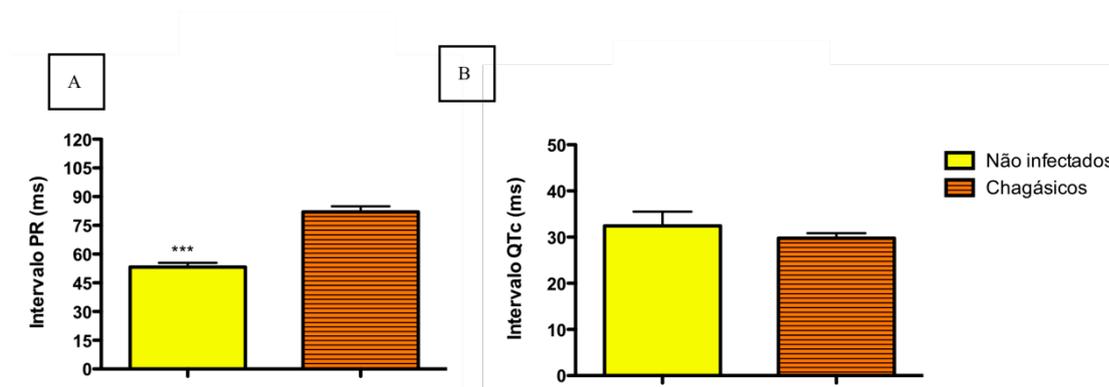


Figura 8: Avaliação dos intervalos eletrocardiográficos em animais não infectados e chagásicos crônicos. Duração do intervalo PR (A) e do intervalo QTc (B) nos camundongos não-infectados e chagásicos (6 meses pós-infecção). Resultados expressos em média \pm erro padrão de 7 dos animais não infectados e 10 dos animais chagásicos. *** $p < 0,0001$.

Foi determinada também a frequência cardíaca nos animais não-infectados e chagásicos, sem diferença com significância estatística (Figura 9).

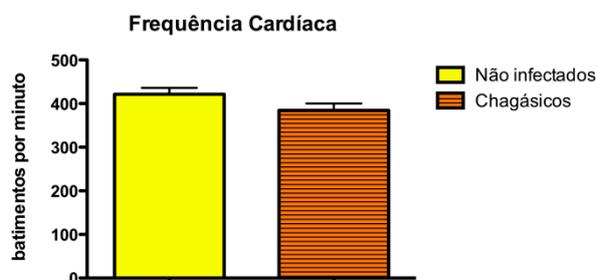


Figura 9: Avaliação de frequência cardíaca em animais não infectados e chagásicos crônicos (6 meses pós-infecção). Resultados expressos em média \pm erro padrão de 7 dos animais não infectados e 10 dos animais chagásicos.

O outro aspecto fundamental na avaliação dos pacientes chagásicos é a presença de arritmias cardíacas, notadamente as taquiarritmias ventriculares e as bradiarritmias, caracterizadas pelos bloqueios atrioventriculares avançados, de 2º ou 3º grau, podendo levar à morte súbita.

Por este motivo, além da mensuração dos intervalos, foi quantificado também o percentual de animais que evoluíram com arritmias em geral, separando em uma segunda análise aqueles que evoluíram com bloqueio atrioventricular de 3^o grau, também conhecido como BAV total (BAVT).

Para esta análise, foram utilizados os eletrocardiogramas cujos traçados permitiram a definição precisa quanto ao ritmo cardíaco, tendo sido incluídos exames de animais controles não infectados (n = 9) e de animais chagásicos crônicos dos grupos DMEM e CTTA, na fase pré-tratamento (n = 16).

Os animais não-infectados também não apresentaram arritmias cardíacas, observadas em muitos dos animais chagásicos crônicos (Figuras 10A e 11).

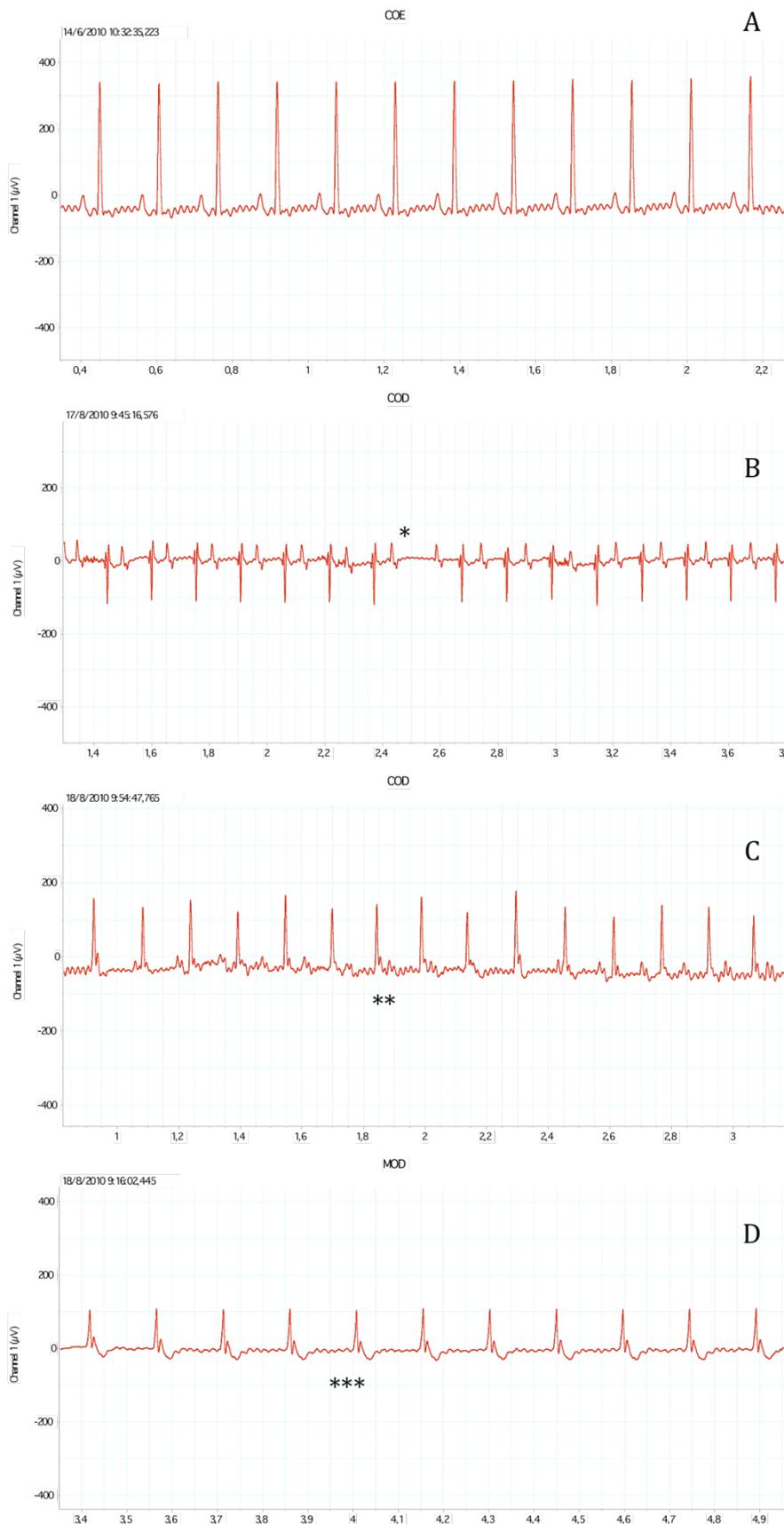


Figura 10:
Traçados
eletrocardiográficos.

(A) ECG de camundongo não-infectado. Observam-se todos os complexos QRS precedidos por onda P, com intervalo PR normal. (B) ECG de camundongo chagásico, com evidência de BAV de 2º grau Mobitz tipo II. Os intervalos PRs são constantes, com presença de uma onda P bloqueada (*), não seguida de QRS. (C) ECG de camundongo chagásico, com evidência de BAV de 3º grau, no qual onda P (**) e QRS não se correlacionam; os átrios e os ventrículos estão dissociados. (D) ECG de camundongo chagásico, com evidência de ritmo juncional, no qual se observa onda P (***) retrógrada, localizada após o QRS.

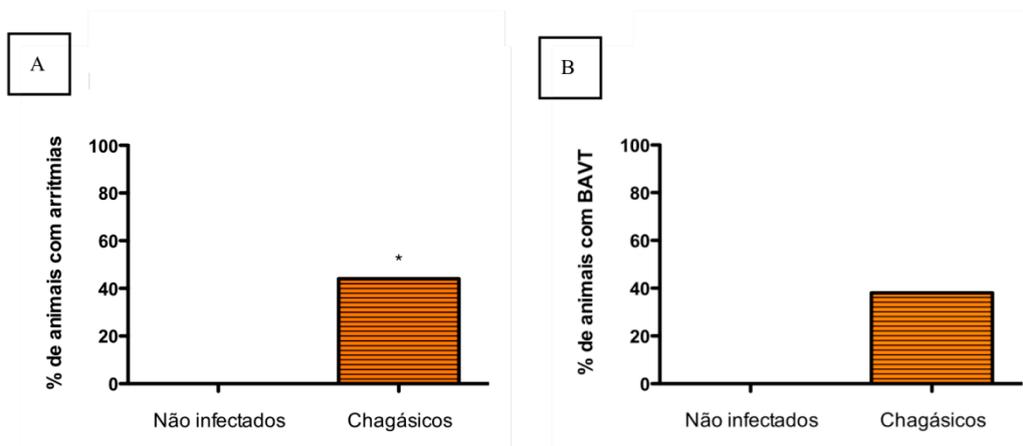


Figura 11: Avaliação de arritmias entre animais não-infectados e chagásicos crônicos. Percentual de arritmias (A) e BAVT (B) nos camundongos não-infectados e em chagásicos crônicos (6 meses). Resultados expressos em média \pm erro padrão de 9 dos animais não infectados e 16 dos animais chagásicos.* $p < 0,05$.

6.2.3. Avaliações ergométricas

Dentre os parâmetros que avaliam o grau de acometimento do coração na CCC, a tolerância ao esforço é o de maior significado. O teste ergoespirométrico é um exame importante na avaliação funcional cardíaca em geral. Quando comparados a indivíduos saudáveis, os pacientes cardiopatas habitualmente apresentam menor tempo de exercício e distância percorrida.

Quanto aos parâmetros espirométricos, no início do exercício, observa-se que a produção de CO_2 aumenta linearmente com o consumo de O_2 , mantendo uma relação VCO_2/VO_2 (também chamada de quociente respiratório) próxima de 1. Com a progressão do esforço, a produção de CO_2 ultrapassa o consumo de O_2 , e começa a haver aumento do QR, que é um indicador do substrato energético utilizado pelo organismo.

No exercício, como os cardiopatas atingem o limiar anaeróbio mais precocemente do que os indivíduos saudáveis, também apresentam menores valores de VO_2 e VCO_2 .

Para esta análise, foram utilizados os testes ergométricos e respirométricos que permitiram uma análise acurada dos parâmetros avaliados, tendo sido incluídos exames de animais controles não infectados ($n = 8$) e de animais chagásicos crônicos dos grupos DMEM e CTTA, na fase pré-tratamento ($n = 18$).

O tempo de exercício, a distância percorrida, o estágio alcançado e a velocidade final atingida foram significativamente maiores entre os animais não-infectados, quando comparados aos animais chagásicos (Figura 12).

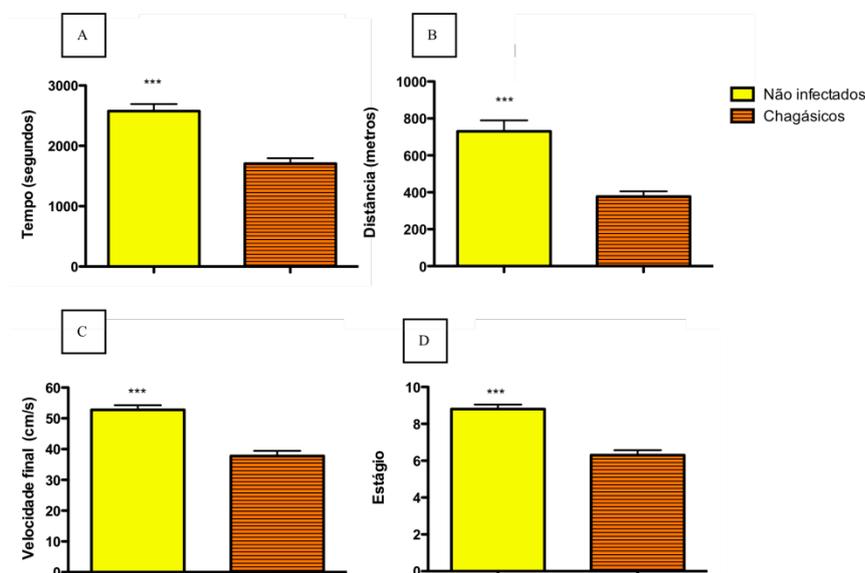


Figura 12: Avaliação dos dados ergométricos em animais não-infectados e chagásicos crônicos (6 meses pós-infecção). (A) Tempo de exercício. (B) Distância percorrida. (C) Velocidade final alcançada. (D) Estágio máximo atingido. Resultados expressos em média \pm erro padrão de 8 dos animais não infectados e 18 dos animais chagásicos. *** $p < 0,0001$.

Os animais não infectados e chagásicos tiveram um aumento nos valores de VO_2 , VCO_2 e gasto energético com a progressão do esforço, com significância estatística, porém não foi detectada diferença entre os dois grupos nestes parâmetros. Os valores de QR, tanto em repouso quanto no pico do esforço, foram maiores nos animais chagásicos, que tiveram uma discreta queda no QR no pico do esforço, o que não ocorreu nos animais não-infectados (Figura 13).

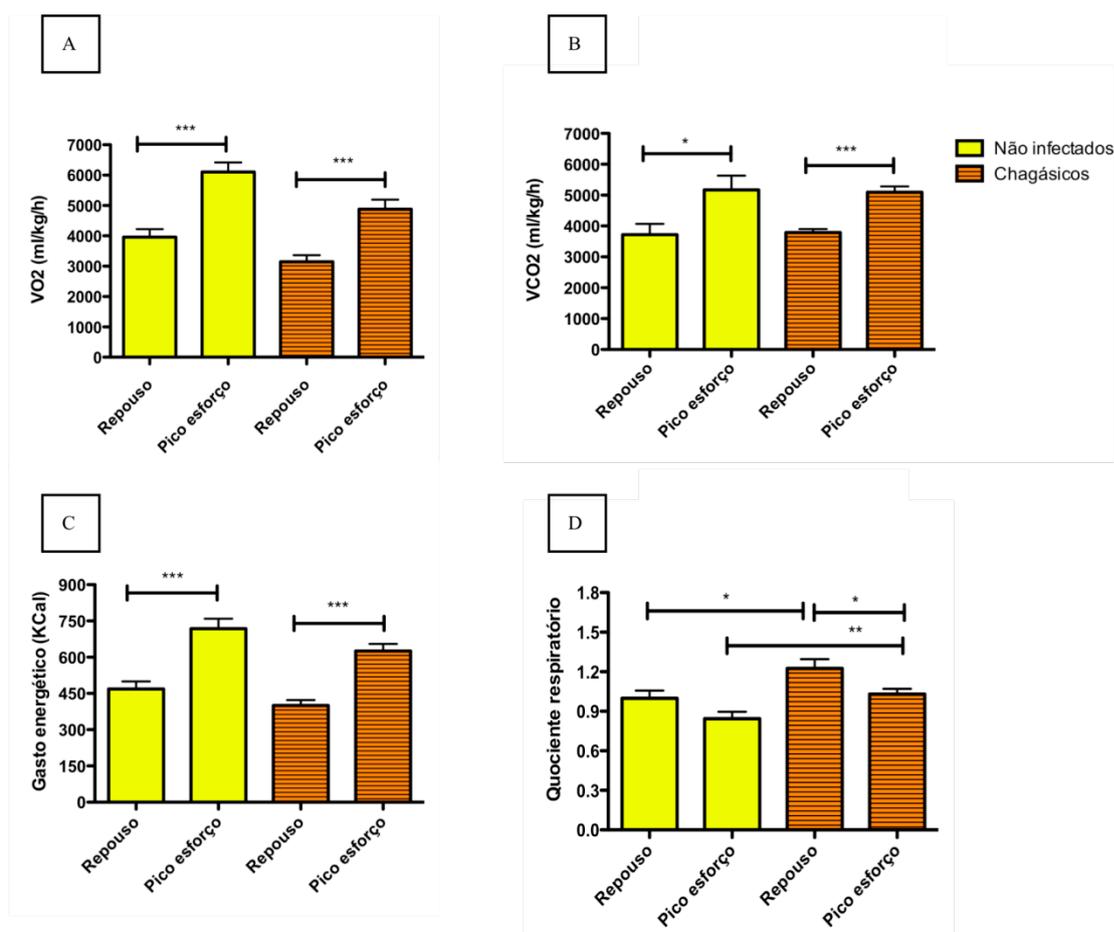


Figura 13: Avaliação dos dados ergoespirométricos em animais não-infectados e chagásicos crônicos. (A) VO₂. (B) VCO₂. (C) Gasto energético. (D) Quociente respiratório. Resultados expressos em média ± erro padrão de 8 dos animais não infectados e 18 dos animais chagásicos. p < 0,05. ** p < 0,001. *** p < 0,0001.

6.2.4. Avaliações ecocardiográficas

O ecocardiograma transtorácico é um exame complementar de baixo custo, que fornece informações fundamentais sobre a função ventricular esquerda e direita, sistólica e diastólica, sobre os volumes e diâmetros das cavidades cardíacas, sobre o funcionamento das válvulas, dentre outras.

Na CCC, em sua forma dilatada, observa-se disfunção ventricular de graus variados, associada à dilatação de câmaras cardíacas, marcadamente do ventrículo esquerdo.

Neste trabalho foram avaliados os parâmetros ecocardiográficos mais importantes para a definição quanto à dilatação ventricular (diâmetros ventriculares) e à disfunção sistólica do ventrículo esquerdo (fração de ejeção). Para esta análise, foram utilizados os ecocardiogramas que permitiram uma análise acurada dos parâmetros citados, tendo sido incluídos exames de animais controles não infectados ($n = 8$) e de animais chagásicos crônicos dos grupos DMEM e CTTA, na fase pré-tratamento ($n = 18$).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre o grupo de camundongos não-infectados e o de chagásicos crônicos, quando avaliados fração de ejeção e diâmetros diastólico e sistólico do ventrículo esquerdo (Figura 14), evidenciando que neste modelo os animais não evoluem com dilatação ventricular e disfunção sistólica.

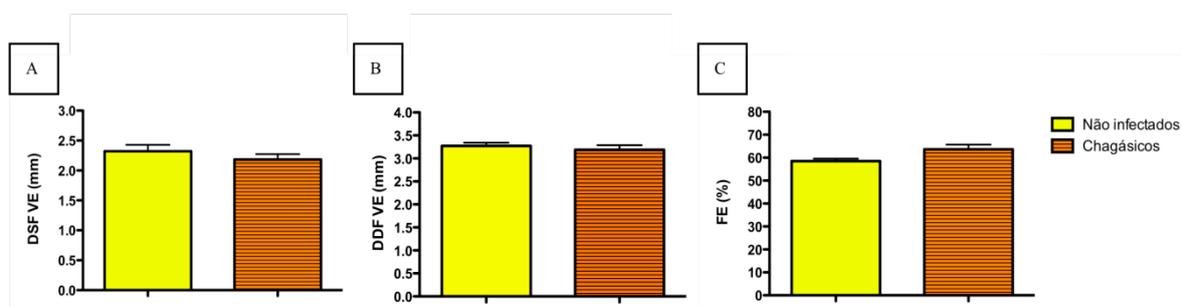


Figura 14: Avaliação dos parâmetros ecocardiográficos em animais não-infectados e chagásicos crônicos. Diâmetros sistólico (A) e diastólico (B) finais do ventrículo esquerdo. (C) Fração de ejeção. Resultados expressos em média \pm erro padrão de 8 dos animais não infectados e 18 dos animais chagásicos.

6.3. Avaliação dos efeitos da terapia celular

Os animais chagásicos foram divididos em dois grupos, sendo que um recebeu DMEM ($n = 10$) e o outro foi transplantado com CTTAs ($n = 10$), por via intraperitoneal. As avaliações cardiológicas foram repetidas em 18 animais chagásicos (10 no grupo DMEM e 8 no grupo CTTA, devido a dois óbitos neste último grupo), 30 dias após a primeira infusão de meio DMEM ou CTTAs, e 30 dias após a segunda infusão, com um intervalo de 1 mês entre as duas infusões (Figura 5).

6.3.1. Avaliações de função cardíaca

6.3.1.1. Resultados eletrocardiográficos

Para esta análise, foram utilizados os eletrocardiogramas de melhor qualidade técnica, sem interferências, que permitiram a avaliação fidedigna dos intervalos medidos, de animais do grupo DMEM (n = 7) e de animais grupo CTTA (n = 8).

Quando avaliados os intervalos eletrocardiográficos, pôde-se observar que não houve diferença com significância estatística entre os animais chagásicos dos dois grupos, quando comparados entre si.

Do mesmo modo, também não houve influência da terapia com CTTA no prolongamento do intervalo PR, quando avaliado este grupo nas fases pré e pós-tratamento. Os intervalos PR e QTc permaneceram estáveis nos dois grupos de animais chagásicos durante todo o período avaliado (Figura 15).

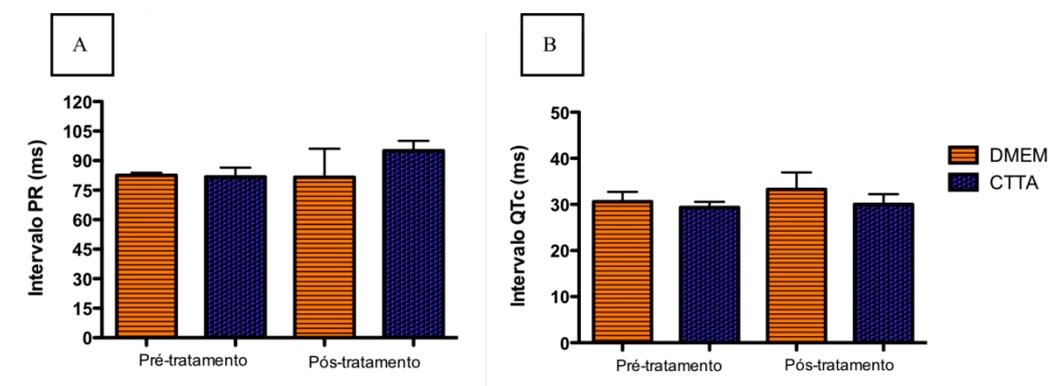


Fig. 15. Avaliação dos intervalos eletrocardiográficos em animais chagásicos crônicos tratados com meio DMEM) ou com células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTTAs) nas diferentes fases do tratamento. Duração do intervalo PR (A) e do intervalo QTc (B) nos camundongos chagásicos tratados com meio (DMEM) ou com CTTAs nas fases pré- (6 m.p.i) e pós-tratamento (8 m.p.i). Resultados expressos em média \pm erro padrão de 7 dos animais do grupo DMEM e 8 dos animais do grupo CTTA.

Quanto a frequência cardíaca, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas quando comparados os animais tratados com DMEM e os animais tratados com CTTAs (Figura 16).

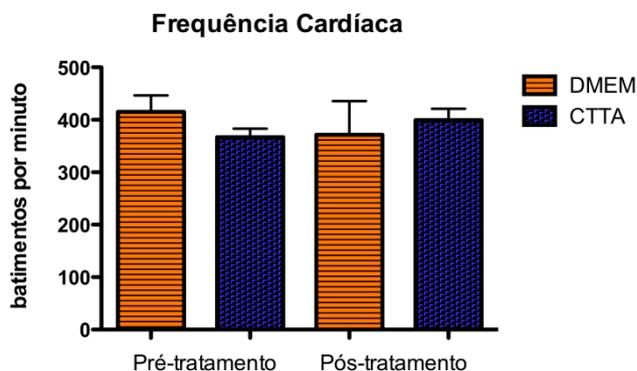


Fig. 16. Avaliação de frequência cardíaca em animais chagásicos crônicos tratados com meio (DMEM) ou com células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTTAs) nas diferentes fases do tratamento. Resultados expressos em média \pm erro padrão de 7 dos animais do grupo DMEM e 8 dos animais do grupo CTTA.

Na avaliação quanto à presença de arritmias cardíacas, foram utilizados os eletrocardiogramas cujos traçados permitiram a definição precisa quanto ao ritmo cardíaco, tendo sido incluídos exames de 7 animais do grupo DMEM e 8 animais do grupo CTTA.

Dentre os animais chagásicos tratados com DMEM, um animal inicialmente tinha extrassístoles ventriculares (Figura 17A), tendo evoluído com bloqueio atrioventricular total (Figura 17B), no qual onda P e complexo QRS não se correlacionam.

Três animais do grupo DMEM tinham BAVT, na fase pré-tratamento, tendo permanecido com a arritmia, sendo que dois passaram a cursar concomitantemente com freqüentes extrassístoles ventriculares.

Um animal tinha o traçado eletrocardiográfico normal, tendo evoluído também com BAVT. Os demais animais deste grupo permaneceram com o eletrocardiograma erro padrão alterações.

Entre os camundongos tratados com CTTAs, três animais tinham BAVT (Figura 17C), na fase pré-tratamento, sendo que um deles apresentou reversão da arritmia, passando a ter ritmo sinusal (Figura 17D), o que não ocorreu em nenhum dos animais tratados com DMEM.

De quatro animais do grupo CTTA com ECG normal, um evoluiu com BAV de 2^o grau tipo II (Figura 10B) e três animais evoluíram com BAVT (exemplo na Figura 10C).

Apenas um camundongo do grupo CTTA teve modificação de ECG normal para ritmo juncional (Figura 10D). Os demais animais deste grupo também permaneceram com o eletrocardiograma erro padrão alterações.

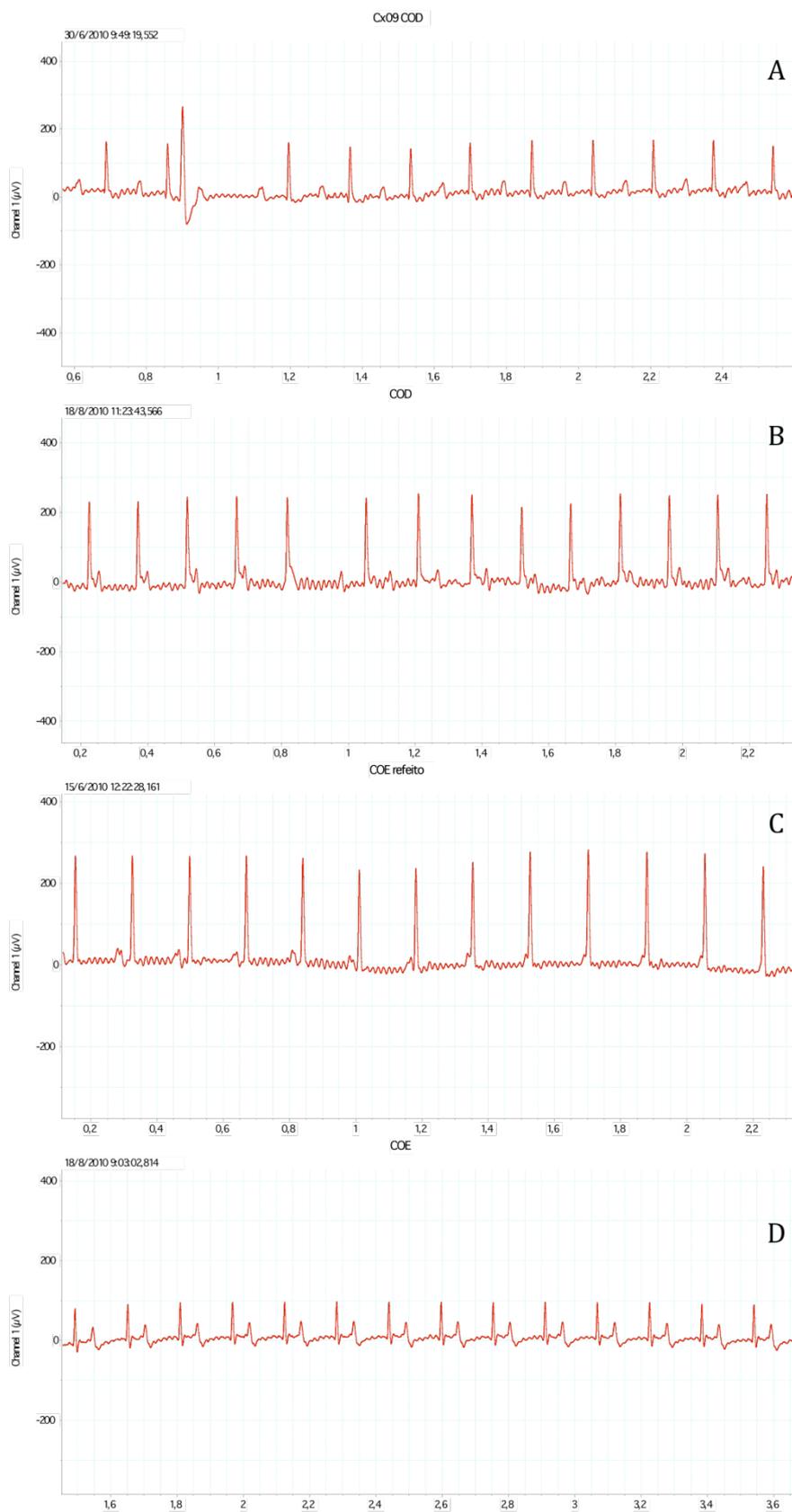


Figura 17:
Traçados
eletrocardiográficos de
animais chagásicos
crônicos. ECG de camundongo DMEM pré-tratamento, em ritmo sinusal com extrasístole ventricular (A) e pós-tratamento, em BAVT (B). ECG de camundongo do grupo tratado com células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTTAs) pré-tratamento, em BAVT (C) e pós-tratamento, em ritmo sinusal (D).

As diferenças entre os percentuais de arritmias em geral e de BAVT não atingiram significância estatística quando comparados os grupos tratados com DMEM ou com CTTAs (Figura 18).

Também não se observou diferença quando os grupos foram comparados entre si nos dois tempos de infecção, apesar de ter sido observada uma tendência ao aumento de arritmias nos dois grupos estudados.

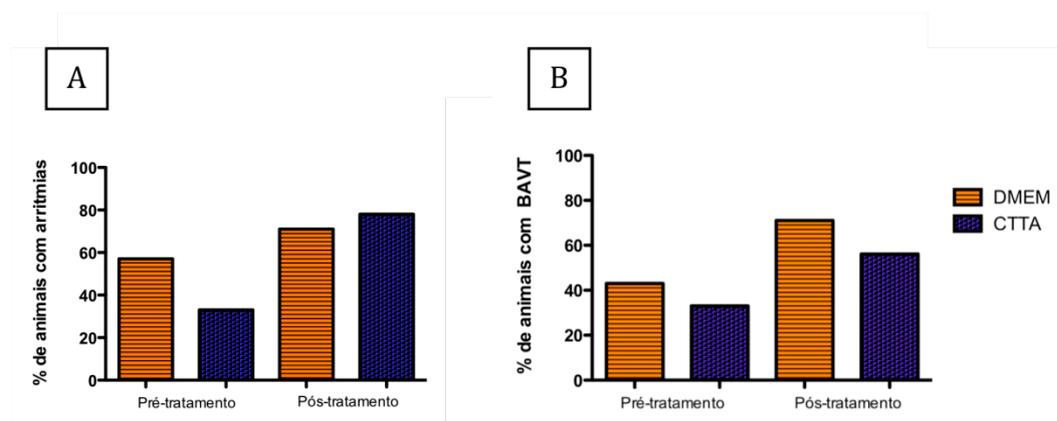


Figura 18: Avaliação de arritmias em animais chagásicos crônicos tratados com meio (DMEM) ou com células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTTAs) nas diferentes fases do tratamento. Percentual de arritmias (A) e BAVT (B) nos camundongos chagásicos nas fases pré- (6 m.p.i) e pós-tratamento (8 m.p.i). Resultados expressos em percentuais com 7 dos animais do grupo DMEM e 8 dos animais do grupo CTTA.

6.3.1.2. Resultados da avaliação funcional ergoespirométrica

Para esta análise, foram utilizados os testes ergométricos e respirométricos que permitiram uma análise acurada dos parâmetros avaliados, tendo sido incluídos exames de 7 animais do grupo DMEM e de 8 animais do grupo CTTA.

Quando considerados os parâmetros de tempo de exercício, distância percorrida, velocidade final e estágio máximo alcançado, não houve diferença com significância estatística entre os animais chagásicos dos dois grupos, quando comparados um com o outro, ou quando considerados isoladamente, nas fases pré- e pós-tratamento (Figura 19).

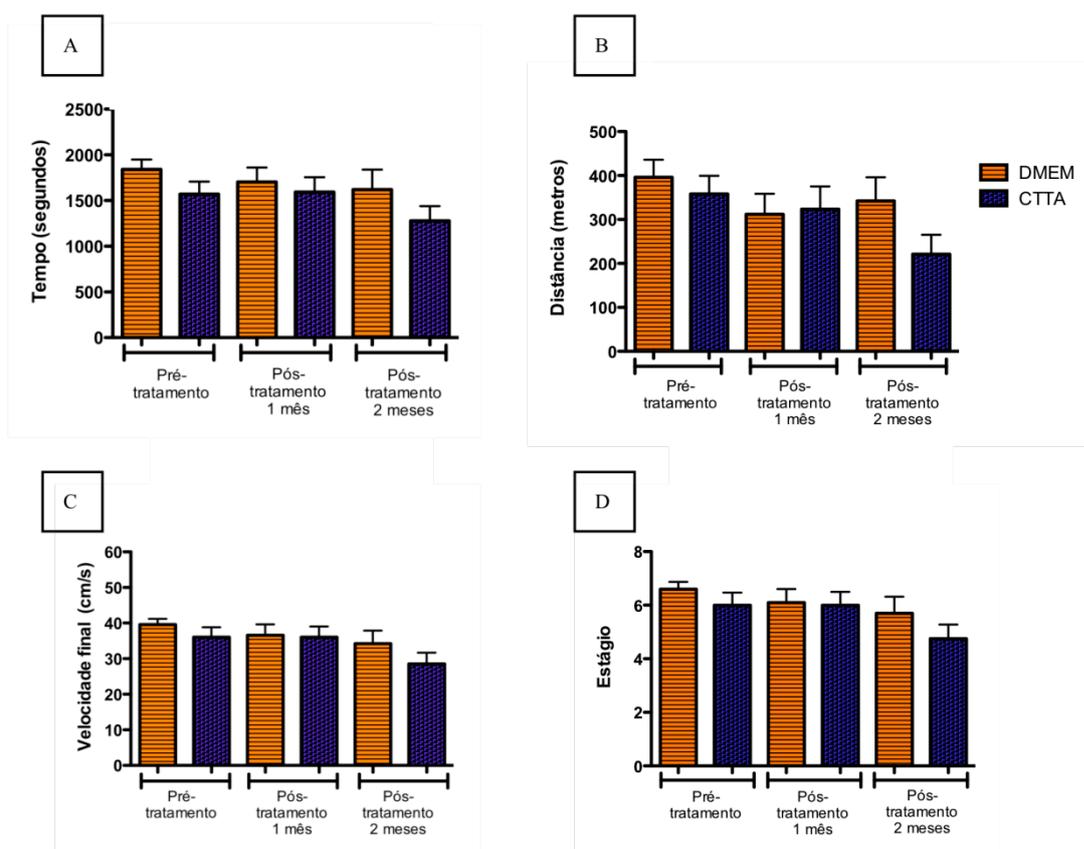


Figura 19: Avaliação dos dados ergométricos em animais chagásicos crônicos tratados com meio (DMEM) ou com células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTTAs) nas diferentes fases do tratamento. (A) Tempo de exercício. (B) Distância percorrida. (C) Velocidade final alcançada. (D) Estágio máximo atingido. Resultados expressos em média \pm erro padrão de 7 dos animais do grupo DMEM e 8 dos animais do grupo CTTA.

O grupo DMEM evoluiu, após o primeiro mês, com aumento do VO_2 , sendo este valor mantido após o segundo mês de observação. O grupo CTTA apresentou uma tendência à elevação do VO_2 após o tratamento, porém erro padrão significância estatística.

Quanto à produção de dióxido de carbono, pôde-se observar um aumento do VCO_2 em repouso no grupo DMEM após o primeiro mês, o que não foi observado no grupo CTTA. Houve queda acentuada no VCO_2 em repouso e no pico do esforço após o segundo mês nos grupos DMEM e CTTA, com significância estatística, quando comparados com o primeiro mês pós-tratamento (Figura 20).

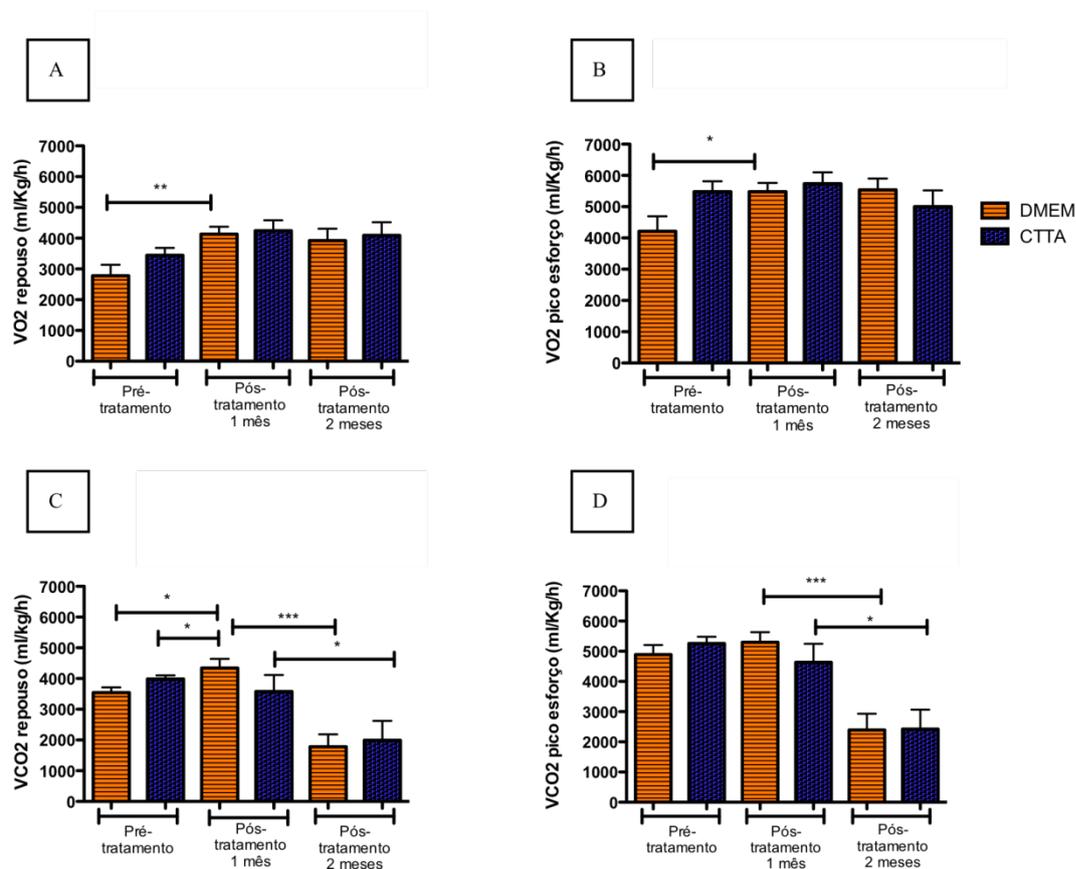


Figura 20: Avaliação de VO₂ e VCO₂ em animais chagásicos crônicos tratados com meio (DMEM) ou com células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTTAs) nas diferentes fases do tratamento. VO₂ de repouso (A) e de pico do esforço (B). VCO₂ de repouso (C) e de pico do esforço (D). Resultados expressos em média \pm erro padrão de 7 dos animais do grupo DMEM e 8 dos animais do grupo CTTA. * p < 0,05. ** p < 0,001. *** p < 0,0001.

Os animais do grupo CTTA apresentaram maior gasto energético do que os do grupo DMEM na fase pré-tratamento. Em repouso, no grupo DMEM, houve elevação do gasto energético após o primeiro mês, com retorno aos valores encontrados antes do tratamento após o segundo mês. No pico do esforço, também houve elevação do gasto energético após o primeiro mês, porém estes valores se mantiveram estáveis no segundo mês de tratamento. No grupo CTTA, em repouso, não se observou variação nos valores de gasto energético. No pico do esforço, houve queda do gasto energético, com significância estatística, após o segundo mês de tratamento. Observou-se ainda queda progressiva do quociente respiratório nos dois grupos, com significância estatística (Figura 21).

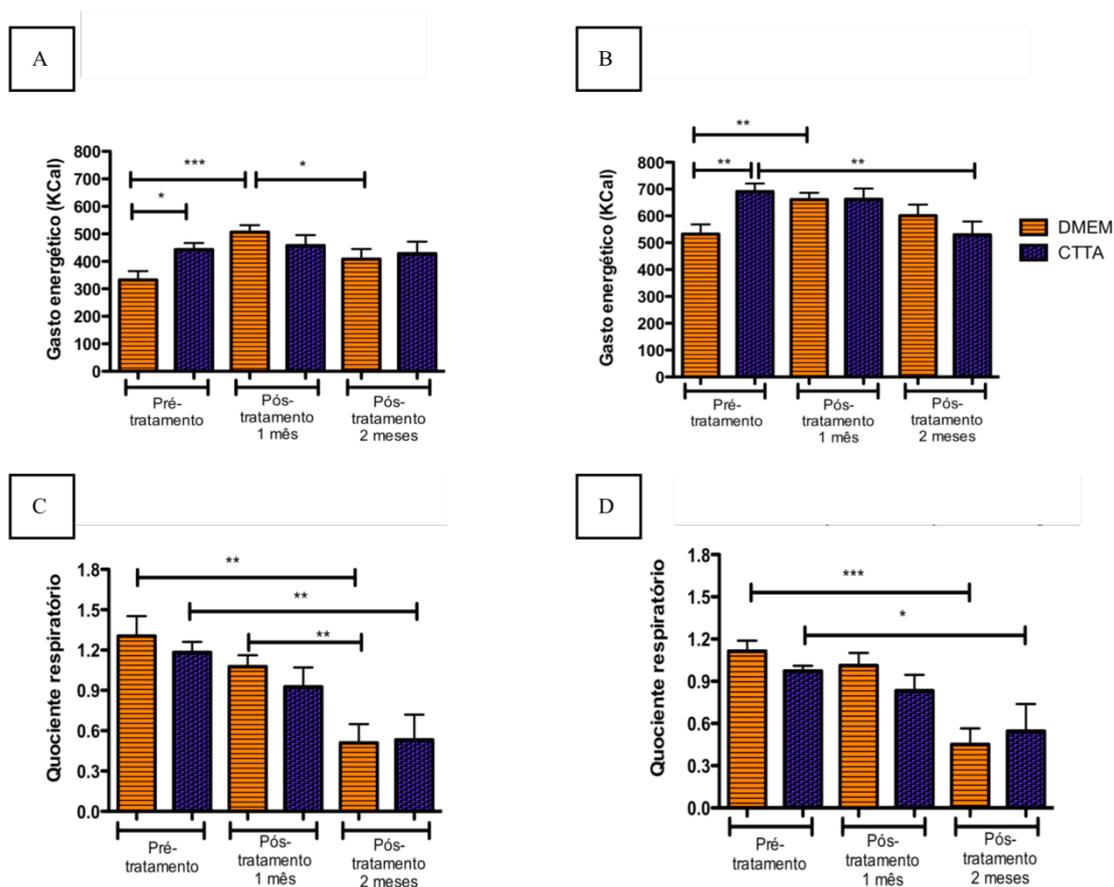


Figura 21: Avaliação de gasto energético e quociente respiratório em animais chagásicos crônicos tratados com meio (DMEM) ou com células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTTAs) nas diferentes fases do tratamento. Gasto energético em repouso (A) e no pico do esforço (B). Quociente respiratório em repouso (C) e no pico do esforço (D). Resultados expressos em média \pm erro padrão de 7 dos animais do grupo DMEM e 8 dos animais do grupo CTTA. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$.

6.3.1.3. Resultados ecocardiográficos

Foram utilizados os ecocardiogramas que permitiram uma análise acurada dos parâmetros citados abaixo, tendo sido incluídos exames de 7 animais do grupo DMEM e de 8 animais do grupo CTTA.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os camundongos chagásicos dos dois grupos, comparados um com o outro, ou considerados isoladamente, nas

diferentes fases estudadas, quando avaliados fração de ejeção e diâmetros diastólico e sistólico do VE (Figura 22).

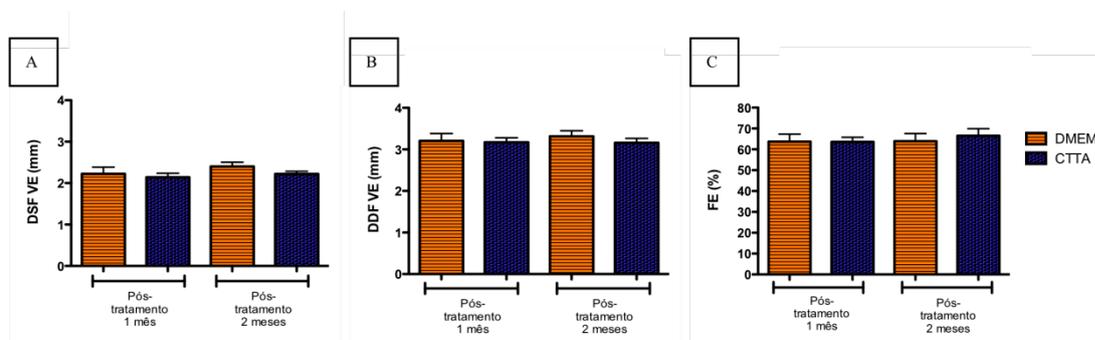


Figura 22: Avaliação dos parâmetros ecocardiográficos em animais chagásicos crônicos tratados com meio (DMEM) ou com células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTTAs) nas diferentes fases do tratamento. Diâmetros sistólico (A) e diastólico (B) finais do ventrículo esquerdo. (C) Fração de ejeção. Resultados expressos em média \pm erro padrão de 7 dos animais do grupo DMEM e 8 dos animais do grupo CTTA.

6.3.2. Avaliações histológicas e morfológicas

Para a avaliação de histologia e morfometria, foram utilizadas lâminas de 5 camundongos não infectados, 6 animais do grupo DMEM e 8 do grupo CTTA.

Secções de corações de camundongos chagásicos crônicos apresentaram alterações histológicas características da cardiomiopatia chagásica crônica (Figura 23). Observa-se a presença de infiltrados inflamatórios focais e diserro padrãoinados compostos predominantemente por células mononucleares, miocitólise, mionecrose e fibrose. Ambos os grupos (tratados com DMEM ou CTTAs) apresentaram padrão semelhante, porém o grau de inflamação e de fibrose nos corações de animais tratados com CTTAs foi menor do que os tratados com DMEM.

Na figura 23A, um corte de coração normal, com coloração tricrômio de Masson, mostra estrutura arteriolar, com colágeno circunjacente à mesma (corado em azul), fibras cardíacas normais, ausência de infiltrado inflamatório.

A figura 23B mostra corte de coração chagásico crônico, com coloração tricrômio de Masson, evidenciando intenso infiltrado inflamatório multifocal produzido por células mononucleares, frequentemente aderidas a fibras cardíacas, produzindo lesões miocitolíticas nas mesmas, sendo a área inflamada entremeada por intensa fibrose (corada em azul).

Na figura 23C, observa-se corte de coração chagásico crônico tratado com CTTAs, com coloração tricrômio de Masson, com discretos infiltrados focais produzido por células mononucleares, sendo as áreas inflamadas entremeadas por discreta fibrose (corada em azul).

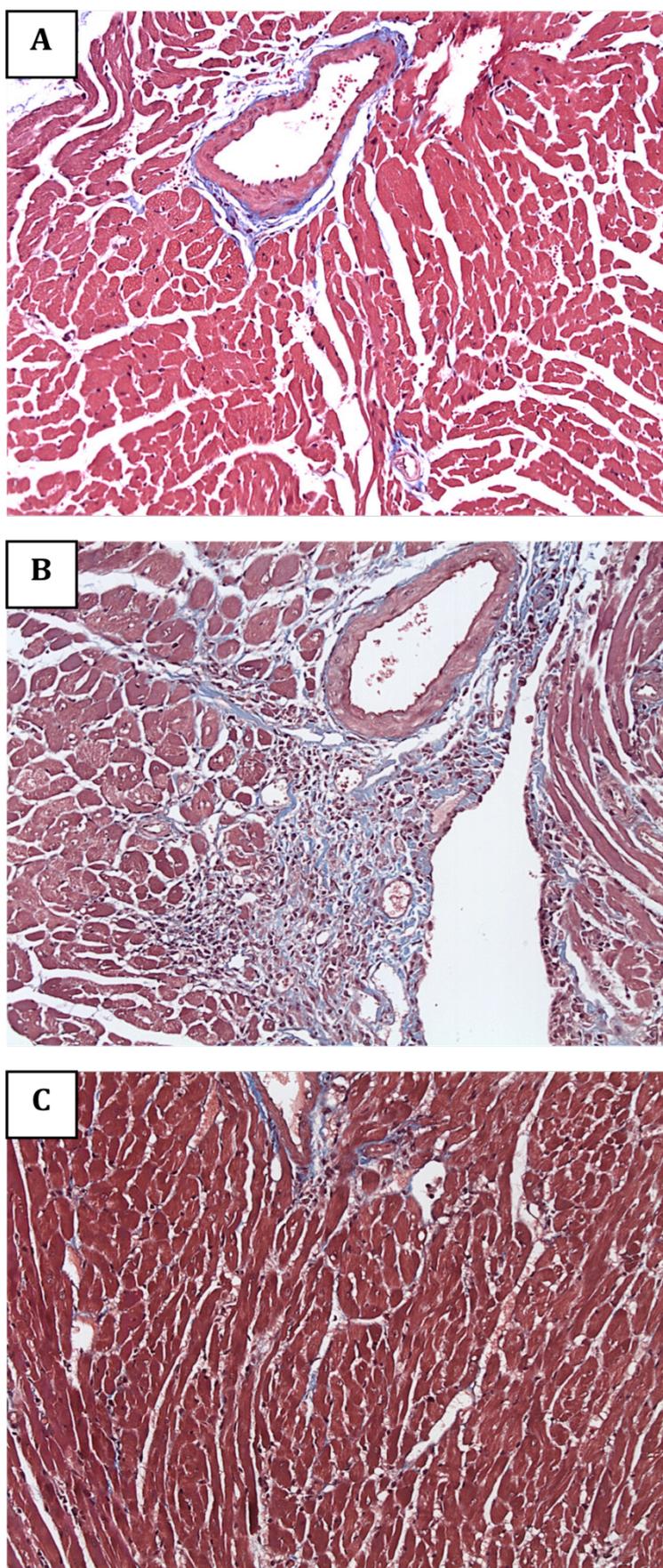


Figura 23: Histologia de secções de corações de camundongos sacrificados dois meses após a terapia celular. (A), Animal não-infectado. (B), Animal chagásico crônico tratado com DMEM. (C), Animal chagásico crônico tratado com células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTTAs). Secções coradas com tricrômio de Masson. Aumento: 200 x.

Ao avaliar por morfometria a inflamação e fibrose de forma comparativa entre os dois grupos de animais chagásicos, observamos uma redução tanto de fibrose e inflamação nos animais tratados com CTTA, com significância estatística (Figura 24).

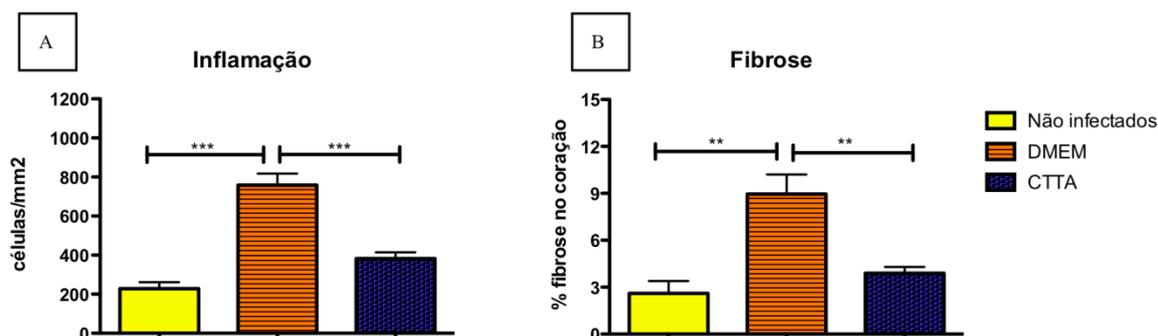


Figura 24: Avaliação morfométrica de secções de corações de animais não-infectados e chagásicos tratados com meio (DMEM) ou com células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTTAs). (A) Número de células inflamatórias por mm² quantificado em secções coradas com H&E. (B) Percentual de fibrose quantificado em secções coradas com tricrômio de Masson. Resultados expressos em média \pm erro padrão de 5 animais não infectados, 6 animais do grupo DMEM e 8 animais do grupo CTTA. ** $p < 0,01$. *** $p < 0,0001$.

Além do coração, foi realizada a avaliação histopatológica de músculo esquelético. Tanto os animais chagásicos tratados com DMEM quanto com CTTAs apresentaram inflamação no músculo esquelético, caracterizando uma miosite intensa observada na fase crônica da doença (Figuras 25 e 26).

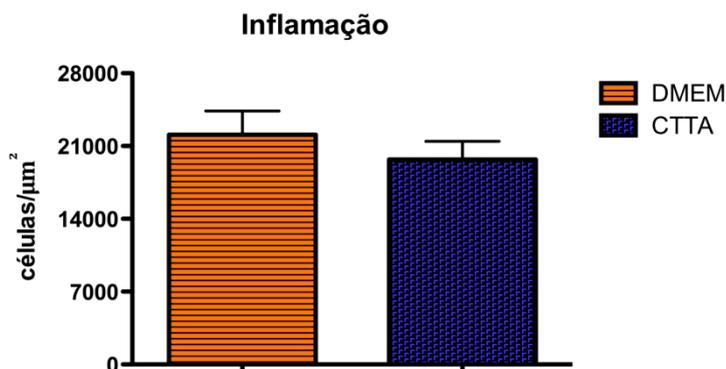


Figura 25: Avaliação morfométrica de secções de músculo esquelético de animais chagásicos tratados com meio (DMEM) ou com células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTTAs). Número de células inflamatórias por μm^2 quantificado em secções coradas com H&E. Resultados expressos em média \pm erro padrão de 6 animais do grupo DMEM e 8 animais do grupo CTTA.

Na figura 26A, observa-se corte de músculo esquelético normal, com coloração H&E, mostrando fibras musculares normais, erro padrão infiltrado inflamatório.

A figura 26B mostra corte de músculo esquelético de animal chagásico crônico, com coloração H&E, com a demonstração de intenso infiltrado inflamatório focal produzido por células mononucleares, aderidas a fibras musculares, produzindo lesões miocitolíticas nas mesmas.

Na figura 26C, pode-se observar corte de músculo esquelético de animal chagásico crônico, tratado com CTTAs, com coloração H&E, com infiltrado inflamatório multifocal produzido por células mononucleares, aderidas a fibras musculares, nas quais também produziram lesões miocitolíticas.

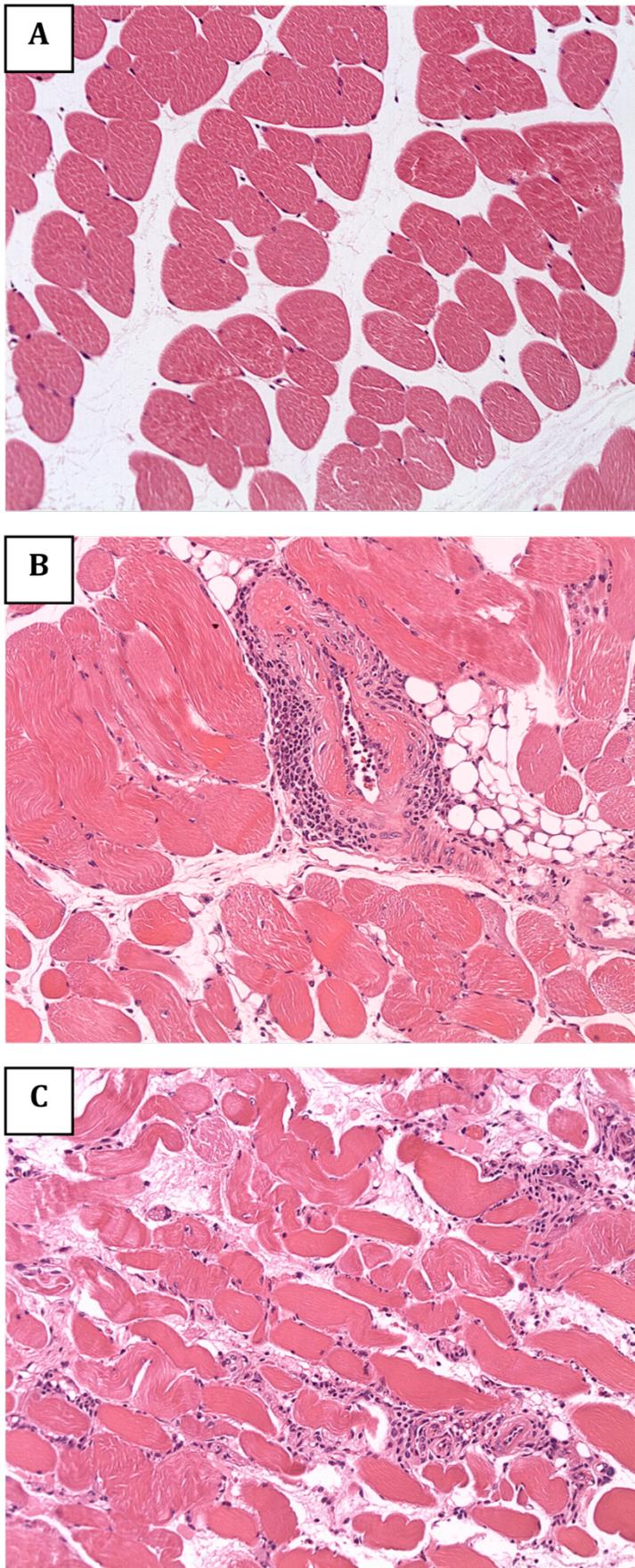


Figura 26: Histologia de seções de músculo esquelético de camundongos sacrificados dois meses após a terapia celular. (A), Animal não-infectado. (B), Animal chagásico crônico tratado com DMEM. (C), Animal chagásico crônico tratado com células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTTAs). Seções coradas com H&E. Aumento: 200 x.

6.3.3. Avaliação da produção de citocinas

Foram avaliadas, utilizando a plataforma Luminex, as concentrações de 22 citocinas no soro de animais não-infectados, chagásicos tratados com meio DMEM e tratados com CTTAs, sacrificados dois meses após o início do tratamento (Figuras 27-29).

De um modo geral, houve um aumento ou tendência de elevação de quase todas as citocinas quando comparadas as concentrações no soro de animais normais e chagásicos controles. As comparações entre normais e chagásicos crônicos foram estatisticamente significativas para IL-5, IL-10 (Figura 27), IL-17, GM-CSF, IFN γ , TNF α (Figura 28), KC e MIP1 β (Figura 29).

Quando os resultados dos grupos chagásicos tratados com DMEM ou com CTTAs foram comparados, observamos uma tendência à redução para algumas citocinas, enquanto que para outras as concentrações foram semelhantes ou até mais elevadas no grupo tratado com CTTAs.

Apenas para IL-12 p40 (Figura 28) e para RANTES (Figura 29) foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo tratado com CTTAs e com DMEM. No entanto, diferentemente do grupo DMEM, o grupo tratado com CTTAs não apresentou diferenças significativas para IL-10, GM-CSF, IFN γ , TNF α e MIP1 β em relação ao grupo não infectado (Figuras 27-29).

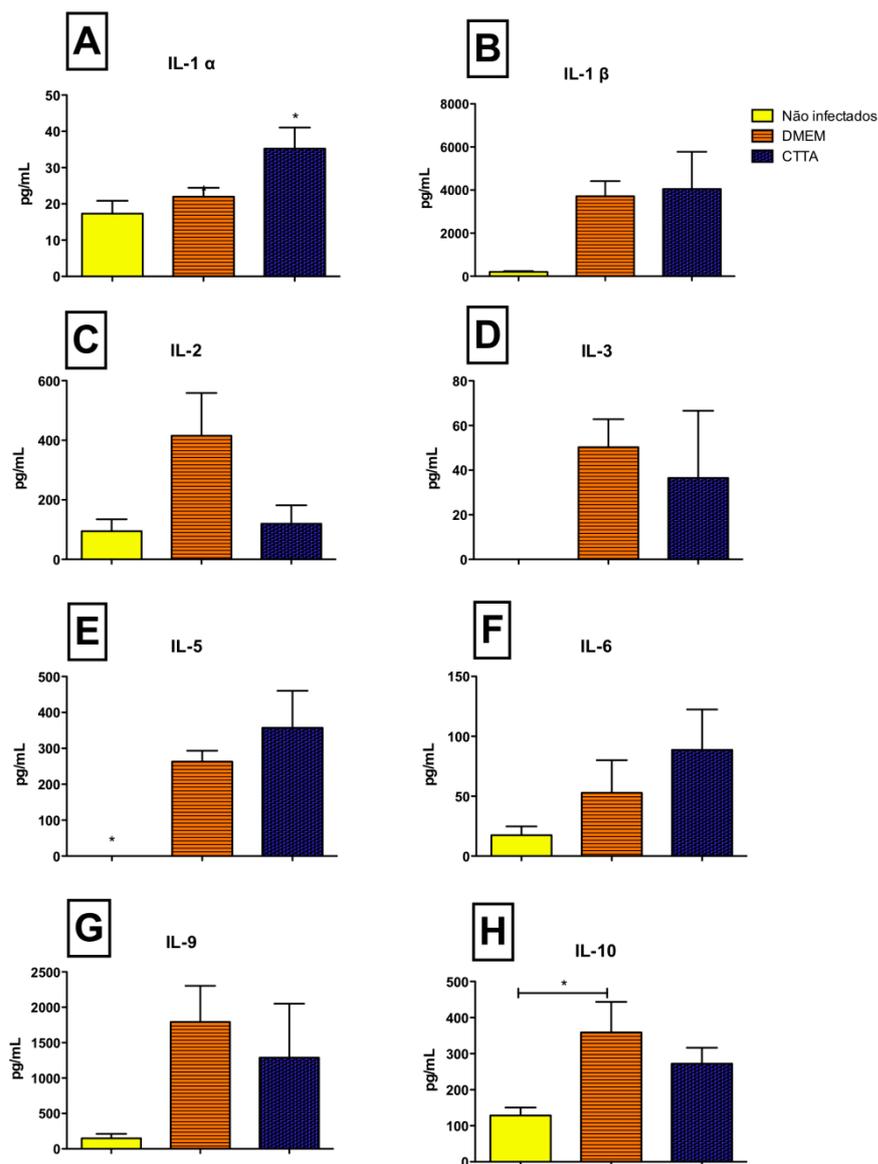


Figura 27: Concentrações séricas de IL-1 α (A), IL-1 β (B), IL-2 (C), IL-3 (D), IL-5 (E), IL-6 (F), IL-9 (G) e IL-10 (H). Soros de animais não-infectados, chagásicos tratados com DMEM ou com células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTTAs) foram analisados na plataforma Luminex. Resultados expressos em média \pm erro padrão de 5 dos animais não infectados, 5 animais do grupo DMEM e 8 dos animais do grupo CTTA. * $p < 0,05$.

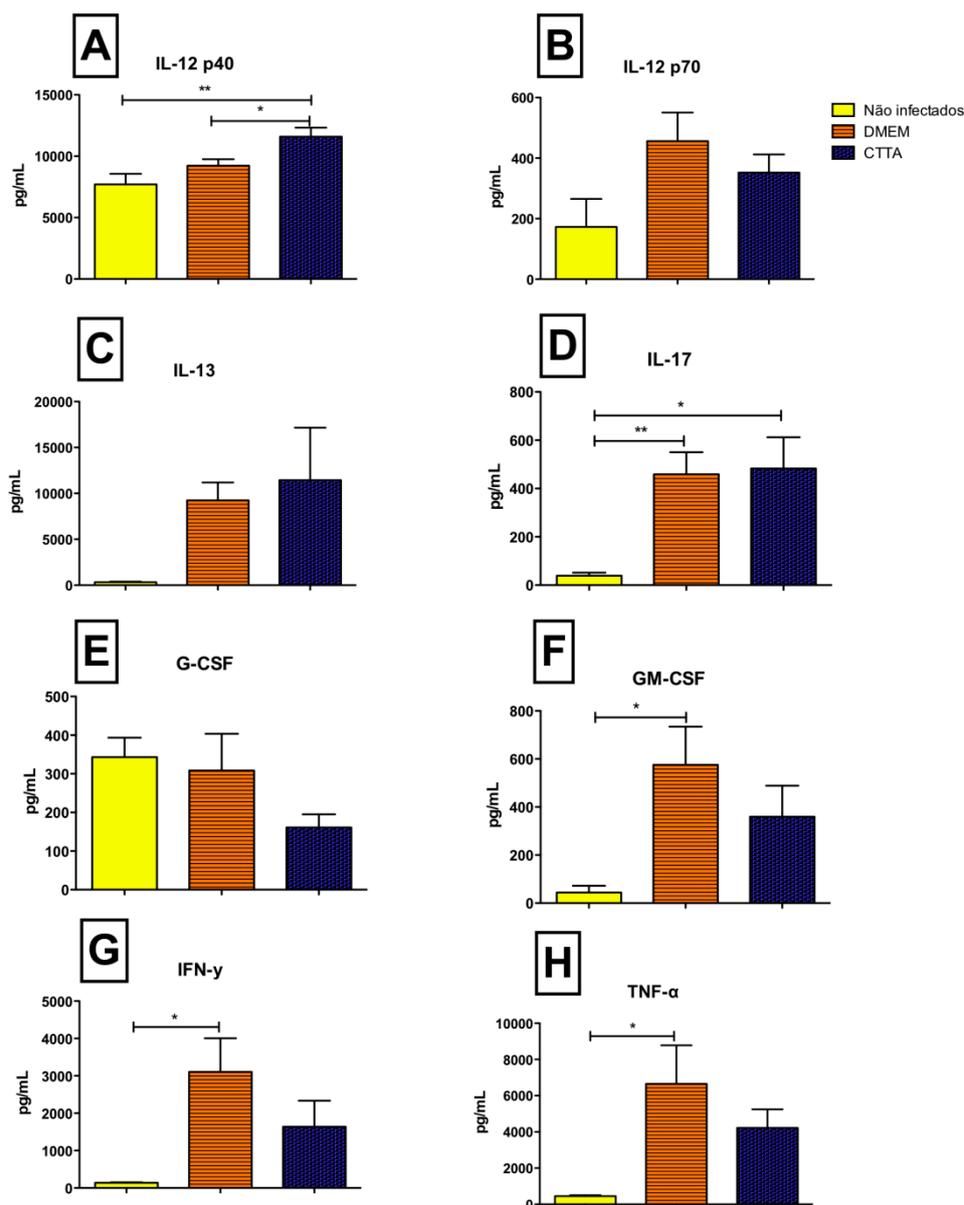


Figura 28: Concentrações séricas de IL-12p40 (A), IL-12p70 (B), IL-13 (C), IL-17 (D), G-CSF (E), GM-CSF (F), IFN γ (G) e TNF α (H). Soros de animais não-infectados, chagásicos tratados com DMEM ou com células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTTAs) foram analisados na plataforma Luminex. Resultados expressos em média \pm erro padrão de 5 dos animais não infectados, 5 animais do grupo DMEM e 8 dos animais do grupo CTTA. * p < 0,05. ** p < 0,01.

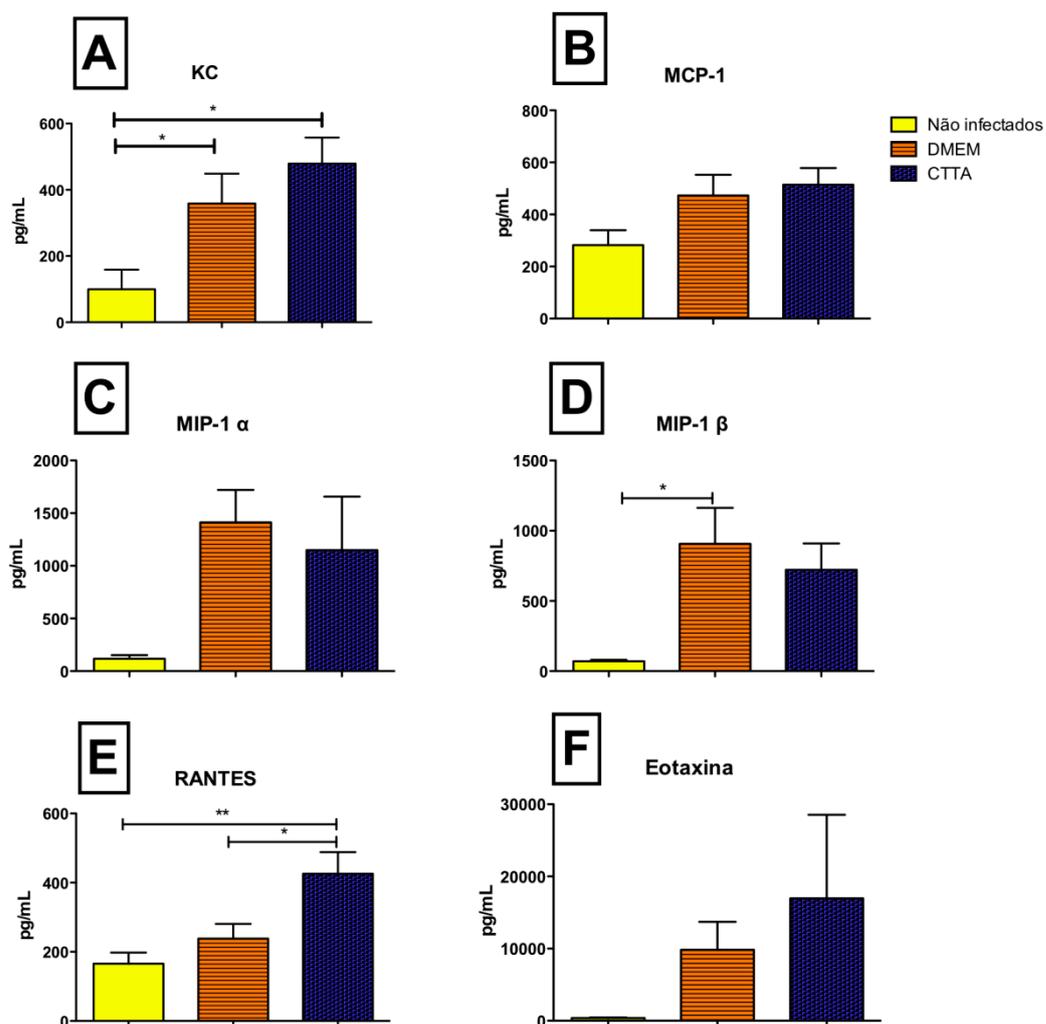


Figura 29: Concentrações séricas de KC (A), MCP1 (B), MIP1 α (C), MIP1 β (D), RANTES (E) e Eotaxina (F). Soros de animais não-infectados, chagásicos tratados com DMEM ou com células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTTAs) foram analisados na plataforma Luminex. Resultados expressos em média \pm erro padrão de 5 dos animais não infectados, 5 animais do grupo DMEM e 8 dos animais do grupo CTTA. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

7. DISCUSSÃO

Neste trabalho avaliamos os efeitos do transplante de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo humano na função cardíaca, na inflamação e na fibrose no coração, e na produção de citocinas, em um modelo experimental de cardiomiopatia chagásica crônica, induzida pela infecção de camundongos C57BL/6 pela cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi*.

Observou-se, do ponto de vista de caracterização de doença, que os animais chagásicos apresentaram alterações eletrocardiográficas, principalmente prolongamento do intervalo PR e arritmias, representada, na maioria dos camundongos, por bloqueio atrioventricular total. Do mesmo modo, os animais chagásicos, quando comparados aos não-infectados, apresentaram pior desempenho nos parâmetros ergométricos de tempo de exercício, distância percorrida, velocidade final alcançada e estágio máximo atingido. Animais chagásicos e não-infectados apresentaram valores semelhantes de gases ao teste ergoespirométrico, bem como de parâmetros ecocardiográficos, não tendo sido evidenciada dilatação de câmaras cardíacas ou disfunção ventricular nos animais chagásicos.

O primeiro aspecto a ser considerado nesta discussão é o modelo utilizado neste trabalho para a indução de cardiomiopatia chagásica crônica. Gonçalves e colaboradores (1986) demonstraram metodologia capaz de induzir experimentalmente uma cardiomiopatia chagásica muito semelhante àquela encontrada em pacientes portadores de CCC, com cardiomiopatia dilatada, inclusive com evidência de aneurisma apical de ventrículo esquerdo em cerca de 45% dos animais. Foi utilizado um procedimento de sensibilização com três inoculações de 1×10^7 formas epimastigotas da cepa PF de *T. cruzi*, com intervalos de 15 dias, com desafio, 30 dias após a última inoculação, com 2×10^4 formas tripomastigotas da cepa Colombiana, em camundongos BALB/c.

O trabalho publicado recentemente por Goldenberg e colaboradores (2008) utilizou um modelo de infecção com tripomastigotas da cepa Brasil de *Trypanosoma cruzi* em camundongos C-129, tendo sido evidenciado, através de ressonância nuclear magnética, dilatação de ventrículo direito, erro padrão acometimento ventricular esquerdo.

A escolha do modelo utilizado no presente trabalho teve como base publicação de Soares e colaboradores, em 2004, em que foram inoculadas tripomastigotas da cepa

Colombiana de *T. cruzi* em camundongos BALB/c e C57BL/6, com a demonstração de significativa redução de infiltrados inflamatórios por apoptose de células inflamatórias no coração, e redução de fibrose intersticial, seis meses após o transplante com células-tronco mononucleares de medula óssea. Neste trabalho, os animais não foram submetidos à avaliação funcional cardíaca.

Em 2006, Rocha e colaboradores publicaram um artigo descrevendo a caracterização da função cardiopulmonar em camundongos C57BL/6 cronicamente infectados por *T. cruzi*, utilizando o modelo de infecção com 100 formas tripomastigotas da cepa Colombiana. Do ponto de vista eletrocardiográfico, este trabalho evidenciou um aumento do intervalo PR e distúrbios no sistema de condução do coração, sendo o BAV de 1º grau relacionado a uma redução na densidade de receptores adrenérgicos β_1 e ao aumento na densidade de receptores muscarínicos M_2 no coração de camundongos chagásicos crônicos quando comparados aos normais. Do mesmo modo, o nosso trabalho foi capaz de demonstrar, com o modelo utilizado, o prolongamento do intervalo PR e a presença de arritmias cardíacas em camundongos chagásicos crônicos. No entanto, quando avaliadas as alterações ecocardiográficas encontradas no trabalho de Rocha e colaboradores, pôde-se observar que foram demonstrados dados compatíveis com disfunção diastólica, erro padrão evidências também de disfunção sistólica ou de dilatação de câmaras cardíacas.

Assim, concluímos que, neste trabalho, foi utilizado, experimentalmente, um modelo de doença de Chagas em que conseguimos reproduzir a forma arritmica da doença, porém não a forma de cardiomiopatia dilatada.

Em relação aos efeitos da terapia celular, quando foram avaliados os dois grupos de animais chagásicos, observou-se que o tratamento com as CTTAs não influenciou o desenvolvimento de arritmias cardíacas e também não propiciou melhora dos parâmetros ergométricos, tendo sido mantida a baixa tolerância ao exercício com a progressão da doença. Entretanto, na avaliação histológica e morfométrica, houve influência da terapêutica instituída, já que os animais do grupo CTTA tiveram redução de inflamação e fibrose.

É possível que os efeitos das CTTAs na redução de fibrose e inflamação sejam devidos à sua propriedade imunomoduladora, já descrita em diversos trabalhos na literatura (revisto por SALEM e THIEMERMANN, 2010). No entanto, o fato de não haver melhora funcional sugere que pode não ter havido uma regeneração do tecido e/ou recuperação do

sistema de condução cardíaco após a utilização desse esquema terapêutico, ao menos nos tempos pós-tratamento avaliados.

No trabalho de Guarita-Souza e colaboradores (2006), ratos Wistar foram infectados com 15×10^4 tripomastigotas, desenvolvendo cardiomiopatia dilatada com disfunção sistólica de ventrículo esquerdo. Estes animais foram transplantados com co-cultura de CTMs e mioblastos esqueléticos, tendo sido observada, já após um mês do transplante, importante melhora da função e diâmetros ventriculares. A utilização de outro tipo celular juntamente com as CTMs torna difícil avaliar o real papel das CTMs neste modelo. É possível que os mioblastos esqueléticos atuem na recolonização das áreas fibróticas, promovendo, assim, a melhora da função cardíaca.

Em relação ao tipo celular utilizado em nosso estudo, algumas vantagens da utilização das células-tronco derivadas de tecido adiposo para o tratamento de doenças cardíacas em relação às de medula óssea já foram descritas anteriormente (revisto por SCHÄFFLER *et al.*, 2007), bem como a sua capacidade de diferenciação em cardiomiócitos (PLANAT-BERNARD *et al.*, 2004; ZHU *et al.*, 2009). Quanto à utilização de células xenogênicas (células humanas em camundongos), estudos prévios já demonstraram a segurança e a potencial eficácia destas células, como o artigo publicado por Cai e colaboradores (2009) em modelo de infarto do miocárdio em ratos. Do mesmo modo, Hwangbo e colaboradores (2010) avaliaram o efeito do transplante de CTTAs humanas em ratos Sprague-Dawley com infarto do miocárdio, com evidência de significativa melhora de função ventricular esquerda.

Em nosso estudo, optamos pela utilização da via intraperitoneal pelo fato de termos evidenciado em estudos anteriores a perda de animais por óbito após a administração de células-tronco mesenquimais por via endovenosa em camundongos. Furlani e colaboradores (2009) avaliaram, por microscopia intravital, a cinética de migração de CTMs humanas após a administração intravascular em camundongos SCID, através de um cateter inserido na aorta abdominal infra-renal. Naquele trabalho, o tamanho das CTMs variou de 16 a 53 μm em suspensão, tendo sido observada interferência na microcirculação sanguínea conforme a densidade celular, com interrupção do fluxo sanguíneo e formação de trombo em arteríolas e vênulas nos animais nos quais foram injetadas as CTMs. Em outro estudo, Gordon e colaboradores (2008) demonstraram o efeito terapêutico da injeção por via intraperitoneal de células-tronco mesenquimais humanas em camundongos com encefalomielite alérgica autoimune. Assim, além de não causar a perda de animais por embolia, estes trabalhos

indicam que a via intraperitoneal de administração pode não comprometer os efeitos destas células.

A análise de um painel de 22 citocinas no soro dos animais mostrou uma correlação entre a infecção e inflamação encontrada nos corações de animais chagásicos crônicos e um aumento da maioria das citocinas avaliadas. Grande parte destas citocinas mostrou uma tendência a/ou um aumento significativo no soro de animais chagásicos controles (tratados com DMEM) quando comparados aos não-infectados. No entanto, não pudemos observar uma clara redução (com significância estatística) após a terapia celular nas citocinas induzidas pela infecção, e em alguns casos, houve até uma tendência ao aumento após a terapia. O parasitismo residual e a inflamação, ainda presente tanto no coração quanto no músculo esquelético, são fatores que podem ter contribuído para a manutenção de concentrações ainda elevadas nos animais tratados, apesar de haver uma redução da inflamação no coração.

De especial interesse, foi observado que as concentrações séricas de IFN γ e TNF α estão significativamente aumentados com a infecção crônica. Soares e colaboradores (2010) demonstraram que corações de camundongos chagásicos crônicos apresentam concentrações destas duas citocinas aumentadas. Alguns estudos indicam a participação de linfócitos Th1 e alta produção de interferon- γ (IFN- γ), semelhante a uma reação de hipersensibilidade tardia, na cardiopatia chagásica crônica (SOARES *et al.*, 2001). A associação entre progressão para formas crônicas graves e alta produção de IFN- γ foi observada em pacientes chagásicos (GOMES *et al.*, 2003). O TNF- α é um fator associado ao desenvolvimento de cardiopatias, e tem sido correlacionado diretamente à disfunção cardíaca e à morte celular em diferentes processos patológicos. Elevadas concentrações de TNF- α estão associadas à hipotensão, ao aumento da permeabilidade vascular e à depressão do miocárdio (SUFFREDINI *et al.*, 1989), e falência cardíaca crônica (LEVINE *et al.*, 1990). Torre-Amione e colaboradores (1996) demonstraram que há uma correlação direta entre as concentrações plasmáticas TNF- α e o grau de falência cardíaca. O fato de estas duas citocinas serem mediadores inflamatórios com papel central na ativação da resposta de macrófagos e linfócitos T, células presentes no infiltrado inflamatório no coração chagásico, reforça uma correlação das concentrações séricas de TNF- α e IFN- γ e a miocardite, assim como a tendência à redução das concentrações de ambas no soro de animais tratados com CTTAs, nos quais a miocardite foi significativamente menor.

Este trabalho teve como principal limitação o modelo utilizado, que até então ainda não havia sido avaliado do ponto de vista ecocardiográfico que tivesse permitido determinar que este não se trata de um modelo de cardiomiopatia dilatada. Deste modo, pode-se concluir que as CTTAs, neste protocolo utilizado, não tiveram influência na evolução da forma arrítmica da doença, porém precisamos usar um modelo com dilatação ventricular para determinar os efeitos da terapia com CTTAs na evolução da forma dilatada da CCC. Estamos iniciando estudos no modelo de indução de cardiomiopatia dilatada chagásica em camundongos utilizando a cepa PF de *T. cruzi* (GONÇALVES *et al.*, 1986).

A outra limitação deste trabalho foi um viés na avaliação da ergometria causado pela presença de inflamação no músculo esquelético observada nos animais chagásicos. Como não foi observada uma disfunção ventricular sistólica para justificar a baixa tolerância ao exercício, consideramos inicialmente que esta poderia ser explicada pela presença de bloqueio atrioventricular de terceiro grau associado a baixo débito cardíaco. No entanto, mesmo nos animais que não apresentaram BAVT, nós observamos um pior desempenho no teste ergométrico, principalmente nos parâmetros de tempo de exercício e distância percorrida, além de claudicação de marcha. Ao avaliar a histologia e a morfometria de secções de músculo esquelético, encontramos uma grande quantidade de células inflamatórias, caracterizando miosite, considerada como fator ortopédico limitante para a progressão do esforço nos animais chagásicos no nosso trabalho. Em outro protocolo, estamos avaliando os efeitos da terapia com baixas doses de benzonidazol na miosite esquelética em camundongos cronicamente infectados por *T. cruzi* submetidos ao transplante com células-tronco mesenquimais cardíacas.

Em resumo, tendo em vista as características do modelo utilizado, este trabalho contribuiu para a avaliação os efeitos da terapia com CTTAs na forma arrítmica da doença de Chagas. Novos estudos poderão servir como base para o desenvolvimento de protocolos, com ajuste da terapia e do modelo experimental, até que possa ser desenvolvida uma abordagem terapêutica suficientemente eficaz, que justifique futuros estudos em pacientes portadores de cardiomiopatia chagásica crônica.

8. CONCLUSÕES / SUMÁRIO DE RESULTADOS

1. O modelo utilizado neste trabalho reproduz a forma arritmica da doença de Chagas, porém não a forma de cardiomiopatia dilatada, com disfunção ventricular.
2. O tratamento com as CTTAs não reduziu a incidência de arritmias cardíacas em camundongos cronicamente infectados pela cepa Colombiana de *T. cruzi*.
3. O tratamento com as CTTAs não melhorou a tolerância ao exercício mensurada através dos parâmetros de ergoespirometria em camundongos cronicamente infectados pela cepa Colombiana de *T. cruzi*.
4. Os animais do grupo CTTA tiveram uma redução de inflamação e fibrose, com valores semelhantes àqueles encontrados em animais não infectados, quando realizada a avaliação histológica e morfométrica.
5. A análise no soro dos animais chagásicos evidenciou um aumento de citocinas em relação aos animais normais, porém não houve evidências de um efeito imunossupressor sistêmico após o transplante de CTTAs.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ-DOLANO, M.; PARDAL, R.; GARCIA-VERDUGO, J.M.; FIKE, J. R.; LEE, H.O.; PFEFFER, K.; LOIS, C.; MORRISON, S. J.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Fusion of bone-marrow derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. **Nature**. V. 425, p. 968-973, 2003.

ANDRADE, Z. A.; ANDRADE, S. G. Pathogenesis of Chagas' chronic myocarditis; importance of ischemic lesions. **Arquivos Brasileiros de Medicina**. v. 45, n. 7-8, p. 279-288, 1955.

ANDRADE, Z. A.; LOPES, E. A. A histochemical study of experimental Chagas' Disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 19, p. 236-242, 1963.

ANDRADE, S. Influence of *Trypanosoma cruzi* strain on the pathogenesis of chronic cardiomyopathy in mice. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, 85:17-27, 1990.

ARAÚJO-JORGE, T.C.; PIRMEZ, C. Capítulo 8: Normas de segurança para o trabalho com *Trypanosoma cruzi*. In: ARAÚJO-JORGE, T. C.; CASTRO, S.L.DE (Org.). **Doença de Chagas – manual de experimentação animal**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, cap. 8, p. 126, 2000.

ASAHARA, T.; MASUDA, H.; TAKAHASSI, T.; KALKA, C.; PASTORE, C.; SILVER, M.; KEARNE, M.; MAGNER, M.; ISNER, J.M. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. **Circulation Research**. v. 85, p. 221-228, 1999.

BALSAM, L. B.; WAGERS, A. J.; CHRISTENSEN, J. L.; KOFIDIS, T.; WEISSMANN, I.L.; ROBBINS, R. C. Haematopoietic stem cells adopt mature fates in ischemic myocardium. **Nature**. v. 428, n. 6983, p. 668-673, 2004.

BARBOSA JUNIOR, A.A.; ANDRADE, Z.A. Identificação do *Trypanosoma cruzi* nos tecidos extracardíacos de portadores de miocardite crônica chagásica. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.17, p. 123-126, 1984.

BESTETTI, R.B.; OLIVEIRA, J.S. The surface electrocardiogram: a simple and reliable method for detecting overt and latent heart disease in rats. **Braz J Med Biol Res.** 23(12):1213-22, 1990.

BESTETTI, R.B.; BRASIL, J.C. F.; BOMBONATO, R. Ventriculectomia parcial esquerda. Resultados atuais, possíveis indicações e perspectivas futuras. **Arq. Bras. Cardiol.** vol. 69, número 5, 1997.

BIANCO, P.; RIMINUCCI, M.; GRONTHOS, S.; ROBEY, P.G. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. **Stem Cells**, 19:180-192, 2001.

BOCCHI, E.A.; FIORELLI, A. The paradox of survival results after heart transplantation for cardiomyopathy caused by *Trypanosoma cruzi*. **The Annals of Thoracic Surgery**. v. 71, n. 6, p. 1833-1838, 2001.

BOYLE, A.J.; McNIECE, I.K.; HARE, J.M. Mesenchymal stem cell therapy for cardiac repair. **Methods Mol Biol.** v. 660, p. 65-84, 2010.

BRAILE, D.M.; GODOY, M. F.; THEVENARD, G.H.; THEVENARD, R.; BRAILE, M. C. V. B.; LEAL, J. C. F.; SCHALDACK, M. Cardiomioplastia dinâmica: resultados clínicos a longo prazo em pacientes com cardiomiopatia dilatada. **Ann Thorac Surg.** 69:1445-1447, 2000.

BRENER, Z. **Life cycle of Trypanosoma cruzi**. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 13:171-178, 1971.

BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**. 2ª Edição. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, p. 75-87, 2000.

BRITO, M. C. M. Informe Técnico: Gerenciamento do Risco Sanitário na Transmissão de Doença de Chagas Aguda por Alimentos. **Ofício circular 33/2008 – GQ TSA/GGALI/ANVISA**.

BUSCAGLIA, C. A.; DI NOIA, J. M. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. **Microbes Infect.** v. 5, p. 419-427, 2003.

BUSTAMANTE, J. M.; RIVAROLA, H. W.; FERNANDEZ, A. R. *et al.* Trypanosoma cruzi reinfections in mice determine the severity of cardiac damage. **International Journal for Parasitology**, v. 32, 889–896, 2002.

BUSTAMANTE, J. M.; RIVAROLA, H. W.; FERNANDEZ, A. R. *et al.* Trypanosoma cruzi reinfections provoke synergistic effect and cardiac b-adrenergic receptors dysfunction in the acute phase of experimental Chagas disease. **Experimental Parasitology**, v. 103, 136–142, 2003.

BUSTAMANTE, J. M.; RIVAROLA, H. W.; FERNANDEZ, A. R. *et al.* Indeterminate Chagas' disease: *Trypanosoma cruzi* strain and re-infection are factors involved in the progression of cardiopathy. **Clin. Sci** . v. 104(4):415-20, 2003.

BUSTAMANTE, J. M.; RIVAROLA, H. W. *et al.* Reinfections and *Trypanosoma cruzi* strains can determine the prognosis of the chronic chagasic cardiopathy in mice. **Parasitol. Res.** v. 100(6):1407-10, 2007.

CAI, L.; JOHNSTONE, B.H.; COOK, T.G.; TAN, J.; FISHBEIN, M.C.; CHEN, P.S.; MARCH, K.L. IFATS collection: Human adipose tissue-derived stem cells induce

angiogenesis and nerve sprouting following myocardial infarction, in conjunction with potent preservation of cardiac function. **Stem cells**. v. 27 (1), p. 230-7, 2009.

CALDAS, I. S.; TALVANI, A.; CALDAS, S.; CARNEIRO, C.M.; LANA, M.; GUEDES, P.M.M.; BAHIA, M.T. Benznidazole therapy durante acute phase of Chagas disease reduces parasite load but does not prevent chronic cardiac lesions. **Parasitol Res**. v. 103, p. 413-421, 2008.

CAMPOS DE CARVALHO, A.C.; GOLDENBERG, R.C.S.; JELICKS, L.A.; SOARES, M.B.P.; DOS SANTOS, R.R.; SPRAY, D.C.; TANOWITZ, H.B. Cell Therapy in Chagas Disease. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**. v. 1, p. 1-6, 2009.

CANÇADO, J. R. Criteria of Chagas Disease Cure. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 331-335, 1999.

CARCANVALLO, R. U.; JURBERG, J.; LENT, H; GALVÃO, C; STEINDEL, M.; PINTO, C.J.C. Nova espécie do complexo oliveirai (Nova denominação para o complexo matogrossensis) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 96 p. 71-79, 2001.

CHEN, S.; LIU, Z.; TIAN, N.; ZHANG, J.; YEI, F.; DUAN, B.; ZHU, Z.; LIN, S.; KWAN, T.W. Intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells for ischemic cardiomyopathy due to isolated chronic occluded left anterior descending artery. **J Invasive Cardiol**. Nov;18(11):552-6, 2006.

CHOI, S.J.; KIM, J.K.; HWANG, S.D. Mesenchymal stem cell therapy for chronic heart failure. **Expert Opin Biol Ther**. v. 10 (8), p. 1217-26, 2010.

COURA, J. R.; DIAS, J. P. C. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease – 100 years after its discovery. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 31-40, 2009.

DE CARVALHO, A.C.; MASUDA, M.O.; TANOWITZ, H. B.; WITTNER, M.; GOLDENBERG, R.C.; SPRAY, D.C. Conduction defects and arrhythmias in Chagas' disease:

possible role of gap junctions and humoral mechanisms. **J. Cardiovasc. Electrophysiol.** v.5, p. 686-698, 1994.

DIAS, J. P. C.; SILVEIRA, A.C.; SCHOFIELD, C. J. The Impact of Chagas Disease Control in Latin America – a Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 97, p. 603-612, 2002.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D.J.; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy.** 8(4):315-7, 2006.

ENGMAN, D.M.; LEON, J.S. Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity. **Acta Trop.** v. 81, p. 123-132, 2002.

FABRINO, D.; LEON, L.; PARREIRA, G. *et al.* Peripheral blood monocytes show morphological pattern of activation and decreased nitric oxide production during acute Chagas' disease in rats. **Nitric Oxide.** 11: 166-74, 2004.

FEDERICI, E.E.; ABELMANN, W.B.; NEVA, F.A. Chronic and progressive myocarditis in C3H mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Am J Trop Med Hyg.** v. 13, p. 272-280, 1964.

FURLANI, D.; UGURLUCAN, M.; ONG, L.; BIEBACK, K.; PITTERMAN, E.; WESTIEN, I.; WANG, W.; YEREBAKAN, C.; LI, W.; GAEBEL, R.; LI, R.; VOLLMAR, B.; STEINHOFF, G.; MA, N. Is the intravascular administration of mesenchymal stem cells safe? Mesenchymal stem cells and intravital microscopy. **Microvascular Research.** v. 77, p. 370-376, 2009.

GALMICHE, M.C.; KOTELIANSKY, V.E.; BRIERE, J.; HERVE, P.; CHARBORD, P. Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. **Blood,** 82(1):66-76, 1993.

GARCIA, S.; RAMOS, C.; SENRA, J. *et al.* Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 49, 1521–1528, 2005.

GASCÓN, J.; ALBAJAR, P. *et al.* Diagnosis, Management, and Treatment of Chronic Chagas' Heart Disease in Areas Where *Trypanosoma cruzi* Infection is Not Endemic. **Rev Esp Cardiol.** v. 60 (3):285-93, 2007.

GIMBLE, J.M.; KATZ, A.J.; BUNNELL, B.A. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. **Circ Res.** v. 100, p. 1249 –1260, 2007.

GIRONES, N.; FRESNO, M. Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both? **Trends in Parasitology.** v. 19 N°1, Janeiro, 2003.

GNECCHI, M.; HE, H.; LIANG, O.D.; MELO, L.G.; MORELLO, F.; MU, H.; NOISEUX, N.; ZHANG, L.; PRATT, R.E.; INGWALL, J.S.; DZAU, V.J. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. **Nat Med.**v.11, p. 367-8, 2005.

GOLDENBERG, R.C.S.; JELICKS, L. A.; FORTES, F. S. A.; WEISS, L.M.; ROCHA, L.L.; ZHAO, D.; CAMPOS-DE-CARVALHO, A.C.; SPRAY, D.C.; TANOWITZ, H.B. Bone marrow cell therapy ameliorates and reverses chagasic cardiomyopathy in a mouse model. **The Journal of Infectious Diseases.** v. 197, n. 4, p. 544-547, 2008.

GOMES, J.A.; BAHIA-OLIVEIRA, L.M.; ROCHA, M.O.; MARTINS-FILHO, O.A.; GAZZINELLI, G.; CORREA-OLIVEIRA, R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. **Infect Immun.** v. 71(3), p. 1185-93, 2003.

GONÇALVES, S.; ROSSI, M. A.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. **Pathogenesis of the apical aneurysm in experimental *Trypanosoma cruzi* cardiomyopathy in BALB/c mice.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. v. 80, p. 990, 1986.

GORDON, D.; PAVLOVSKA, G.; GLOVER, C.P.; UNEY, J.B.; WRAITH, D.; SCOLDING, N.J. Human mesenchymal stem cells abrogate experimental allergic encephalomyelitis after intraperitoneal injection, and with sparse CNS infiltration. **Neurosci Lett.** v. 448(1), p. 71-3, 2008.

GUARITA-SOUZA, L.C.; CARVALHO, K.A.T.; WOITOWICZ, V. Simultaneous autologous transplantation of cocultured mesenchymal stem cells and skeletal myoblasts improves ventricular function in a murine model of Chagas disease. **Circulation.** v. 114, p. 1120-1124, 2006.

GUO, Y.; LUBBERT, M.; ENGELHARDT, M. CD34⁺ hematopoietic stem cells: current concepts and controversies. **Stem Cells.** v. 21, p. 15-20, 2003.

HACKETT, T.L.; KNIGHT, D.A.; SIN, D.D. Potential role of stem cells in management of COPD. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.** v. 5, p. 81-88, 2010.

HAN, W.; YU, Y.; LIU, X.Y. Local signals in stem cell-based bone marrow regeneration. **Cell Research.** v. 6, p. 189-195, 2006.

HIGUCHI, M.L.; BENVENUTI, L. A.; MARTINS REIS, M.; METZGER, M. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. **Cardiovasc. Res.** v.60, p. 96-107, 2003.

HWANGBO, S.; KIM, J.; CHO, H.; LEE, J. Therapeutic potential of human adipose stem cells in a rat myocardial infarction model. **Yonsei Med J.** v. 51 (1), p. 69-76, 2010.

IANNI, B.M.; MADY, C. A forma indeterminada da doença de Chagas. Mito e fatos. **Arq Bras Cardiol.** 68:147-8. 1997.

JACKSON, K.A.; MAJKA, S.M.; WANG, H.; POCIUS, J.; HARTLEY, C.J.; MAJESKY, M.W.; ENTMAN, M.L.; MICHAEL, L.H.; HIRSCHI, K.K.; GOODELL, M.A. Regeneration

of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. **J Clin Invest**, 107:1395-1402, 2001.

JONES, E.M.; COLLEY, D.G.; TOSTES, S., LOPES, E. R.; VNENCAK-JONES, C.L.; MCCURLEY, T. L. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequences from inflammatory lesions human chagasic cardiomyopathy. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 48, p. 348-357, 1993.

KATRITSIS, D.G.; SOTIROPOULOU, P.A.; KARVOUNI, E.; KARABINOS, I.; KOROVELIS, S.; PEREZ, S.A.; VORIDIS, E.M.; PAPAMICHAIL, M. Transcoronary transplantation of autologous mesenchymal stem cells and endothelial progenitors into infarcted human myocardium. **Catheter Cardiovasc Interv.** Jul;65(3):321-9, 2005.

KIERSZENBAUM, F. Where do we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease? **Trends in Parasitology.** v. 21, p. 513-516, 2005.

KINNAIRD, T.; STABILE, E.; BURNETT, M.S.; SHOU, M.; LEE, C.W.; BARR, S.; FUCHS, S.; EPSTEIN, S.E. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. **Circulation.** v.109, p. 1543-9, 2004.

KIROUAC, D.C.; MADLAMBAYAN, G.J.; YU, M.; SYKES, E.A.; ITO, C.; ZANDSTRA, P.W. Cell-cell interaction networks regulate blood stem and progenitor cell fate. **Mol Syst Biol.** v. 5, p. 1-20, 2009.

KOBERLE, F. Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. **Adv. Parasitol.** v. 6, p. 63-116, 1968.

KOCHER, A.A.; SCHUSTER, M.D.; SZABOLCS, M.J; AKUMA, S.; BURKHOFF, D.; WANG, J.; HOMMA, S.; EDWARDS, N.M.; ITESCU, S. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. **Nat Med.** 7:430-436, 2001.

KOPEN, G.C.; PROCKOP, D.J.; PHINNEY, D.G. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. **Proc Natl Acad Sci USA**. 96:10711-16, 1999.

LARSEN, K.H.; ANDERSEN, T. E.; KASERRO PADRÃO, M. Bone and cartilage repair using stem cells. **Ugeskr Laeger**. v. 172 (38), p. 2616-9, 2010.

LE BLANC, K.; TAMMIK, L.; SUNDBERG, B. *et al.* Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. **Scand J Immunol**. v. 57, p. 11–20, 2003.

LEE, K.D.; KUO, T.K.; WHANG-PENG, J.; CHUNG, Y.F.; LIN, C.T.; CHOU, S.H.; CHEN, J.R.; CHEN, Y.P.; LEE, O.K. *In vitro* hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Hepatology**, 40(6):1275-84, 2004.

LEVINE B, KALMAN J, MAYER L, FILLIT HM, PACKER M. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. **N Engl J Med**. v. 323(4), p. 236-41, 1990.

LI, L.; ZHANG, S.; ZHANG, Y.; YU, B.; XU, Y.; GUAN, Z.Z. Paracrine action mediate the antifibrotic effect of transplanted mesenchymal stem cells in a rat model of global heart failure. **Mol Biol Rep**. v.36, p. 725-731, 2009.

LO PRESTI, M. S.; BUSTAMANTE, J. M.; RIVAROLA, H. W.; FERNANDEZ, A. R. *et al.* Changes in the cardiac h-adrenergic system provoked by different *T. cruzi* strains. **Int. J. Cardiol**. v. 111, 104 – 112, 2006.

MACAMBIRA, S.G.; VASCONCELOS, J. F.; COSTA, C.R.; KLEIN, W.; LIMA, R. S.; GUIMARÃES, P.; VIDAL, D. T.; MENDEZ, L. C. RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; SOARES, M. B.P. Granulocyte colony-stimulating factor treatment in chronic Chagas disease: preservation and improvement of cardiac structure and function. **FASEB Journal**. v. 11, p. 3843-50, 2009.

MACEDO, A.M.; MACHADO, C. R.; OLIVEIRA, R. P.; PENA, S. D. J. *Trypanosoma cruzi*: Genetic Structure of Populations and Relevance of Genetic Variability to the Pathogenesis of Chagas Disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 99, p. 1-12, 2004.

MADONNA, R.; GENG, Y-J.; DE CATERINA, R. Cardiovascular Repair Adipose Tissue-Derived Stem Cells: Characterization and Potential for Cardiovascular Repair. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. v. 29, p. 1723-1729, 2009.

MADONNA, R.; DE CATERINA, R. Adipose tissue: a new source of cardiovascular repair. **J Cardiovasc Med**. v. 11 (2), p. 71-80, 2010.

MADONNA, R.; WILLERSON, J.T.; GENG, Y.J. Myocardin a enhances telomerase activities in adipose tissue mesenchymal cells and embryonic stem cells undergoing cardiovascular myogenic differentiation. **Stem Cells**. v. 26, p. 202–211, 2008.

MADY, C.; SALEMI, V.; IANNI, B.; RAMIRES, F.; ARTEAGA, E. Capacidade funcional Máxima, Fração de ejeção e Classe Funcional na Cardiomiopatia Chagásica. Existe relação entre esses índices? **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. N. 2. Vol. 84, 2005.

MAKINO, S.; FUKUDA, K.; MIYOSHI, S.; KINISHI, F.; KODAMA, H.; PAN, J.; SANO, M.; TAKAHASHI, T.; HORI, S.; ABE, H.; HATA, J.; UMEZAWA, A.; OGAWA, S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. **J Clin Invest**. v. 103, p. 697-705, 1999.

MANGI, A. A.; NOISEUX, N.; KONG, D. et al. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. **Nature Medicine**. v. 9, n. 9, p. 1195-1201, 2003.

MARIN-NETO, J. A.; SIMÕES, M.V.; MACIEL, B.C. Specific diseases: cardiomyopathies and pericardial diseases. Other cardiomyopathies. In: YUSUF, S.; CAIRNS, J.; CAMM, J.;

FALLEN, E.; GERSH, B.J., eds. **Evidence Based Cardiology**. London, GB: BMJ Books, Brit Med Association. 744-61, 1998.

MARIN-NETO, J. A.; SIMÕES, M.V.; SARABANDA, A.V.L. Cardiopatia Chagásica. **Arq Bras Cardiol**. v. 72, p. 247-263, 1999.

MARIN-NETO, J. A.; RASSI, A. Jr.; MORILLO, C.A.; AVEZUM, A.; CONNOLLY, S.J.; SOSA-ESTANI, S.; ROSAS, F., YUSUF, S.; BENEFIT Investigators. Rationale and design of a randomized placebo-controlled trial assessing the effects of etiologic treatment in Chagas' cardiomyopathy: the BENznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT). **AM Heart J**. 156 (1): 37-43, 2008.

MELO, R.; BRENER, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. **The Journal of Parasitology**. 64(3):475-82, 1978.

MELO, R.; FABRINO, D.; D'AVILA, H. *et al.* Production of hydrogen peroxide by peripheral blood monocytes and specific macrophages during experimental infection with *Trypanosoma cruzi* in vivo. **Cell Biology International**, 27: 853-61, 2003.

MOIA, B.; ROSENBAUM, M.B. The electrocardiogram in chronic Chagas' myocarditis. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v. 13, p. 236-243, 1960.

MURRY, C.E.; SOONPAA, M.H.; REINECKE, H.; NAKAJIMA, H.; NAKAJIMA, H.O.; RUBART, M.; PASUMARTHI, K.B.S.; VIRAG, J.J.; BARTELMEZ, S. H.; POPPA, V.; BRADFORD, G.; DOWELL, J. D.; WILLIAMS, D.A.; FIELD, L.J. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. **Nature**. v. 428, p. 664-668, 2004.

NYGREN, J. M.; JOVINGE, S.; BREITBACH, M. *et al.* Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. **Nature Medicine**. v. 10, n. 5, p. 494-501, 2004.

NOBRE, F.; SERRANO, JR. C. **Tratado de Cardiologia. SOCESP.** Manole. 1ª edição. 2005.

NOGUEIRA, R.C. Isolamento, caracterização e análise da estabilidade citogenética após expansão in vitro de células tronco mesenquimais derivadas do epitélio amniótico, tecido adiposo e polpa de dente decíduo humano. **Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – Universidade Estadual de Feira de Santana, 2009.**

OLIVAREZ-VILLAGOMEZ, D.; MCCURLEY, T.L.; VNENCAK-JONES, C.L.; CORREA-OLIVEIRA, R.; COLLEY, D.G.; CARTER, C.E. Polymerase chain reaction amplification of three different *Trypanosoma cruzi* DNA sequences from huma chagasic cardiac tissue. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.59, p. 563-570, 1998.

OLIVEIRA, S.; MELO DE OLIVEIRA, J.; FREDERIGUE, U. *et al.* Apical aneurysm of Chagas's heart disease. **Heart.** 46;432-437, outubro 1981.

ORLIC, D.; KAJSTURA, J.; CHIMENTI, S.; JAKONIUK, I.; ANDERSON, S.M.; LI, B.; PICKEL, J.; MCKAY, R.; NADAL-GINARD, B.; BODINE, D.M.; LERI, A.; ANVERSA, P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. **Nature**, 410:701-705, 2001.

ORLIC, D.; KAJSTURA, J.; CHIMENTI, S.; BODINE, D.M.; LERI, A.; ANVERSA, P. Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. **Annals of the New York Academy of Sciences.** v. 938, p 221-230, 2001.

ORLIC, D.; HILL, J.M.; ARAI, A.E. Stem Cells for Myocardial Regeneration. **Circ. Res.** 91: 1092-1102, 2002.

PALOMINO, S. A.P.; AIELLO, V.D.; HIGUCHI, M.L. Systematic mapping of hearts from chronic chagasic patients: the association between the occurrence of histopathological lesions and *Trypanosoma cruzi* antigens. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** v. 9, p. 571-579, 2000.

PERIN, E.C.; DOHMANN, H.F.; BOROJEVIC, R.; SILVA, S.A.; SOUSA, A.L.; MESQUITA, C.T.; ROSSI, M.I.; CARVALHO, A.C.; DUTRA, H.S.; DOHMANN, H.J.; SILVA, G.V.; BELEM, L.; VIVACQUA, R.; RANGEL, F.O.; ESPORCATTE, R.; GENG, Y.J.; VAUGHN, W.K.; ASSAD, J.A.; MESQUITA, E.T.; WILLERSON, J.T. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. **Circulation**, 107:2294-2302, 2003.

PITTENGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C.; JAISWAL, R.K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J.D.; MOORMAN, M.A.; SIMONETTI, D.W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, 284 (5411):143-147, 1999.

PLANAT-BENARD, V.; MENARD, C.; ANDRE, M.; PUCEAT, M.; PEREZ, A.; GARCIA-VERDUGO, J.M.; PENICAUD, L.; CASTEILLA, L. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. **Circ Res.** v. 94, p. 223–229, 2004.

PONTES-DE-CARVALHO, L.; SANTANA, C. C.; SOARES, M.B.P.; OLIVEIRA, G.G.; CUNHA-NETO, E.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. Experimental chronic Chagas' disease myocarditis is an autoimmune disease preventable by induction of immunological tolerance to myocardial antigens. **J. Autoimmun.** v. 18, p. 131-138, 2002.

POSTAN, M.; DVORAK, J. A.; MCDANIEL, J. P. Studies of *Trypanosoma Cruzi* Clones in Inbred Mice: A Comparison of the Course of Infection of C3H/HEN- Mice with Two Clones Isolated from a Common Source* **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 32, n. 3, p. 497-506, 1983.

POULSOM, R.; ALISON, M. R.; FORBES, S. J.; WRIGHT, N. A. Adult stem cell plasticity. **Journal of Pathology.** v. 197, p. 441-456, 2002.

RASSI JR, A.; RASSI, A; MARIN-NETO, J.A. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 152-158, 2009.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J.A. Chagas disease. **Lancet**, 17 abril; 375 (9723):1388-402, 2010.

ROCHA, N.N.; GARCIA, S.; GIMÉNEZ, L.E.D.; HERNÁNDEZ, C.C. Q.; SENRA, J. F. V.; LIMA, R.S.; CYRINO, F.; BOUSKELA, E.; SOARES, M.B.P.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; CAMPOS-DE-CARVALHO, A.C. Characterization of cardiopulmonary function and cardiac muscarinic and adrenergic receptor density adaptation in C57BL/6 mice with chronic *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitology**, v. 133, p. 729-737, 2006.

ROSENBAUM, M.; ALVAREZ, A. J. The electrocardiogram in chronic chagasic myocarditis. **American Heart Journal**. v. 50, n. 4, p. 492-527, 1955.

ROSENBAUM, M. Chagasic myocardopathy. **Prog. Cardiovasc. Dis.** 7:199–225, 1964.

ROTTMAN, J.N.; NI, G.; BROWN, M. Echocardiographic evaluation of ventricular function in mice. **Echocardiography**. Jan;24(1):83-9, 2007.

SALEM, H.K.; THIEMERMANN. Mesenchymal Stromal Cells: Current Understanding and Clinical Status. **Stem Cells**. v. 28, p. 585-596, 2010.

SALVATELLA, R. Current Status of Chagas Disease. **Pan American Health Organization**. Washington DC, USA, 2006.

SAMUDIO, M.; MONTENEGRO-JAMES, S.; DE CABRAL, M. *et al.* Differential expression of systemic cytokines profiles in Chagas' disease is associated with endemicity of *Trypanosoma cruzi* infections. **Acta Trop.**, v. 69, n. 2, p. 89-97, 1998.

SATO, Y.; ARAKI, H.; KATO, J.; NAKAMURA, K.; KAWANO, Y.; KOBUNE, M.; SATO, T.; MIYANISHI, K.; TAKAYAMA, T.; TAKAHASHI, M.; TAKIMOTO, R.; IYAMA, S.; MATSUNAGA, T.; OHTANI, S.; MATSUURA, A.; HAMADA, H.; NIITSU, Y. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. **Blood**, 106(2): 756-63, 2005.

SCHÄFFLER, A.; BÜCHLER, C. Concise Review: Adipose Tissue-Derived Stromal Cells—Basic and Clinical Implications for Novel Cell-Based Therapies. **Stem Cells**. V. 25, p. 818-827, 2007.

SCHOFIELD, C.J.; DIAS, J.C.P. A cost benefit analysis of Chagas disease control. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 86:285-295, 1991.

SCHOFIELD, C.J.; JANNIN, J.; SALVATELLA, R. The future of Chagas disease control. **Trends in Parasitology**. v. 22, p. 583-588, 2006.

SHARMA, S.; GURUDUTTA, G.U.; SATIJA, N.K.; PATI, S.; AFRIN, F.; GUPTA, P.; VERMA, Y.K.; SINGH, V.K.; TRIPATHI, R.P. Stem Cell c-Kit and HOXB4 Genes: Critical Roles and Mechanisms in Self-Renewal, Proliferation and Differentiation. **Stem Cells and Development**. v. 15, p. 755-778, 2006.

SILVA, C.; FERREIRA, L.; MONACO, C.; GIL M.; PEIXOTO, L.; LEAL, S.; CORDOVIL, A.; ORTIZ, J. **O Ecocardiograma no Apoio à Decisão Clínica**. Revinter, 3ª edição. 2003.

SILVA, J.; VESPA, G.; CARDOSO, M. *et al.* Tumor necrosis factor alpha mediate resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. **Infection and Immunity**, 63: 4862-4867, 1995.

SOARES, M. B. P.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. **An. Acad. Bras. Cienc.** v. 73, p. 547-559, 2001.

SOARES, M. B. P.; SILVA-MOTA, K. N.; LIMA, R. S.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. *et al.* Modulation of chagasic cardiomyopathy by interleukin-4: dissociation between inflammation and tissue parasitism. **Am. J. Pathol.**, v.159:703–709, 2001.

SOARES, M.B.; DE LIMA, R.S.; ROCHA, L.L.; VASCONCELOS, J.F.; ROGATTO, S.R.;

DOS SANTOS, R.R.; IACOBAS, S.; GOLDENBERG, R.C.; IACOBAS, D.A.; TANOWITZ, H.B.; DE CARVALHO, A.C.; SPRAY, D.C. Gene expression changes associated with myocarditis and fibrosis in hearts of mice with chronic chagasic cardiomyopathy. **J Infect Dis.** v. 202(3):416-26, 2010.

SOARES, M.B. P.; DE LIMA, R.S.; ROCHA, L.L.; TAKYIA, C.M.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; DE CARVALHO, A.C.C.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. Transplanted bone marrow cells repair heart tissue and reduce myocarditis in chronic chagasic mice. **Am J Pathol.** 164(2):441-7, 2004.

SOARES, M.B.P.; GARCIA, S.; DE CARVALHO, A.C.C.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. Cellular therapy in Chagas' disease: potential applications in patients with chronic cardiomyopathy. **Regenerative Medicine**, v. 2, p. 257-264, 2007.

SOARES, M.B.P.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. Current status and perspectives of cell therapy in Chagas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 325-332, 2009.

SOONPAA, M.H.; DAUD, A. I.; KOH, G. Y. et al. Potential approaches for myocardial regeneration. **Annals of the New York Academy of Sciences.** v. 752, p. 446-454, 1995.

SOUZA, B.S.F.; NOGUEIRA, R.C.; OLIVEIRA, S. A.; FREITAS, L. A. R.; LYRA, L.G.C.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; LYRA, A.C.; SOARES, M.B.P. Current Status of Stem Cell Therapy for Liver Diseases. **Cell Transplantation.** v. 18, p. 1261-1279, 2009.

STAMM, C.; WESTPHAL, B.; KLEINE, H.D.; PETZSCH, M.; KITNER, C.; KLINGE, H.; SCHUMICHEN, C.; NIENABER, C.A.; FREUND, M.; STEINHOFF, G. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. **Lancet**, 361:45-46, 2003.

STRAUER, B.E.; BREHM, M.; ZEUS, T.; KOSTERING, M.; HERNANDEZ, A.; SORG, R.V.; KOGLER, G.; WERNET, P. Repair of Infarcted Myocardium by Autologous

Intracoronary Mononuclear Bone Marrow Cell Transplantation in Humans. **Circulation**, v. 106, p. 1-6, 2002.

STYPMANN, J. Doppler ultrasound in mice. **Echocardiography**. Jan; 24(1):97-112, 2007.

SUFFREDINI, A.F.; FROMM, R.E.; PARKER, M.M.; BRENNER, M.; KOVACS, J.A.; WESLEY, R.A.; PARRILLO, J.E. The cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin. **N Engl J Med**. v. 321(5):280-7, 1989.

TAKAHASHI, K. & YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**. v. 126, p. 663 – 676, 2006.

TAKAHASHI, K.; TANABE, K.; OHNUKI, M.; NARITA, M.; ICHISAKA, T.; TOMODA, K. & YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell**. v. 131, p. 861 – 872, 2007.

TANOWITZ, H.; KIRCHHOFF, L.V.; SIMON, D.; MORRIS, S. A.; WEISS, L. M.; WITTNER, M. Chagas' disease. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 5, n. 4, p. 400-419, 1992.

TOMITA, S.; LI, R. K; WEISEL, R. D. et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. **Circulation**. v. 100, supp. 19, p. II247 – II256, 1999.

TORRE-AMIONE, G.; KAPADIA, S.; LEE, J.; DURAND, J.B.; BIES, R.D.; YOUNG, J.B.; MANN, D.L. Tumor necrosis factor-alpha and tumor necrosis factor receptors in the failing human heart. **Circulation**. v. 93(4):704-11, 1996.

TURA, B.R.; MARTINO, H.F.; GOWDAK, L.H.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; DOHMANN, H.F.; KRIEGER, J.E.; FEITOSA, G.; VILAS-BOAS, F.; OLIVEIRA, S.A.; SILVA, S.A.; BOZZA, A.Z.; BOROJEVIC, R.; DE CARVALHO, A.C. Multicenter randomized trial of cell therapy in cardiopathies - MiHeart Study. **Trials**. 8:2, 2007.

UCCELLI, A.; PISTOIA, V.; MORETTA, L. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? **Trends Immunol.** May;28(5):219-26, 2007.

URBINA, J.A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends in Parasitology*. v. 19, p. 495-501, 2003.

VAN DIJK, A.; NIESSEN, H.W.; ZANDIEH DOULABI, B.; VISSER, F.C.; VAN MILLIGEN, F.J. Differentiation of human adipose-derived stem cells towards cardiomyocytes is facilitated by laminin. **Cell Tissue Res.** 2008.

VILAS-BOAS, F.; FEITOSA, G.S.; SOARES, M. B. P.; PINHO-FILHO, J.A.; MOTA, A.; ALMEIDA, A.J.; CARVALHO, C.; DE CARVALHO, H.G.; DE OLIVEIRA, A.D.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. Bone marrow cell transplantation to the myocardium of a patient with heart failure due to Chagas' disease. **Arq Bras Cardiol.** 82(2):185-7, 2004.

VILAS-BOAS, F.; FEITOSA, G.S.; SOARES, M. B. P.; PINHO-FILHO, J.A.; MOTA, A.; ALMEIDA, A.J.; CARVALHO, C.; DE CARVALHO, H.G.; ANDRADE, M.V.; DE OLIVEIRA, A.D.; 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.** 87(2):159-66, 2006.

VILQUIN, J.T.; ROSSET, P. Mesenchymal stem cells in bone and cartilage repair: current status. **Regen Med.** 1(4):589-604, 2006.

WATT, F. M.; DRISKELL, R.R. The therapeutic potential of stem cells. **Phil Trans R Soc B.** v. 365, p. 155-163, 2010.

WATT, F. M.; HOGAN, B.L.M. Out of Eden: Stem Cells and Their Niches. **Science.** v. 287, p. 1427-1430, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of Chagas disease. Geneva: World Health Organization (Technical Report Series, 905), 2002.

ZACKS, M.; WEN, J.; VYATKINA, G. *et al.* An overview of chagasic cardiomyopathy: pathogenic importance of oxidative stress. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.77, 695-715, 2005.

ZHANG, D.Z.; GAI, L.Y.; LIU, H.W.; JIN, Q.H.; HUANG, J.H.; ZHU, X.Y. Transplantation of autologous adipose-derived stem cells ameliorates cardiac function in rabbits with myocardial infarction. **Chin Med J (Engl)**. v. 120(4), p. 300-7, 2007.

ZHANG, X.; WANG, H.; MA, X.; ADILA, A.; WANG, B.; LIU, F.; CHEN, B.; WANG, C.; MA, Y. Preservation of the cardiac function in infarcted rat hearts by the transplantation of adipose-derived stem cells with injectable fibrin scaffolds. **Exp Biol Med (Maywood)**. v. 235(12), p.1505-15, 2010.

ZHU, Y.; LIU, T.; SONG, K.; NING, R.; MA, X.; CUI, Z. ADSCs differentiated into cardiomyocytes in cardiac microenvironment. **Mol Cell Biochem**. v. 324, p. 117-129, 2009.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, J. W.; KATZ, A.J.; BENHAIM, P.; LORENZ, H. P.; HEDRICK, M.H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Eng**. v. 7, p. 211-228, 2001.