

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Dôuglas Caixeta Nunes

**CARACTERÍSTICAS FUNCIONAIS DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS
CARDÍACAS NA CARDIOMIOPATIA TÓXICA HIPERADRENÉRGICA EM RATOS**

Uberaba, MG

2021

Dôuglas Caixeta Nunes

**CARACTERÍSTICAS FUNCIONAIS DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS
CARDÍACAS NA CARDIOMIOPATIA TÓXICA HIPERADRENÉRGICA EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, área de concentração I: Bioquímica, Fisiologia e Farmacologia, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Valdo José Dias Da Silva

Coorientadora: Prof.^a Dra. Thaís Soares Farnesi De Assunção

Uberaba, MG

2021

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

N924c Nunes, Dôuglas Caixeta
Características funcionais de células tronco mesenquimais
cardíacas na cardiomiopatia tóxica hiperadrenérgica em ratos /
Dôuglas Caixeta Nunes. -- 2021.
46 f. : il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universi-
dade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2021
Orientador: Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Thaís Soares Farnesi De Assunção

1. Cardiopatias. 2. Células-tronco mesenquimais. 3. Isoprotere-
nol. 4. Unidades formadoras de colônias. I. Silva, Valdo José Dias
da. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616.12

DÔUGLAS CAIXETA NUNES

**CARACTERÍSTICAS FUNCIONAIS DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS
CARDÍACAS NA CARDIOMIOPATIA TÓXICA HIPERADRENÉRGICA EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, área de concentração I: Bioquímica, Fisiologia e Farmacologia, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Valdo José Dias Da Silva

Coorientadora: Prof.^a Dra. Thaís Soares Farnesi De Assunção

Aprovado em: 17 de junho de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Valdo José Dias Da Silva – Orientador
Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)

Prof. Dr. Octávio Barbosa Neto
Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)

Prof.^a Dra. Poliana Rodrigues Alves Duarte
Universidade Federal de Goiás (UFG)

Dedico este trabalho aos meus pais, irmãos e aos poucos e verdadeiros amigos conquistados ao longo de toda minha vida. Sem vocês, indubitavelmente, eu não vivenciaria esta importante conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, pela saúde, pela força, pela proteção, pela felicidade, pelo aprendizado diário, pelas amizades e por tudo que Tens me dado, inclusive pelos momentos difíceis, os quais eu tento extrair muitos ensinamentos. “A gratidão é o único tesouro dos humildes”. *William Shakespeare*.

Um agradecimento muito especial aos meus amados familiares, meus pais, Lázaro Nunes e Maria Do Carmo Caixeta Nunes, e meus irmãos, Dênis Pedro Nunes, David De Castro Nunes e Daniel Caixeta Nunes, pelo amor incondicional, pelo apoio constante, pelo sacrifício financeiro e emocional, pela estrutura familiar que me orientará por toda a vida. A distância é dolorosa, mas a vontade de crescer e superar os desafios a sobrepõe. Sou eternamente grato a vocês! Lembrem-se: “A distância faz ao amor aquilo que o vento faz ao fogo: apaga o pequeno, inflama o grande”. *Roger Bussy-Rabutin*.

Agradeço aos meus infundáveis amigos, Helvécio Marangon Júnior, Maria Helena Peres e Alan Carlos Da Fonseca pela amizade, carinho e companheirismo. Esta caminhada seria muito árdua sem o apoio de vocês. Obrigado por tudo!

É impossível deixar de agradecer ao orientador prof. Dr. Valdo José Dias Da Silva, por ser um exemplo de ser humano, professor e profissional. Sem as suas orientações e seus ensinamentos diários, o sonho em tornar Mestre em Ciências Fisiológicas, seria inatingível. Muito obrigado!

A Elisabete Perez Caramori Ambrosio, querida “Bete”, que não mede esforços para ajudar a todos alunos, professores e funcionários. Muito obrigado por contribuir na formação de todos com muita maestria e dedicação.

Obrigado a Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), representada pelo corpo docente, discente, técnicos e demais funcionários. A aquisição de conhecimentos e ensinamentos são a maior herança que um ser humano pode possuir. A obtenção do título de mestre por esta universidade de extrema qualidade é uma satisfação indecifrável da minha parte. Obrigado a toda instituição por ter contribuído para que este momento seja concretizado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior –Brasil (CAPES) -Código de Financiamento 001.

Por fim, um agradecimento cordial a todos os colegas, amigos, alunos e funcionários do laboratório de Fisiologia, do laboratório de Histologia e a disciplina de patologia da UFTM, por terem contribuído de forma direta e indiretamente para concretização deste sonho.

A todos, minha sincera e eterna gratidão!!

“Nas nossas vidas diárias, devemos ver que não é a felicidade que nos faz agradecidos, mas a gratidão é que nos faz felizes”. *Albert Clarke*.

“A ciência serve para nos dar uma ideia de quão extensa é a nossa ignorância”.

Félicité Robert de Lamennais

RESUMO

Objetivo: O objetivo do presente estudo foi avaliar algumas propriedades funcionais de células tronco mesenquimais cardíacas (“cardiac mesenchymal stem cells”- cMSCs) no modelo experimental em ratos da cardiomiopatia hiperadrenérgica tóxica induzida por isoproterenol, o qual se assemelha ao quadro clínico humano da cardiomiopatia de Takotsubo. **Métodos:** Ratos Wistar de 12 semanas de idade foram alocados em dois grupos: grupo cardiomiopático (CMP, recebendo por dois dias consecutivos isoproterenol 100mg/Kg, s.c., em bolus, n= 15) e grupo controle (CON, recebendo salina, n=15). Monitorização eletro- e ecocardiográfica foi realizada em todos os animais imediatamente antes e trinta dias depois da indução da cardiomiopatia. Após a eutanásia, os corações foram excisados, pesados e divididos (corte tetracameral), as quais foram processadas para 1) histologia ou 2) extração de células não-cardiomocíticas. Na histologia, foram avaliadas a morfometria das câmaras cardíacas, a contagem de células inflamatórias e o grau de fibrose miocárdica. Uma parte das células não-cardiomocíticas foi plaqueada em baixa densidade para realização do ensaio de contagem de unidades formadoras de colônias semelhantes a fibroblastos (“colony forming units-fibroblasts” - CFU-F), o qual permite estimar o número de cMSCs. As células não-cardiomocíticas remanescentes foram expandidas até a 5ª passagem para avaliação da taxa de proliferação celular, bem como a habilidade para a diferenciação adipogênica e osteogênica *in vitro*. **Resultados:** Ratos CMP apresentaram maiores durações de onda P, intervalo PR e intervalo QT ao eletrocardiograma, menor fração de ejeção e dilatação ventricular esquerda ao ecocardiograma, hipertrofia cardíaca, acompanhado na histologia por infiltração inflamatória leve e fibrose miocárdica discreta. Todas estas alterações confirmaram a presença de uma cardiomiopatia ativa após os trinta dias de administração do isoproterenol. O ensaio de CFU-F revelou que os animais CMP possuem um maior número de cMSCs no coração em comparação aos ratos CON. Em adição, as cMSCs de ratos CMPs apresentaram maiores taxas de proliferação e maiores capacidade de diferenciação adipogênica e osteogênica que as de animais CON. **Conclusão:** Em ratos com cardiomiopatia hiperadrenérgica induzida por isoproterenol, as células tronco mesenquimais cardíacas (cMSCs) apresentam-se em maior número, com maior taxa proliferativa e maior potencial de diferenciação que os animais controles.

Palavras-chave: Células-Tronco Mesenquimais. Isoproterenol. Unidades Formadoras de Colônias.

ABSTRACT

Objective: To evaluate some biological properties of cardiac mesenchymal stem cells (cMSCs) in a rat model of isoproterenol-induced hyperadrenergic cardiomyopathy, a surrogate for Takotsubo cardiomyopathy. **Methods:** Twelve weeks-old Wistar rats were allocated in two groups: cardiomyopathic (receiving for two days isoproterenol 100mg/Kg, s.c., n= 15) and control rats (receiving saline, n=15). Electro- and ecocardiographical monitoring were performed in all animals immediately before and 30 days after cardiomyopathy induction. After euthanasia, hearts were excised, weighed and processed for histology and for extracting non-cardiomyocytic cells. In the histology, cardiac chambers morphometry, inflammatory cells counting and fibrosis were evaluated. Over the non-cardiomyocytic cells, a pool was plated for a colony forming units-fibroblasts (CFU-F) assay in order to estimate the number of cMSCs. The remaining cells were expanded to assess their proliferation rates as well as their osteogenic and adipogenic differentiation abilities. **Results:** Cardiomyopathic rats presented higher duration of P wave, PR and QT interval at the electrocardiogram, lower ejection fraction and left ventricular (LV) dilation (higher LV end diastolic diameter) at the echocardiogram and LV hypertrophy, accompanied at the histology by inflammatory infiltration and myocardial fibrosis, then confirming the presence of overt cardiomyopathy. CFU-F assay revealed that cardiomyopathic animals presented higher number of cMSCs into the heart, when compared to control animals. In addition, cMSCs from cardiomyopathic rats presented higher proliferative rates as well as higher osteogenic and adipogenic differentiation abilities as compared to control animals. **Conclusion:** In isoproterenol-induced hyperadrenergic cardiomyopathic rats, cMSCs present some functional changes in comparing with normal control animals, which may be implicated in the pathogenesis of toxic hyperadrenergic cardiomyopathy.

Keywords: Mesenchymal stem cells. Isoproterenol. Colony Forming Units

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Imagens ecocardiográficas em modo bidimensional e em modo M dos corações representativos dos grupos cardiomiopático e controle.....28
- Figura 2 - Peso corporal e parâmetros morfométricos cardíacos, peso cardíaco relativo, área interna do ventrículo esquerdo e razão perímetro Interno/perímetro externo nos dois grupos experimentais.....29
- Figura 3 - Fotomicrografias de campo claro representativas do tecido miocárdico ventricular esquerdo corado por hematoxilina e eosina de dois animais representativos dos grupos controle e cardiomiopático e a quantificação dos infiltrados inflamatórios.....30
- Figura 4 - Fotomicrografias de campo claro representativas do tecido miocárdico ventricular esquerdo corado pelo Picosirius Red e iluminado por luz polarizada de dois animais representativos dos grupos controle e cardiomiopáticos e a quantificação da área de fibrótica.....31
- Figura 5 - Fotomicrografias de campo claro representativas das células dentro de cada colônia em ambos os grupos experimentais controle e cardiomiopático, contagens de CFU-F e a correlação da quantidade de CFU-F no tecido e o grau de fibrose miocárdica.....32
- Figura 6 - Curvas de proliferação celular *in vitro* expressas como número de células crescidas/poço em diferentes tempos nos dois grupos experimentais, controle e cardiomiopático.....33
- Figura 7 - Fotomicrografias de campo claro representativas das células diferenciadas em adipócitos coradas por Oil Red, e em osteoblastos corados por Alizarin Red, nos grupos controle e cardiomiopático e as áreas do campo microscópico ocupadas pelas células diferenciadas em ambos os grupos.....34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - parâmetros eletrocardiográficos medidos nos animais controles e cardiomiopáticos ao final do período de seguimento de 30 dias.....	26
Tabela 2 - parâmetros ecocardiográficos medidos nos animais controles e cardiomiopáticos ao final do período de seguimento de 30 dias.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cMSCs - Células tronco mesenquimais cardíacas

MSCs – Células tronco mesenquimais

CMP - Grupo cardiomiopático

COM - Grupo controle

OMS - Organização Mundial de Saúde

VE - Ventrículo Esquerdo

CFU-Fs - Colony Forming Units – Fibroblasts

IAM - Infarto agudo do miocárdio

ISCT - International Society for Cellular Therapy

iECA - Inibidores da enzima conversora da angiotensina

ISO - Isoproterenol

cAMP - 3´5´-adenosina-monofosfato-cíclico

PKA - Proteína-quinase A

ATP - Adenosina trifosfato

UFTM - Universidade Federal do Triângulo Mineiro

CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais

ECG - Eletrocardiograma

iRR - Duração do intervalo RR

dP - Duração da onda P

iPR - Duração do intervalo PR

QRS - Duração complexo do QRS

iQaT - Duração do intervalo QT

iQaTc - Duração do intervalo QT corrigido

ECO - Ecocardiódoppler

DDFVE = Diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo

DSFVE = Diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo

PBS - Phosphate Buffered Saline

EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO - Dimetilsulfóxido

SBF - Soro bovino fetal

Pi - Perímetro interno

Pe - Perímetro externo

eNOS - Óxido nítrico sintase endotelial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 METODOLOGIA.....	20
2.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	20
2.3 ESTUDO ELETROCARDIOGRÁFICO.....	21
2.4 ESTUDO ECOCARDIOGRÁFICO.....	21
2.5 OBTENÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO.....	22
2.6 ESTIMATIVA DE HIPERTROFIA CARDÍACA PELO ÍNDICE DE MASSA CARDÍACA.....	22
2.7 ISOLAMENTO E EXTRAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS CARDÍACAS.....	22
2.8 ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE CLONOGENICA-CFU-F....	23
2.9 AVALIAÇÃO DA TAXA DE PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	23
2.10 PROTOCOLO DE DIFERENCIAÇÃO OSTEÓGENICA.....	23
2.11 PROTOCOLO DE DIFERENCIAÇÃO ADIPOGENICA.....	24
2.12 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO TECIDO CARDÍACO.....	24
2.13 AVALIAÇÃO DOS PERÍMETROS E DAS ÁREAS DO VENTRÍCULO ESQUERDO.....	25
2.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25
3 RESULTADOS.....	26
3.1 CARACTERIZAÇÃO DA CARDIOMIOPATIA.....	26
3.2 QUANTIFICAÇÃO DAS CFU-F CARDÍACAS.....	32
3.3 PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	33
3.4 DIFERENCIAÇÃO OSTEÓGENICA E ADIPOGENICA.....	33
4 DISCUSSÃO.....	35
REFERÊNCIAS.....	39
APÊNDICE A- COMPROVANTE DE SUBMISSÃO.....	46
APÊNDICE B- SUPORTE FINANCEIRO.....	47
APÊNDICE C- CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES.....	48

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares são responsáveis por aproximadamente 17,7 milhões de mortes anualmente, representando 31% de todas as mortes globais, segundos dados da Organização mundial de saúde (OMS, 2017).

A cardiomiopatia de Takotsubo também conhecida como Síndrome do coração partido, cardiomiopatia induzida por stress ou síndrome do bolonamento apical é uma doença que ocasiona uma disfunção no ventrículo esquerdo (VE) (Mejiá-Rentería HD, Núñez- Gil IJ, 2016; Gulsini G *et al.*, 2016; Deshmukh A *et al.*, 2012). Foi descrita pela primeira vez no Japão na década de 90 por Sato H e colaboradores. O nome “Takotsubo” foi designado devido a imagem produzida pela ventriculografia apresentar semelhanças a um recipiente utilizado na captura de polvos (Dote K *et al.*, 1991; Sato H, Tateishi H, Uchida T, 1990).

A cardiomiopatia é predominante no sexo feminino com idade superior a 50 anos, geralmente após a menopausa, sugerindo que a redução dos níveis de estrogênio aumentaria a predisposição da doença. Além disso, o desencadeamento da síndrome é induzido por fatores estressantes físicos ou emocionais, como por exemplo, uma doença súbita, perda de um ente querido, um acidente grave, desastre ambiental, entre outros. Em adição, outros fatores também contribuem para surgimento da cardiomiopatia, como o tabagismo, alcoolismo, ansiedade, hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia, Diabetes mellitus e histórico genético de doença cardiovascular (Mejiá-Rentería HD, Núñez- Gil IJ, 2016; Gulsini G *et al.*, 2016; Rihl MF, Haas P, Holthausen RS, 2015; Deshmukh A *et al.*, 2012).

Os sintomas mais comuns em pacientes com a cardiomiopatia são caracterizados por fortes dores no peito e dispnéia, assemelhando-se a um infarto agudo do miocárdio (IAM), o que geralmente pode induzir a um diagnóstico errôneo. Os critérios de diagnóstico ainda não estão bem elucidados. Segundo os dados do Registro Internacional Takotsubo (NCT01947621, 2014) e os Critérios de Diagnósticos da Clínica Mayo (Prasad A, Lerman A, Rihal CS, 2008), alguns critérios devem ser observados nos pacientes, como: hipocinesia, acinesia ou discinesia transitória do VE; elevação modesta de troponina cardíaca total; anormalidades eletrocardiográficas ocasionando elevação segmento ST e/ou inversão de ondas T, ausência de miocardite e ausência de doença coronariana obstrutiva ou evidência angiográfica de ruptura aguda da placa. Este diagnóstico somente será possível

seguido de uma cineangiocoronariografia e ventriculografia, comprovando a ausência de obstruções nas coronárias e o formato característico de “Takotsubo” (Gassanov N *et al.*, 2019; Mejiá-Rentería HD, Núñez-Gil IJ, 2016; Gulsini G *et al.*, 2016; Rihl MF, Haas P, Holthausen RS, 2015).

Até o momento não existe tratamento específico para a cardiomiopatia. Em geral, utiliza-se os mesmos medicamentos que pacientes com insuficiência cardíaca, com destaque para os inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECA), β -bloqueadores e diuréticos (Naegele M *et al.*, 2016; Reis JVG, Rosas G, 2010). Algumas complicações podem surgir durante desencadeamento da síndrome, como a disfunção do ventrículo direito, anormalidades no ritmo cardíaco (bradicardia ou fibrilação atrial), parada cardíaca assistólica ou por fibrilação ventricular, ruptura da parede do VE ou choque cardiogênico (Budnik M *et al.*, 2018). Entretanto, devido ao desconhecimento e diagnóstico errôneo desta síndrome, tornam-se necessárias estudos/pesquisas com propósito de diminuir a morbidade e mortalidade dos pacientes, e também, proporcionar uma terapia mais eficaz e menos imunogênica. Uma das alternativas bastante conceituadas na atualidade é a utilização de células-tronco, a qual tem demonstrado resultados satisfatórios em diversas doenças, incluindo as cardiomiopatias.

As células-tronco são células indiferenciadas com capacidade de autorrenovação, diferenciação em diversos tipos celulares e reconstituição funcional em diversos tecidos lesados. Didaticamente, são divididas em três tipos: células-tronco embrionárias, adultas e pluripotentes induzidas (Behbahan IS, Keating A, Gale RP, 2015; Ahearne M, Lysaght J, Lynch A, 2014). Os estudos com células-tronco adultas foram iniciados por dois grandes cientistas: Alexander Maximow, que criou a teoria da hematopoiese e o conceito de células tronco hematopoiéticas, e Alexander Friedenstein, que foi responsável pelo descobrimento das células-tronco mesenquimais de medula óssea (Afanasyev BV, Elstner EE, Zander AR, 2009). A partir das contribuições destes cientistas, existem milhares de pesquisas utilizando as células-tronco e inúmeras descobertas e benefícios já comprovados cientificamente, corroborando a importância desse grupo de células para manutenção da homeostase e utilização na terapêutica de diversas doenças graves.

As células-tronco embrionárias possuem capacidade de se transformar em qualquer tipo de célula adulta. São obtidas a partir do embrião em seu estágio inicial (blastocisto- 4 a 5 dias após fecundação), são denominadas de pluripotentes devido

sua capacidade de diferenciar em qualquer linhagem derivado dos três folhetos embrionários: endoderma, mesoderma e ectoderma (Itskovitz-Eldor J *et al.*, 2000). Essas células foram descritas pela primeira vez em camundongo no ano de 1981 (Evans MJ, Kaufman MH, 1981) e, em humanos em 1998 (Thomson JA *et al.*, 1998). Atualmente, muitas ferramentas poderosas de análise como a metabolômica, proteômica e transcriptômica estão desenvolvidas para obter características metabólicas das células-tronco pluripotentes para melhorar suas propriedades benéficas e segurança para aplicações clínicas (Tohyama S *et al.*, 2017).

As células-tronco pluripotentes induzidas (do inglês, *induced Pluripotent Stem Cells*, ou iPSCs) foram produzidas através de uma reprogramação nuclear a partir de fibroblastos de camundongos em 2006 (Takahashi K, Yamanaka S, 2006), com auxílio de retrovírus contendo quatro fatores de transcrição (Oct3/4, Sox2, KLF4 e c-Myc). Um ano após, em 2007, foram estabelecidas iPSCs de tecido epitelial humano, confirmando a capacidade dessas células de autorrenovação e pluripotência (Kawamura M *et al.*, 2012; Takahashi K, *et al.*, 2007). Diversos estudos têm demonstrado que as iPSCs podem se diferenciar em vários tipos de células funcionais (Kawamura M *et al.*, 2012; Germanguz I *et al.*, 2011). Por ser uma metodologia relativamente recente, necessitam de diversos estudos acerca das iPSCs para garantir a eficácia e segurança na utilização dessa população de células. No entanto, alguns autores sugerem que parte destas células indiferenciadas podem favorecer para surgimento de células tumorais (Inui S *et al.*, 2017).

As células-tronco adultas então presentes em todos os órgãos de indivíduos adultos, são classificadas de multipotentes por apresentarem capacidade limitada de diferenciação em alguns tipos celulares. Vários estudos têm demonstrado a importância dessas células, em especial as células-tronco mesenquimais (MSCs), por possuírem capacidade de passagem clonogênica, diferenciação em osteoblastos, adipócitos e condrócitos, e estão presentes em locais de lesão e imunomodulação. (Rohban R, Pierber TR, 2017; Ahearne M, Lysaght J, Lynch A, 2014; Chong JJH *et al.*, 2011). As MSCs foram isoladas e purificadas da medula óssea no ano de 1966 pelos pesquisadores Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Em 2006, Meirelles LdaS, Chagastelles PC, Nardi NB, isolaram MSCs de diversos outros tecidos. Desde então, diversas contribuições científicas relevantes utilizando as MSCs têm sido descritos.

As MSCs exibem propriedades regenerativas, angiogênicas, anti-apoptóticas, anti-inflamatórias e imunossupressoras, corroborando como uma ferramenta promissora para novas abordagens terapêuticas (Daneshmandi S, Karimi MH, Porfathollah AA, 2017; Leite CF *et al.*, 2015; Kern S *et al.*, 2006). Células formadoras de colônias semelhantes às células-tronco mesenquimais foram isoladas em diversos órgãos adultos e algumas demonstraram ocupar uma localização perivascular (Avolio E, Madeddu P, 2016; Chong JJH *et al.*, 2011). Essas populações celulares são ditas como CFU-F (Colony Forming Units – Fibroblasts) e parecem apresentar uma importante função órgão-específica. Em uma visão geral, as CFU-Fs podem constituir uma população celular dedicada à manutenção da integridade da matriz, do estroma e dos vasos de múltiplos órgãos, especialmente frente a doenças e dano tecidual (Rohban R, Pierber TR, 2017; Chong JJH *et al.*, 2011; Kern S *et al.*, 2006).

As MSCs foram isoladas de diversos órgãos e tecidos como no cérebro, fígado, rins, pulmões, baço, músculo esquelético, tecido adiposo e timo. No âmbito cardíaco foi demonstrada uma possível origem proepicárdica / epicárdica para essas células (Chong JJH *et al.*, 2011; Armuli A, Genové G, Betsholtz C, 2011). *In vitro*, essas populações de células apresentam algumas características específicas baseadas no perfil fenotípico ou morfológico semelhante ao fibroblasto, na capacidade de aderência ao plástico, na expressão de marcadores de superfície CD73, CD90 e CD105 e não expressão de CD14 ou CD11b, CD34, CD45, CD79 α ou CD19 e com habilidade de diferenciação em células ósseas, de gordura ou de cartilagem, de acordo com os critérios da ISCT (International Society for Cellular Therapy) (Rohban R, Pierber TR, 2017; Ahearne M, Lysaght J, Lynch A, 2014; Dominici M *et al.*, 2006). Todavia, as propriedades e a caracterização funcional dessa população frente à lesão no coração ainda não foram bem elucidadas.

Com intuito de conhecer melhor as propriedades e as características de determinada população de células, são amplamente utilizados modelos experimentais, empregando drogas e animais para simular a fisiopatologia de diversas doenças, a fim de proporcionar maiores conhecimentos e uma possível nova abordagem terapêutica. No presente estudo, iremos utilizar a droga isoproterenol (ISO) para simular uma cardiomiopatia em ratos. O ISO é um agonista β - adrenérgico não seletivo. Sua ação é mediada pela indução de excito-toxicidade e stress oxidativo do miocárdio, inflamação e aumento na concentração de cálcio através da ativação do receptor β - adrenérgico cardíaco. O ISO produz efeitos ionotrópicos e

cronotrópicos dependente de cAMP, levando a fosforilação do canal rianodina via proteína-quinase A (PKA), ocasionado um excesso de efluxo de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático, permanecendo grande quantidade no citossol. O excesso de Ca^{2+} no citossol é então capturado pelas mitocôndrias, o que pode levar ao desacoplamento da cadeia respiratória com conseqüente queda do ATP, indução de stress oxidativo mitocondrial e ativação da via mitocondrial das caspases e indução de apoptose, gerando alterações na contração do ventrículo esquerdo e desencadeando uma cardiomiopatia nos animais. A lesão e morte celular induzidas pelo ISO levam então no curto prazo ao recrutamento de células inflamatórias e no longo prazo à fibrose intersticial reparativa (Riba A *et al.*, 2017; Merino B, Quesada I, Hernández-Cascales J, 2015; Patel DK *et al.*, 2012). Todas estas alterações promovidas pelo ISO se assemelham muito àquelas observadas na cardiomiopatia de Takotsubo, tornando este modelo animal de cardiomiopatia induzida pelo ISO um modelo útil para o estudo experimental da fisiopatologia e eventuais descobertas de novas abordagens terapêuticas para a cardiomiopatia de Takotsubo.

Embora diversos estudos tenham demonstrado os efeitos prejudiciais ocasionados no tecido cardíaco devido as doenças cardiovasculares, não há relatos na literatura sobre as alterações funcionais e proliferativas das células tronco mesenquimais cardíacas (cMSCs) em portadores da cardiomiopatia de Takotsubo. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o comportamento e a diferenciação da população das cMSCs na cardiomiopatia tóxica hiperadrenérgica em ratos induzida por isoproterenol, a qual se constitui num modelo experimental que se assemelha ao quadro clínico na cardiomiopatia de Takotsubo, a fim de compreender como essa população celular atua na manutenção da homeostase do tecido cardíaco (Stanton HC, Brenner G, Mayfield ED Jr, 1969; Rona G *et al.*, 1973; Rona G, 1985; Xiao H *et al.*, 2018; Alemasi A *et al.*, 2019).

2 METODOLOGIA

2.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS:

Foram utilizados 30 ratos Wistar com idade de 12 semanas. Os animais foram mantidos em condições controladas e estáveis em biotério (temperatura 22° C, umidade de 40-70% e ciclo claro-escuro de 12/12horas). O estudo experimental foi

aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFTM, nº 321/2014. Os animais foram alocados em dois grupos experimentais:

Grupo Controle- CON (n = 15) - Composto por ratos Wistar submetidos à injeção subcutânea de solução salina (veículo para ISO).

Grupo Cardiomiopático- CMP (n = 15) - Composto por ratos Wistar que receberam injeção de isoproterenol (100mg/Kg, s.c., por dois dias consecutivos) (No. I5627, Sigma- Aldrich).

2.3 ESTUDO ELETROCARDIOGRÁFICO

Trinta dias após a administração de ISO, os animais do grupo controle (CON=15) e grupo cardiomiopático (CMP=10) foram submetidos ao registro de eletrocardiograma (ECG) basal padrão. Os ratos foram anestesiados via intraperitoneal com tribromoetanol 1,25% (250 mg/kg, ip.) e submetidos ao registro ECG, utilizando um eletrocardiógrafo portátil de 06 canais (modelo ER-661, Medicor, Budapeste, Hungria), acoplados a um sistema computadorizado de aquisição de dados (Aqdados, Lynx Tec. Eletr. Ltda., São Paulo, Brasil), com frequência de sinal de 3000 Hz. Os eletrodos foram conectados nas derivações do plano frontal (D1, D2, D3, aVR, aVL, aVF) e nas derivações precordiais (V1, V2, V3, V4, V5 e V6). Os seguintes parâmetros foram avaliados:

- 1) Duração do intervalo RR (iRR)
- 2) Duração da onda P (dP)
- 3) Duração do intervalo PR (iPR)
- 4) Duração complexo do QRS (QRS)
- 5) Duração do intervalo QT (iQaT)
- 6) Duração do intervalo QT corrigido (iQaTc) – definido como intervalo QT corrigido pela frequência cardíaca através da equação de Bazett modificada ($iQaTc = iQaT(ms) / [RR (ms/100)]^{1/2}$).

2.4 ESTUDO ECOCARDIOGRÁFICO

Para avaliar a função ventricular, um ecodopplercardiógrafo (ECO) para roedores (Vevo® 2100 Imaging System, VisualSonics, Toronto, Canadá) foi utilizado no momento 0 e 30 dias nos dois grupos de animais (CON=13; CMP=15) equipado com um transdutor ultrassônico de arranjo linear de 30 MHz (modelo MS400, VisualSonics-Fujifilms, Toronto, Canadá). Os traçados foram transmitidos em modos

bidimensionais e modo-M e modo Doppler de onda pulsada, utilizando um sistema de ecocardiografia de alta resolução. Os seguintes parâmetros foram avaliados: DDFVE = Diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo e DSFVE = Diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo e fração de ejeção. Os parâmetros ecocardiográficos foram medidos e calculados seguindo as recomendações padronizadas conjuntas das Sociedades Americana e Europeia de Ecocardiografia (Lang *et al.*, 2002). Todas as análises foram realizadas de forma cega.

2.5 OBTENÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO

Após registro do ECG e ECO os animais foram eutanasiados via anestesia com tionembutal em dose supra anestésica (100mg/Kg, i.p.) e pesados em balança. Após a anestesia profunda, uma toracotomia foi efetuada e o coração de cada animal excisado, pesado e cortado tetracameralmente. Uma metade foi mantida em solução formol tamponado até posterior processamento, sendo a outra metade processada imediatamente para isolamento e cultura de células-tronco mesenquimais cardíacas *in vitro*.

2.6 ESTIMATIVA DA HIPERTROFIA CARDÍACA PELO ÍNDICE DE MASSA CARDÍACA

Após pesagem dos animais e dos respectivos corações, foram realizados o cálculo do índice de massa cardíaca em que se baseia na razão entre o peso absoluto do coração (em mg) e o peso corporal do animal (em g).

2.7 ISOLAMENTO E EXTRAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS CARDÍACAS

A outra parte dos corações foram picotados e tratadas com tripsina-EDTA 0,25% em banho-maria (37 °C por 10 min). Após esse processo, realizou-se a centrifugação (300 rcf por 10 min), e o processo incubação com tripsina-EDTA seguido de centrifugação foi repetido por duas vezes. Após a última centrifugação, os pellets formados foram ressuspensos em meio DMEM de alta concentração de glicose, 10% de soro bovino fetal (SBF), L-glutamina 200 mM e 1% penicilina / estreptomicina e os grumos de células removidos por filtragem (cellstranier 70µm, BD Bioscience EUA). As células foram contadas na câmara de Neubauer e cultivadas em placas de 24 poços com o meio DMEM, e seguido pelo ensaio de capacidade de formação de

Unidades Formadoras de Colônia semelhantes a Fibroblastos (CFU-F). As células foram expandidas até a 5ª passagem, seguindo para os demais ensaios.

2.8 ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE CLONOGÊNICA – CFU-F

O ensaio de capacidade clonogênica foi avaliado de acordo com a capacidade de formação de CFU-F. As células obtidas do coração dos dois grupos (CON= 15; CMP= 14) foram depositadas em placas de 24 poços a uma densidade de 50.000 células/cm², realizado para cada animal em triplicata. As placas de culturas foram mantidas em estufa de CO₂ (5%) à 37°C, e troca do meio de cultura no 3º e 8º dia após o plaqueamento. No 13º dia, removeu-se o meio de cultura e as células lavadas com solução de PBS (pH 7,2), fixadas e coradas com Giemsa diluído em metanol P.A. Após coloração, as placas foram avaliadas em microscópio invertido de contraste de fase (Axio-Observer Z1, Carl Zeiss, Alemanha), e todas as colônias visíveis que apresentavam células com formato fibroblastóide foram contadas. Para ser considerado uma colônia deve-se conter no mínimo cinco células (Meirelles LdaS; Nardi NB, 2003), podendo considerar como uma CFU-F.

2.9 AVALIAÇÃO DA TAXA DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

As cMSCs na 5ª passagem foram tripsinizadas, removidos de suas placas originais e subsequentemente replaqueados em placas de 24 poços com uma densidade de 5.000 células/cm². Posteriormente, três poços (triplicados) por cada rato foram tripsinizados aos dias 3, 5, 7, 10, 12 e 14 dias após o plaqueamento, e o número de células por poço foi contado usando câmaras de Neubauer com auxílio do microscópio de luz. O valor médio dos três poços por dia por animal foi utilizado para construir curvas da taxa de proliferação para cada grupo experimental (CON= 6; CMP=12).

2.10 PROTOCOLO DE DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA

As cMSCs na 5ª passagem foram plaqueadas em placas de 24 poços a uma densidade de 3.000 células/cm² em meio de cultura convencional. 72hs após o plaqueamento, o meio de cultura foi substituído por meio de indução osteogênico constituído por DMEM suplementado com 15% SBF, 1/5 penicilina/estreptomicina, 100mM de dexametasona, 50µM de ascorbato-2-fosfato e 10mM de glicerol-fosfato.

O meio de indução osteogênico foi trocado a cada 3-4 dias e ao final do 18º dia, realizado a revelação da diferenciação.

A revelação constituiu na remoção do meio de indução seguida por lavagem da monocamada celular diferenciada com água Milli-Q, fixação com paraformaldeído 4% (por 60 minutos a temperatura ambiente) e aplicação do corante Alizarin-Red 2% (Sigma Aldrich, USA) por 10 minutos. O excesso de corante foi retirado com lavagem da monocamada com água Milli-Q, e a análise qualitativa realizada em microscópio óptico invertido na objetiva 40x (Axio-Observer Z1, Carl Zeiss, Alemanha), observando a formação de matriz óssea, revelada em vermelho, confirmando o poder de diferenciação celular (CON=6; CMP=10).

2.11 PROTOCOLO DE DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA

Para a indução da diferenciação adipogênica as MSCs foram plaqueadas em 24 poços a uma densidade de 20.000 células/cm² em meio de cultura convencional (DMEM de alta concentração de glicose, 10% de soro bovino fetal (SBF), L-glutamina 200 mM e 1% penicilina / estreptomicina). 72hs após o plaqueamento, o meio de cultura convencional foi substituído por meio de indução adipogênico (DMEM suplementado com 15% SBF, 1% penicilina/estreptomicina, 1µM de dexametasona, 0,5mM isobutil-metil-xantina, 10 µg/mL de insulina e 100 µM de indometacina diluída em DMSO). Transcorridos por mais 72hs o meio de indução foi substituído pelo meio de manutenção (DMEM 20%SBF, 1% penicilina/estreptomicina e 10 µg/mL de insulina) por 24hs. A adição de meio de indução (por 72hs) seguido por substituição por meio de manutenção (por 24hs), consiste em um ciclo do protocolo. Ao se completar três ciclos de indução/manutenção, as células permaneceram por 5 dias em meio de indução, e realizada a revelação da diferenciação.

A revelação constituiu na remoção do meio de indução, seguida por lavagem da monocamada celular diferenciada com água Milli-Q, fixação com paraformaldeído 4% (por 60 minutos a temperatura ambiente), e aplicação do corante Oil-Red (Sigma Aldrich, USA) por 10 minutos. O excesso de corante foi lavado com água Milli-Q, e a análise qualitativa realizada em microscópio óptico invertido (Axio-Observer Z1, Carl Zeiss, Alemanha), e a observação de gotículas lipídicas no citoplasma celular confirmando a capacidade de diferenciação adipogênica das MSCs (CON=6; CMP=10).

2.12 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO TECIDO CARDÍACO

Os corações foram excisados de todos os animais, inseridos em solução salina a 0,9% e fixados em solução de formalina a 10% fosfatada até o processamento. Todas as amostras foram incorporadas em parafina, realizando cinco cortes longitudinais de 5 μ m de espessura nos corações com auxílio do micrótomo rotativo manual Leica RM2125RTS. Logo em seguida, os cortes foram corados com hematoxilina-eosina e analisados usando um microscópio de luz invertido (Axio-Observer Z1, CarlZeissInc., Alemanha). Contagem de núcleos celulares foi realizada em 05 campos aleatórios ventriculares de cada animal do grupo controle e do grupo cardiomiopático. A subtração das contagens individuais dos ratos com cardiomiopatia do número médio de núcleos observado no grupo controle foi utilizada como uma contagem indireta de células inflamatórias no tecido. As análises e contagens foram realizadas as cegas, usando o software ImageJ 1.44p (National Institute of Health, USA).

Para quantificar a área fibrótica no miocárdio, as seções longitudinais contínuas dos corações foram coradas com Picrosirius Red, o qual se liga ao colágeno presente na matriz do tecido. A quantificação da área fibrótica foi realizado pela média de áreas fibróticas em 20 campos aleatórios do miocárdio, com auxílio do software Axion Vision SE64 Rel 4.9.1 version 15.0 analisados com microscopia de Luz polarizada (AxioLab, Zeiss Inc., Alemanha). Os valores de áreas fibróticas superiores aos percentis 95% (P95) em relação a área fibrótica dos ratos controles foram utilizados para indicar a presença de fibrose miocárdica (CON=13; CMP=13).

2.13 AVALIAÇÃO DOS PERÍMETROS E DA ÁREA DO VENTRÍCULO ESQUERDO

Todos os cortes histológicos (CON=13; CMP=13) foram escaneados e o perímetro interno (Pi) e perímetro externo (Pe) foram demarcados. Posteriormente, a área do Pi foi mensurada (mm) e a relação entre a área do Pi/Pe (%) foram avaliados. Para avaliação da área e a relação dos perímetros do VE foi utilizado o software ImageJ 1.44p (National Institute of Health, USA).

2.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os parâmetros funcionais e estruturais foram expressos como média \pm epm e as diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste t de Student

para medidas independentes ou de teste de Mann-Whitney, quando apropriados. As curvas de crescimento celular foram comparadas por ANOVA “two way” seguido do teste de Bonferoni. A correlação entre o número de CFU-Fs e a fibrose foi feita pelo teste de Spearman. Um valor de probabilidade menor que 0,05 foi utilizado para expressar a significância das comparações.

3 RESULTADOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DA CARDIOMIOPATIA

Os parâmetros ECG e ECO medidos antes da indução da cardiomiopatia foram normais entre os grupos. A tabela 1 mostra os parâmetros ECG quantificados após trinta dias da indução. Note os aumentos significativos na duração da onda P, indicativo de sobrecarga atrial esquerda, do intervalo PR, indicativo de distúrbio de condução no nó átrio-ventricular e no intervalo iQaT e iQaT corrigido, sugestivo de lesão miocárdica ventricular com retardo da repolarização celular. A frequência cardíaca, bem como a duração do complexo QRS, não foi diferente entre os dois grupos.

Tabela 1 – Parâmetros eletrocardiográficos (média±epm) medidos nos animais controles (CON, n=15) e cardiomiopáticos (CMP, n=10) ao final do período de seguimento de 30 dias.

	CON	CMP	p
iRR (ms)	150,9±4,7	153,3±5,3	0,737
FC (bpm)	403,0±12,3	395,5±12,4	0,690
dP (ms)	14,2±0,8	24,5±3,2*	<0,001
iPR (ms)	44,3±0,8	53,1±3,0*	0,006
dQRS (ms)	18,4±0,7	22,9±2,5	0,056
iQaT (ms)	27,4±2,2	42,3±8,3*	0,014
iQaTc (ms ^{1/2})	22,2±1,5	33,9±6,5*	0,014

(iRR = intervalo RR; FC = frequência cardíaca; dP = duração da onda P; iPR = intervalo PR; dQRS = duração do complexo QRS; iQaT = duração do intervalo QT; iQaTc = intervalo QT corrigido pela equação de Bazett modificada, ms=milsegundos; bpm= batimentos por minuto, p = probabilidade de erro tipo I)

* p<0,05 versus grupo controle (CON).

A tabela 2 mostra os resultados dos parâmetros ECO após 30 dias de evolução. Podemos observar que os valores de DDFVE e DSFVE nos animais cardiomiopáticos foram maiores (DDFVE=6,05 ± 0,16mm versus 4,23 ± 0,22mm em ratos controles;

DSFVE= $3,31 \pm 0,12$ mm versus $1,45 \pm 0,14$ mm em ratos controles, $p < 0,05$). Ao mesmo tempo, a fração de ejeção foi reduzida nos ratos cardiomiopáticos ($46,2 \pm 5,1\%$ versus $84,3 \pm 1,9\%$ em ratos controles, $p < 0,05$), confirmando a presença de uma disfunção contrátil no coração desses animais, conforme apresentado na figura 1.

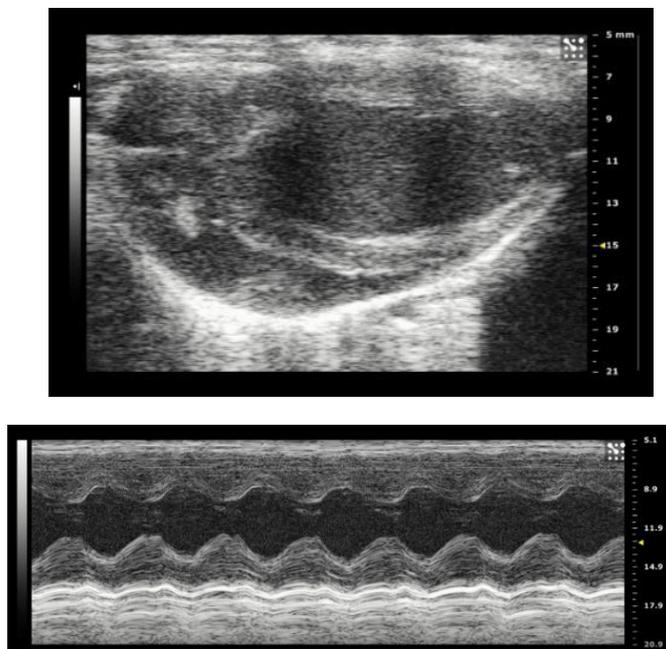
Tabela 2 – Parâmetros ecocardiográficos (média \pm epm) medidos nos animais controles (CON, n=13) e cardiomiopáticos (CMP, n=15) ao final do período de seguimento (30 dias).

	CON	CMP	p
DDFVE (mm)	4,23 \pm 0,22	6,05 \pm 0,16*	0,003
DSFVE (mm)	1,45 \pm 0,14	3,31 \pm 0,12*	0,002
Fração de Ejeção (%)	84,3 \pm 1,9	46,2 \pm 5,1*	0,001

*DDFVE = Diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo; DSFVE = Diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo; mm = milímetro.; p = valor de probabilidade de acordo com o teste t ou de Mann-Whitney, quando apropriado. *p < 0,05 versus grupo controle (CON).*

Adicionalmente, a disfunção mecânica ventricular foi acompanhada por um índice de massa cardíaca significativamente maior em animais com cardiomiopatia ($5,521 \pm 0,819$ mg/g versus $3,603 \pm 0,150$ mg/g em animais controles, $p = 0,0284$) (figura 2B). Aqui vale ressaltar que os pesos corporais dos animais ao final de 30 dias de evolução não apresentaram diferenças significativas ($342,7 \pm 7,2$ g no grupo cardiomiopático versus $337,9 \pm 7,5$ g nos animais controles) (figura 2A). Além disso, a área interna do VE dos animais foi calculada, podendo observar uma maior área interna do VE em ratos cardiomiopáticos comparados com ratos controles ($310,5 \pm 46,8$ mm² versus $67,2 \pm 14,0$ mm², respectivamente, $p < 0,001$) (figura 2C). Também pode-se notar uma diferença significativa na relação entre os perímetros interno e externo (Pi/Pe) nos animais cardiomiopáticos em comparação aos controles ($17,0 \pm 0,5\%$ versus $14,8 \pm 0,8\%$, respectivamente, $p < 0,05$), como mostra a figura 2D.

(A)



(B)

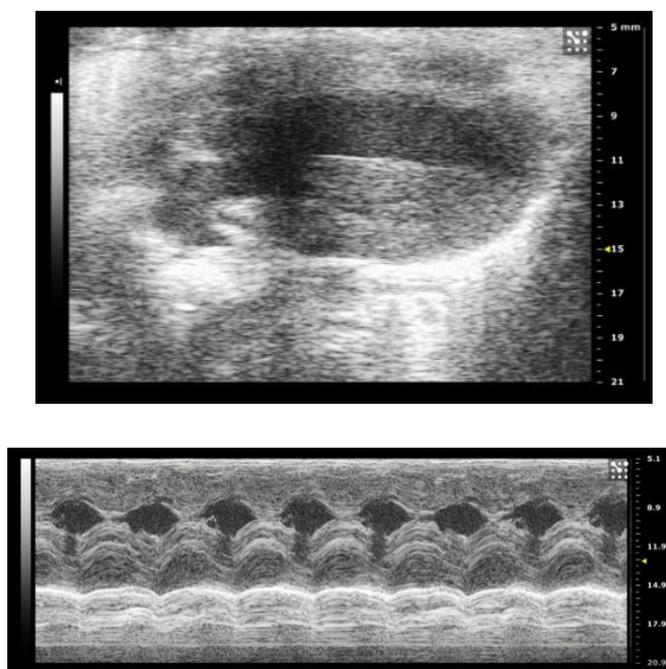


Figura 1 – Imagens ecocardiográficas em modo bidimensional (painéis superiores) e em modo M (painéis inferiores) de dois corações representativos dos grupos cardiomiopático (A) e controle (B). Note a dilatação das câmaras cardíacas esquerdas (modo bidimensional) e o déficit contrátil (modo M) no animal cardiomiopático.

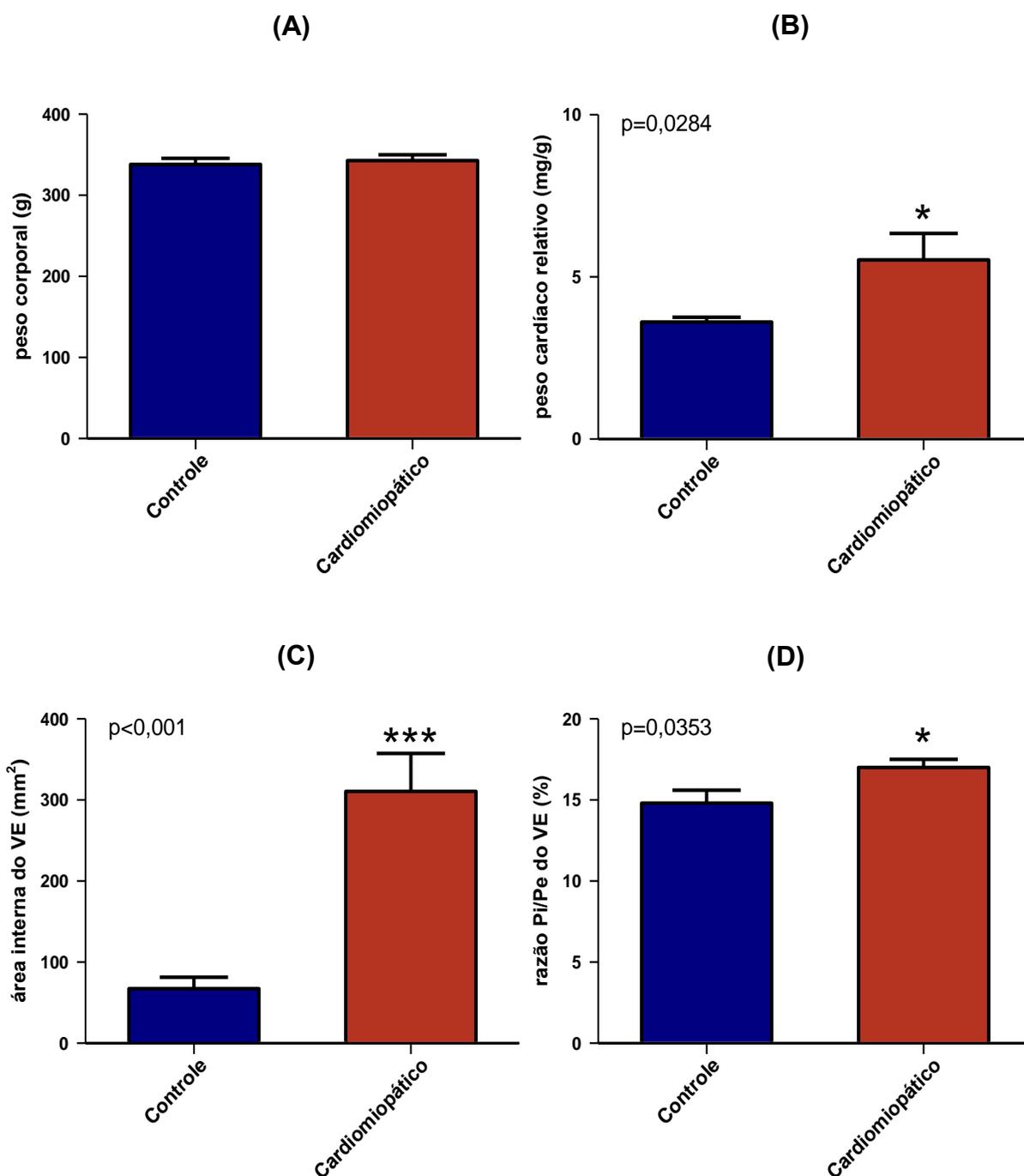


Figura 2 – Peso corporal (painel A) e parâmetros morfométricos cardíacos, tais como peso cardíaco relativo (painel B), área interna do ventrículo esquerdo (painel C) e razão perímetro interno/perímetro externo (Pi/Pe), expressos como média (\pm epm), nos dois grupos experimentais, grupo controle e cardiomiopático (p =probabilidade, * $p < 0,05$ versus grupo controle, *** $p < 0,001$ versus grupo controle).

O exame microscópico dos corações dos animais controles não evidenciou nenhuma alteração patológica, como necrose, infiltração inflamatória, congestão de vasos, fibrose focal ou difusa, etc., como esperado (figura 3A). Por outro lado, todos os corações de animais cardiomiopáticos apresentaram áreas focais de necrose, entre células musculares cardíacas (figura 3B), bem como uma maior contagem numérica de núcleos celulares, indicando uma maior infiltração inflamatória (figura 3C). A área cardíaca fibrótica para o grupo controle foi de $0,133 \pm 0,013\%$. Já no grupo com cardiomiopatia, uma fibrose difusa em torno de cardiomiócitos e microvasos foi observada (Figura 4B), diferentemente nos animais controles (Figura 4A). A área fibrótica cardíaca para o grupo cardiomiopático foi de $12,280 \pm 0,583\%$ ($p < 0,001$ versus grupo controle) (figura 4C).

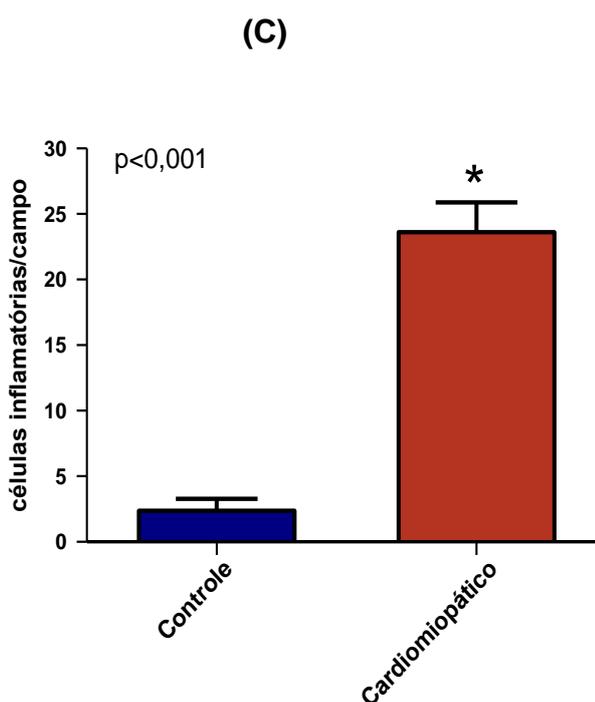
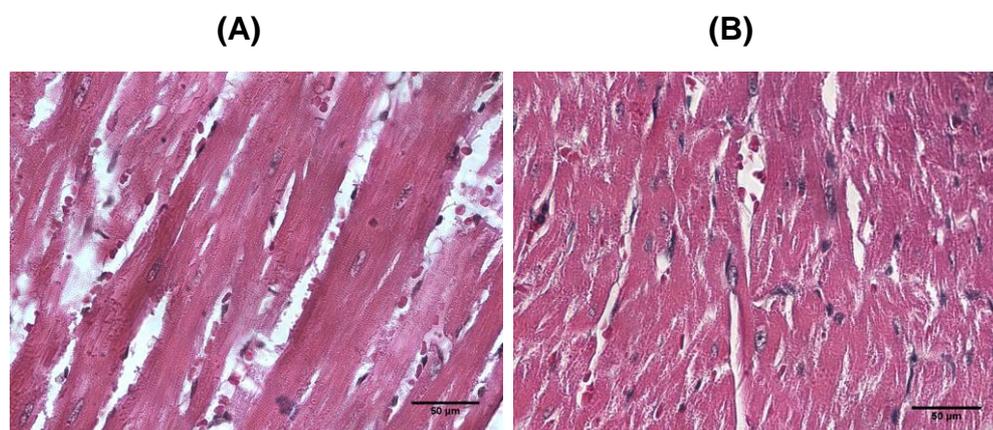


Figura 3 – Fotomicrografias de campo claro representativas do tecido miocárdico ventricular esquerdo corado por hematoxilina e eosina de dois animais representativos dos grupos controle (painel A) e cardiomiopático (painel B). Painel C indica os valores médios (\pm epm) da contagem numérica de núcleos de células inflamatórias nos grupos controle e cardiomiopático. (Aumento 40x, p=probabilidade, * $p < 0,001$ versus grupo controle).

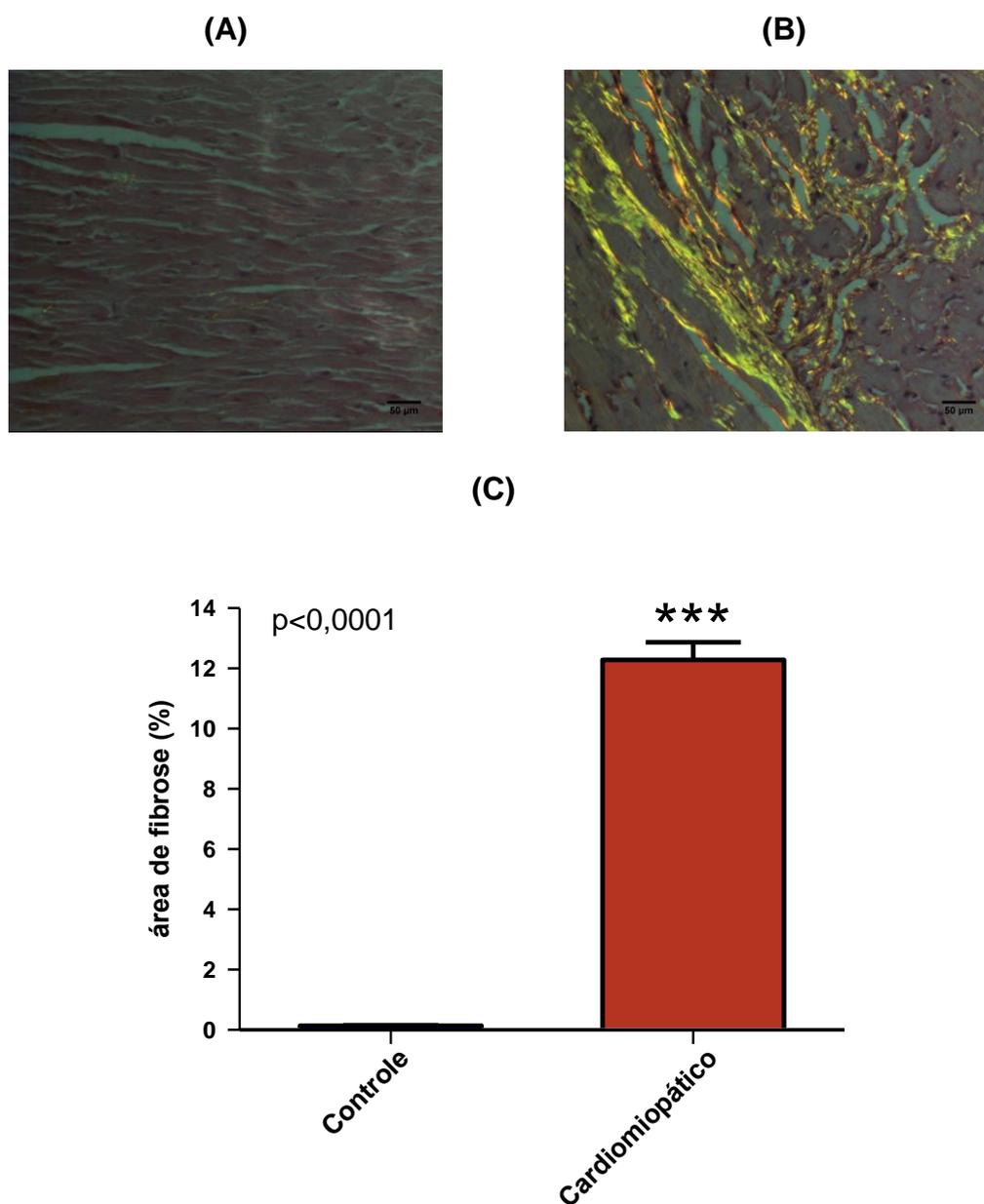


Figura 4 – Fotomicrografias de luz polarizada do tecido miocárdico ventricular esquerdo corado pelo Picosirius Red de dois animais representativos dos grupos controle (painel A) e cardiomiopático (painel B). Painel C indica os valores médios (\pm epm) da área de fibrose nos grupos controle e cardiomiopático. (Aumento 20x, p=probabilidade, *** $p < 0,0001$ versus grupo controle).

3.2 QUANTIFICAÇÃO DAS CFU-Fs CARDÍACAS

Analisando os valores obtidos durante ensaio de formação de unidades de colônias semelhantes a fibroblastos (CFU-F), observou-se um valor médio de $3,62 \pm 1,08$ CFU-Fs/100.000 células, o que indica que $0,0036 \pm 0,0011\%$ das células não cardiomiocíticas da amostra extraída do coração dos animais controles são cMSCs. Já em ratos cardiomiopáticos, a contagem de CFU-F foi em média de $6,71 \pm 0,95$ CFU-Fs/100.000 células, indicando uma maior porcentagem de cMSCs ($0,0067 \pm 0,0009\%$, $p=0,0418$) nos corações dos ratos com cardiomiopatia (Figura 5C). As figuras 5A e 5B também mostra uma fotomicrografia representativa das células dentro de cada colônia em ambos os grupos. Uma correlação positiva significativa discreta foi evidenciada entre o número de CFU-Fs no tecido e a área de fibrose observada (Figura 5D)

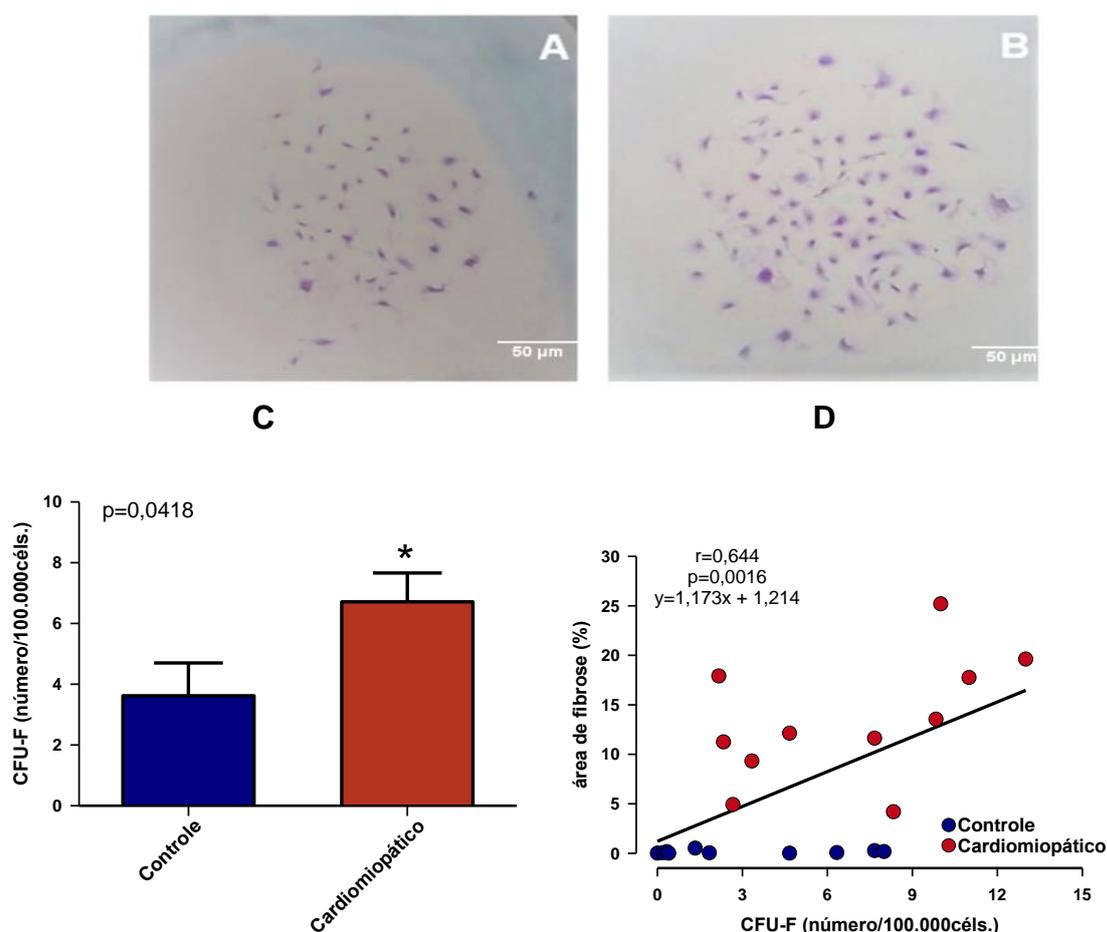


Figura 5 – Fotomicrografias de campo claro representativas das células dentro de cada colônia em ambos os grupos experimentais controle (A) e cardiomiopático (B). Em C estão mostrados os valores médios (\pm epm) das contagens de CFU-F em ambos os grupos (aumento 10x, * $p < 0,05$ versus controle). Em D está mostrado a correlação positiva significativa entre a quantidade de CFU-F no tecido e o grau de fibrose miocárdica.

3.3 PROLIFERAÇÃO CELULAR

A análise das curvas de proliferação *in vitro* das cMSC em ratos controle e cardiomiopáticos, mostradas na figura 6, demonstrou uma taxa de crescimento celular significativamente elevada em animais com cardiomiopatia em comparação com ratos controle ($p < 0,05$).

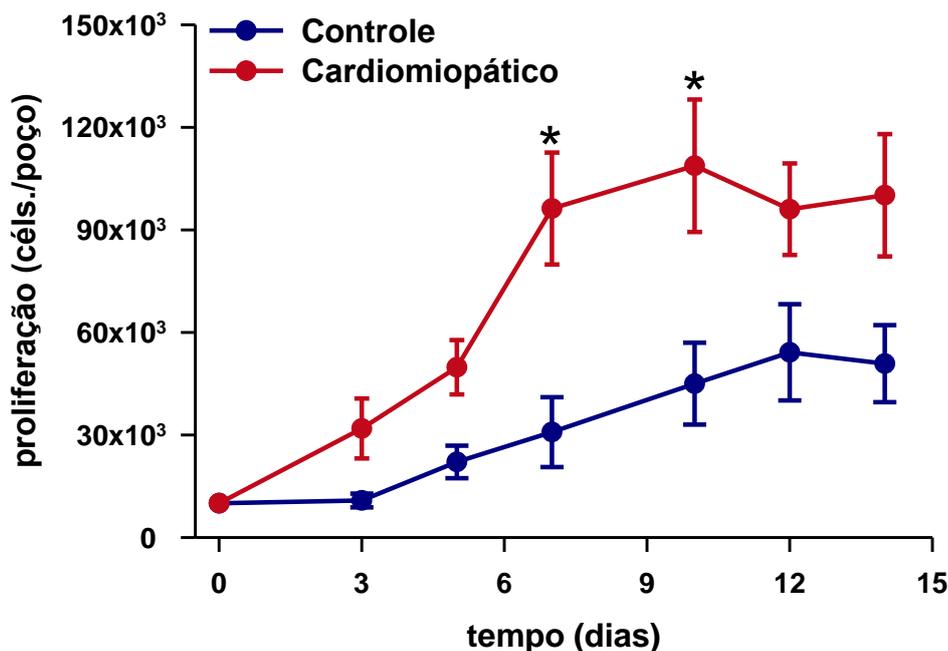


Figura 6 – Curvas de proliferação celular *in vitro* expressas como número de células crescidas/poço (\pm epm) em diferentes tempos nos dois grupos experimentais, controle e cardiomiopático. (* $p < 0,05$ versus grupo controle no tempo indicado).

3.4 DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA E ADIPOGÊNICA

A capacidade de diferenciação adipogênica (Figuras 7A e 7B) e osteogênica (Figuras 7C e 7D) *in vitro* em ratos cardiomiopáticos e controle foi qualitativa e quantitativamente analisada pela medida da área relativa (porcentagem) ocupada pela coloração específica versus a área total do campo microscópico. Como podemos observar na figura 7E, a capacidade de diferenciação adipogênica foi significativamente maior em cMSCs de ratos com cardiomiopatia em comparação com animais controle ($14,01 \pm 1,69\%$ versus $8,25 \pm 1,62\%$, respectivamente, $p = 0.0393$). Na figura 7F observa-se também que a capacidade de diferenciação osteogênica em cMSCs também foi significativamente maior em ratos com cardiomiopatia em

comparação com animais controle ($51,29 \pm 8,09\%$ versus $20,73 \pm 5,95\%$, respectivamente, $p = 0.0188$).

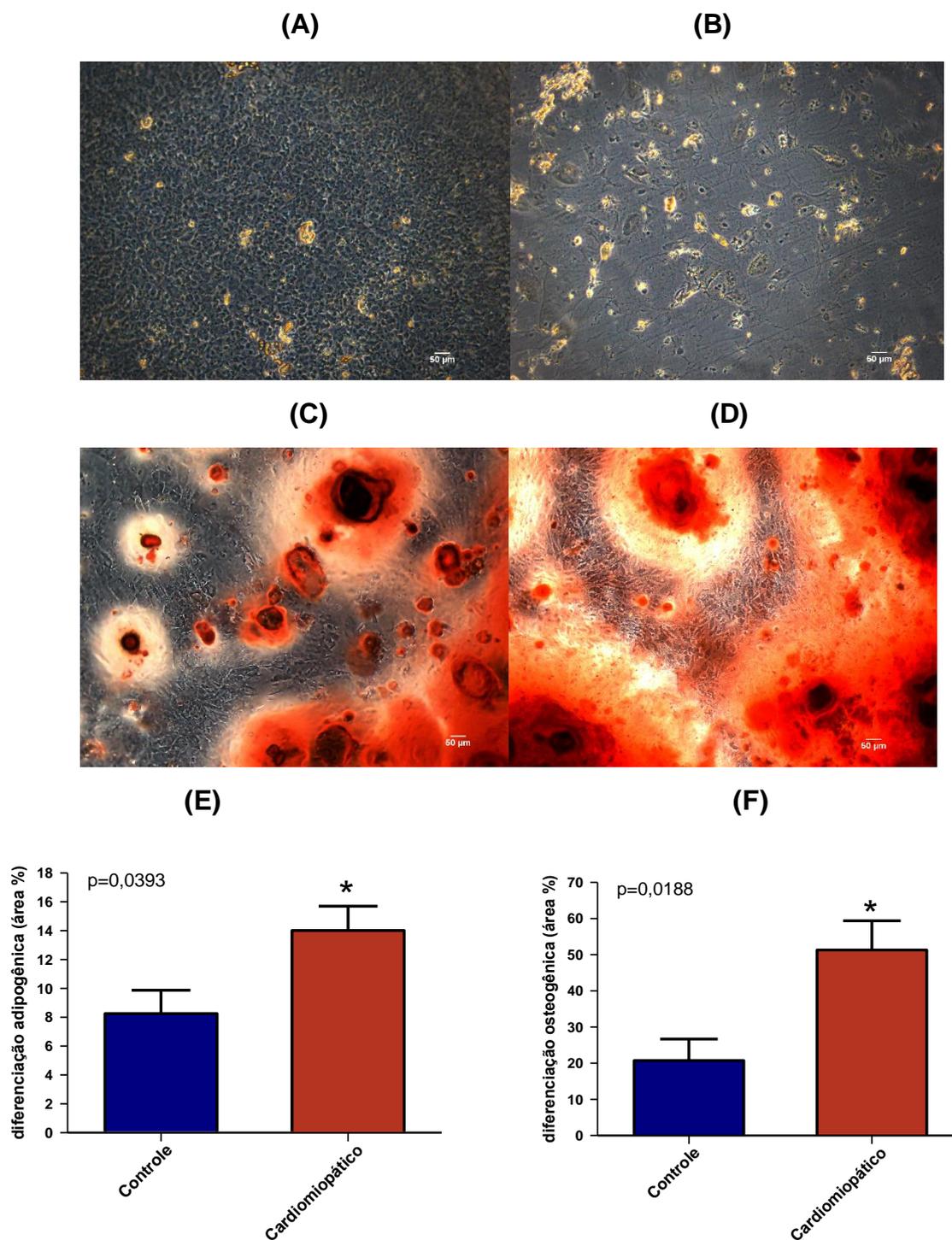


Figura 7 – Fotomicrografias de campo claro representativas das células diferenciadas em adipócitos (painéis A e B) coradas por Oil Red e em osteoblastos (painéis C e D), coradas por Alizarin Red, nos grupos controle (painéis A e C) e cardiomiopático (painéis B e D). Painéis E e F indicam as áreas do campo microscópico (\pm epm) ocupadas pelas células diferenciadas nos grupos controle e cardiomiopático, respectivamente. (p =probabilidade, $*p < 0,05$ versus grupo controle).

4 DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou, pela primeira vez, que algumas propriedades funcionais de cMSCs, incluindo quantidade, taxa de crescimento e capacidade de diferenciação adipogênica e osteogênica, são aumentadas nos corações de ratos com cardiomiopatia induzidos com isoproterenol em comparação com os ratos controles. Nossos dados de cultura de células *in vitro* sugerem que o dano cardíaco causado pela cardiomiopatia está contribuindo para o desenvolvimento dessas alterações funcionais. Além disso, levando em consideração as crescentes evidências do papel regenerativo desempenhados pelas células tronco cardíacas, incluindo as cMSCs, nossos achados sugerem que cMSCs poderiam estar implicadas na patogênese da cardiomiopatia de Takotsubo.

A administração de isoproterenol em dose elevada por dois dias consecutivos foi capaz de induzir um quadro cardiomiopático ao final de 30 dias. Este quadro foi atestado por meio de alterações eletrocardiográficas sugestivas de sobrecarga atrial esquerda (duração de onda P prolongada) e hipertrofia ventricular (intervalo QT prolongado), similares às observadas por Wexler BC, Willen D, Greenberg BP., 1974 e Bestetti *et al.*, 1987. Concomitantemente, foram também notadas alterações mecânicas significativas ao ecocardiograma, com marcada redução da fração de ejeção, caracterizando uma disfunção sistólica significativa, à semelhança do observado por Li Z *et al.*, 2004 e Willis *et al.*, 2015. Estas alterações funcionais foram acompanhadas de dilatação cardíaca ao ecocardiograma e morfometria, hipertrofia miocárdica (índice de massa cardíaca aumentado), infiltração inflamatória e fibrose miocárdica no estudo histológico, caracterizando assim um quadro manifesto de cardiomiopatia, similar ao observado por diversos autores na literatura (Stanton HC, Brenner G, Mayfield ED Jr, 1969; Rona G *et al.*, 1973; Rona G, 1985; Xiao H *et al.*, 2018; Alemasi A *et al.*, 2019), o qual é semelhante ao observado na síndrome de Takotsubo.

As cMSCs investigadas no presente estudo exibiram suas características definidoras de acordo com o indicado pela Sociedade Internacional de Terapia com Células Tronco e pelo Comitê de Células Tronco mesenquimais e teciduais (Horwitz EM *et al.*, 2005), como capacidade de aderência ao plástico, formato fibroblastóide,

capacidade clonogênica e capacidade de diferenciação osteogênica e adipogênica *in vitro* utilizando meios de diferenciações específicos, demonstrando suas propriedades multipotenciais.

Levando em consideração a cardiomiopatia evidente em nossos animais, estudamos pela primeira vez, algumas propriedades funcionais das cMSCs nos corações dos ratos com isquemia induzido por isoproterenol. Tais propriedades neste órgão, foram originalmente identificadas em 2006 por Meirelles LdaS, Chagastelles PC, Nardi NB, e em camundongos e humanos por Chong *et al.*, 2011. Esses autores descreveram vários achados do coração que compartilham muitas semelhanças funcionais e fenotípicas com as MSCs de medula óssea.

Devido a capacidade de formar colônias clonais e sua maior taxa de crescimento celular em cultura, o ensaio de CFU-F tem sido um importante aliado para quantificação do número de MSCs presente no coração, e também em outros tecidos (Scarpone *et al.*, 2019; Chong *et al.*, 2011; Meirelles LdaS, Chagastelles PC, Nardi NB, 2006). Nossos achados no presente estudo demonstraram que as células extraídas dos corações de animais cardiomiopáticos apresentaram um número significativamente maior de CFU-Fs em comparação com os aqueles isolados de animais controles, indicando uma maior quantidade de cMSCs em ratos com cardiomiopatia (0.0067% de cMSCs em ratos cardiomiopáticos versus 0.0036 % em ratos controles). Singh MK, Epstein JA, 2012, destacou que as CFU-Fs cardíacas possuem um importante potencial terapêutico no reparo do tecido cardíaco. As taxas proliferativas significativamente mais elevadas em ratos com cardiomiopatia poderia refletir uma taxa mitótica mais pronunciada dessas células *in vivo*, explicando assim o maior número de cMSCs encontrado.

Gharravi AM, 2019, observou em seu trabalho, uma melhoria no isolamento e um aumento da proliferação celular e de CFU-F, utilizando um biorreator de baixa tensão de cisalhamento com hidrogel de alginato. Por outro lado, pesquisadores sugerem que íons K^+ influenciam no sucesso da proliferação celular, podendo ainda, ser utilizado como marcador fisiológico da proliferação de células-tronco (Marakhova I *et al.*, 2019). Na diferenciação osteogênica, alguns estudos demonstram o potencial das MSCs na osteogênese, despertando interesse em ambientes clínicos e experimentais. Em relação a diferenciação adipogênica, os achados indicam que a

metilação, e outros fatores, são responsáveis pela regulação da diferenciação adipocítica das MSCs (Baker N, Sohn J. & Tuan, RS, 2015; Teven *et al.*, 2011).

Observamos um maior número de cMSCs nos tecidos cardíacos de ratos com cardiomiopatia, e também, uma maior capacidade de diferenciação adipogênica e osteogênica *in vitro*, sugerindo uma tentativa de reparação celular nos animais cardiomiopáticos, corroborando com os achados de Klopsch C *et al.*, 2017, que observaram maior capacidade de diferenciação multipotente e de expansão clonogênica das cMSCs após isquemia cardíaca. Curiosamente, De Paula DRM *et al.*, 2017, observaram uma menor capacidade de diferenciação adipogênica e osteogênica em ratos diabéticos, sugerindo que tais células podem sofrer influências pela hiperglicemia / hipoinsulinemia no metabolismo energético desses animais. A correlação positiva significativa, ainda que discreta, entre o número de CFU-Fs no tecido e o grau de fibrose miocárdica observada neste modelo de cardiomiopatia pode também sugerir uma maior tendência das cMSCs se diferenciarem em fibroblastos, o que poderia então estar contribuindo para patogênese da fibrose, à semelhança do observado em ratos com cardiomiopatia diabética (De Paula *et al.* 2017).

Diversas pesquisas utilizando as MSCs têm demonstrado benefícios em inúmeras doenças. Podemos destacar: na hipertensão arterial sistêmica (De Oliveira LF *et al.*, 2015), na doença de Parkinson (Berrío Sánchez J *et al.*, 2019), doenças de pele (Golchin A *et al.*, 2019), doenças inflamatórias intestinais (Markovic BS *et al.*, 2018), doenças do fígado (Lou G *et al.*, 2017), doenças da retina (Ding SLS, Kumar S, Mok PL, 2017), doenças reumáticas (Cosenza S *et al.*, 2017), doenças musculares (Lee NK, Na DL, Chang JW, 2018), osteoartrites (Harrell CR *et al.*, 2019), doenças tumorais (Mohr A; Zwacka R, 2018), doença de Alzheimer (Wang SS, Jia J, Wang Z, 2018), doença de Crohn (Ibraheim H *et al.*, 2018), nas doenças cardiovasculares (Terashvili M, Bosnjak ZJ, 2019), entre outras.

Na literatura existem vários trabalhos demonstrando a utilização das MSCs como tratamento, possibilitando melhorias na função cardíaca. Natsumeda M *et al.* (2017), utilizou MSCs autólogas em combinação com células-tronco cardíacas e trataram suínos com cardiomiopatia isquêmica e obtiveram uma melhor regeneração cardíaca e recuperação funcional do ventrículo esquerdo, sem reação imunológica adversa. Adicionalmente, os exossomos derivados de MSCs aumentaram a proliferação e a capacidade angiogênica, sugerindo a utilização dessa

população de células para promover o reparo cardíaco (Shao L *et al.*, 2017; Zhang Z *et al.*, 2016). Curiosamente, a combinação de eNOS (óxido nítrico sintase endotelial) superexpresso e de MSCs apresentaram dados significativos em ratos com infarto do miocárdio, a combinação pode ser uma abordagem potencial para o reparo cardíaco (Chen L *et al.*, 2017).

A utilização da droga isoproterenol em nosso estudo é devido a sua eficácia em causar cardiomiopatia em modelos animais. Existem diversos estudos disponíveis na literatura empregando o mesmo modelo. Em 2015, Taghavi H, *et al.*, induziram cardiopatia com isoproterenol em felinos e tratou esses animais com MSC e células tronco c-Kit+, obtendo melhoria na função cardíaca e atenuando remodelamento patológico. Gaafar T *et al.*, 2017, utilizaram isoproterenol em ratos para causar cardiomiopatia e depois trataram com as MSC derivada de geléia de Wharton humano, promovendo uma melhor proteção cardíaca e uma redução da mortalidade.

Ao simular a cardiomiopatia de Takotsubo, nossos dados empregando ratos com cardiomiopatia induzida pelo isoproterenol indicam de forma inédita um perfil funcional exacerbado das cMSCs, com maior quantidade, proliferação e diferenciação celular, permitindo um melhor entendimento em nível celular e uma eventual contribuição para um possível novo alvo terapêutico. Diante disso, podemos perceber a necessidade de conhecimentos dessa população de células como modelo norteador para o desenvolvimento de tratamentos em diversas doenças do coração.

Em conclusão, o estudo mostra pela primeira vez, em ratos com cardiomiopatia induzido por isoproterenol, que as cMSCs estão presente em maior número no tecido cardíaco, demonstrando um maior crescimento celular, exibindo uma capacidade de diferenciação aumentada no tecido cardíaco lesado. Estas alterações nas características funcionais e proliferativas das cMSCs podem estar implicadas na fisiopatologia da cardiomiopatia de Takotsubo.

REFERÊNCIAS

- Ahearne M, Lysaght J, Lynch A. Combined influence of basal media and fibroblast growth factor on the expansion and differentiation capabilities of adipose-derived stem cells. *Cell Regeneration*, 2014; 1-8.
- Alemasi A, Cao N, An X, Wu J, Gu H, Yu H, Song Y, Wang H, Zhang Y, Xiao H, Gao W. Exercise Attenuates Acute β -Adrenergic Overactivation-Induced Cardiac Fibrosis by Modulating Cytokines. *J Cardiovasc Transl Res*. 2019. doi: 10.1007/s12265-019-09894-1.
- Armuli A, Genové G, Betsholtz C. Precytes: Developmental, Physiological, and Pathological Perspectives, Problems, and Promises. *Develop Cell*, 2011; 21: 193-215.
- Avolio E, Madeddu P. Discovering cardiac pericytes biology: From Physiopathological mechanisms to potential therapeutic applications in ischemic heart disease. *Vasc Pharmacol*, 2016; 1-11
- Baker N., Sohn J. & Tuan, RS. Promotion of human mesenchymal stem cell osteogenesis by PI3-kinase/Akt signaling, and the influence of caveolin-1/cholesterol homeostasis. *Stem Cell Research & Therapy*. 2015; 6, 238.
- Berrío Sánchez J, CucarianHurtado J, Barcos Nunes R, de Oliveira AA. Mesenchymal stem cell transplantation and aerobic exercise for Parkinson's disease: therapeutic assets beyond the motor domain. *Rev Neurosci*. 2019 Jan 28;30(2):165-178. doi: 10.1515/revneuro-2018-0011.
- Bestetti RB, Ramos CP, Figuerêdo-Silva J, Sales-Neto VN, Oliveira JS. Ability of the electrocardiogram to detect myocardial lesions in isoproterenol induced rat cardiomyopathy. *Cardiovasc Res*. 1987; 21(12): 916-921.
- Behbahan IS, Keating A, Gale RP. Bone Marrow Therapies for Chronic Heart Disease. *Stem Cells*. 2015; 33: 3212-3227.
- Budnik M, Kucharz J, Wiechno P, Demkow T, Kochanowski J, Górska E, Opolski G. Chemotherapy-Induced Takotsubo Syndrome. In: Pokorski M. (eds) *Clinical Pulmonary Research. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 1114. Springer, Cham. 2018. 19-29.
- Chen L, Zhang Y, Tao L, Yang Z, Wang L. Mesenchymal Stem Cells with eNOS Over-Expression Enhance Cardiac Repair in Rats with Myocardial Infarction. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2017 Feb;31(1):9-18.
- Chong JJH, Chandrakanthan V, Xaymardan M, Asli NS, Li J, Ahmed I, Heffernan C, Menon MK, Scarlett CJ, Rashidianfar A, Biben C, Zoellner H, Colvin EK, Pimanda JE, Biankin AV, Zhou B, Pu WT, Prall OWJ, Harvey RP. Adult Cardiac-Resident MSC-like Stem Cells with a Proepicardial Origin. *Cell Stem Cell*; 2011; 9: 527-540.

Cosenza S, Ruiz M, Maumus M, Jorgensen C, Noël D. Pathogenic or Therapeutic Extracellular Vesicles in Rheumatic Diseases: Role of Mesenchymal Stem Cell Derived Vesicles. *Int J Mol Sci.* 2017;18(4). pii: E889.

Daneshmandi S, Karimi MH, Porfathollah AA. TGF- β engineered mesenchymal stem cells (TGF- β /MSCs) for treatment of Type 1 diabetes (T1D) mice model. *Int immunopharmacol*, 2017; 44: 191-196.

Dominici M, Blanc KLE, Mueller I, Slaper-cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz E M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006; 8: 315–317.

De Oliveira LF, Almeida TR, Machado MPR, Cuba MB, Alves AC, Da Silva MC, Rodrigues Júnior V, Da Silva VJD. Priming Mesenchymal Stem Cells with endothelial growth medium boosts stem cell therapy for systemic arterial hypertension. *Stem Cells International.* 25. 2015: 6885383.1-12.

De Paula DRM, Capuano V, Filho DM, Carneiro ACDM, de Oliveira Crema V, deOliveira LF, Rodrigues ARA, Montano N, da Silva VJD. Biological properties of cardiac mesenchymal stem cells in rats with diabetic cardiomyopathy. *Life Sci.* 2017; 188:45-52.

Deshmukh A, Kumar G, Pant S, Rihal C, Murugiah K, Mehta JL. Prevalência de cardiomiopatia Takotsubo nos Estados Unidos. *Estados-Membros. Am Heart J.* 2012; 164: 66-71.

Ding SLS, Kumar S, Mok PL. Cellular Reparative Mechanisms of Mesenchymal Stem Cells for Retinal Diseases. *Int J Mol Sci.* 2017Jul 28;18(8). pii: E1406.

Dote K, Sato H, Tateishi H, Uchida T, Ishihara M. Myocardial stunning due to simultaneous multivessel coronary spasms: a review of 5 cases, *J. Cardiol.* 21. 1991; 203–214.

Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 1981; 292(5819):154-156.

Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morph*, 1966; 16(3): 381-390.

Gaafar T, Attia W, Mahmoud S, Sabry D, Aziz OA, Rasheed D, Hamza H. Cardioprotective Effects of Wharton Jelly Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation in a Rodent Model of Myocardial Injury. *Int J Stem Cells.* 2017;10(1):48-59.

Gassanov N, Le MT, Gaglayan E, Hellmich M, Erdmann E. Novel ECG-based scoring tool for prediction of takotsubo syndrome. *Clinical Research In Cardiology.* 2019. 108:68-73.

Germanguz I, Sedan O, Zeevi-Levin N, Shtrichman R, Barak E, Ziskind A, Eliyahu S,

Meiry G, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Binah O. Molecular characterization and functional properties of cardiomyocytes derived from human inducible pluripotent stem cells. *Stem Cell*. 2011; 15: 38-51.

Gharravi AM. Encapsulated explant in novel low shear perfusion bioreactor improve cellisolation, expansion and colony forming unit. *Cell Tissue Bank*. 2019.

Golchin A, Farahany TZ, Khojasteh A, Soleimanifar F, Ardeshiryajimi A. The Clinical Trials of Mesenchymal Stem Cell Therapy in Skin Diseases: An Update and Concise Review. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2019;14(1):22-33.

Gulsini G, Serna S, Moris C, Taher A, Loke I. Takotsubo cardiomyopathy with left ventricular thrombus preseting as critical limb ischaemia. *Oxford Medical Case Reports*. 2016; 8: 195-198.

Harrell CR, Markovic BS, Fellabaum C, Arsenijevic A, Volarevic V. Mesenchymal stem cell-based therapy of osteoarthritis: Current knowledge and future perspectives. *Biomed Pharmacother*. 2019 Jan;109: 2318-2326.

Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, *et al*. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005; 7(5): 393–395.

Ibraheim H, Giacomini C, Kassam Z, Dazzi F, Powell N. Advances in mesenchymal stromal cell therapy in the management of Crohn's disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018;12(2):141-153.

Internationa Takotsubo Registry (InterTAK Registry) (Inter TAK). U.S. National Library of Medicine. Clinical Trials. Gov. 2014. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01947621>>.

Inui S, Minami K, Ito E, Imaizumi H, Mori S, Koizumi M, Fukushima S, Miyagawa S, Sawa Y, Matsuura N. Irradiation strongly reduces tumorigenesis of humanan induced pluripotent stem cells. *J Rad Res*. 2017: 1-9.

Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D, Eden A, Yanuka O, Amit M, Soreq H, Benvenisty N. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol Med*. 2000 (6): 88-95.

Kawamura M, Miyagawa S, Miki K, Saito A, Fkushima S, Higuchi T, Kawamura T, Kuratani T, Daimon T, Shimizu T, Okano T, Sawa Y. Feasibility, safety, and therapeutic efficacy of human induced pluripotent stem cell- derived cardiomyocyte sheets in porcine ischemic cardiomyopathy model. *Circulation*. 2012: S29-S37.

Klopsch C, Skorska A, Ludwig M, Gaebel R, Lemcke H, Kleiner G, Beyer M, Vollmar B, David R, Steinhoff G. Cardiac Mesenchymal Stem Cells Proliferate Early in the Ischemic Heart. *Eur Surg Res*. 2017; 58(5-6):341-353.

Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose

Tissue. *Stem Cells*, 2006; 24: 1294-1301.

Lang RM, Badano LP, Mor-Avi V, Afilalo J, Armstrong A, Ernande L, Flachkampf FA, Foster E, Goldstein AS, Kuznetsova T, Lancellotti P, Muraru D, Picard MH, Ritzshel ER, Rudski L, Spencer KT, Tsang W, Voigt JU. Recommendations for Cardiac Chamber Quantification by Echocardiography in Adults: An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *J Am Soc Echocard*. 2002; 28 (1): 1-39.

Lee NK, Na DL, Chang JW. Killing two birds with one stone: The multifunctional roles of mesenchymal stem cells in the treatment of neurodegenerative and muscle diseases. *Histol Histopathol*. 2018; 33(7):629-638.

Leite CF, Almeida TR, Lopes CS, Silva VJD. Multipotent stem cells of the heart- do they have therapeutic promise? *Front Physiol*, 2015; 6: 1-17.

Li Z, Tran TT, Ma JY, O'Young G, Kapoun AM, Chakravarty S, Dugar S, Schreiner G, Protter AA. p38 alpha mitogen-activated protein kinase inhibition improves cardiac function and reduces myocardial damage in isoproterenol-induced acute myocardial injury in rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004; 44(4): 486-492.

Lou G, Chen Z, Zheng M, Liu Y. Mesenchymal stem cell-derived exosomes as a new therapeutic strategy for liver diseases. *Exp Mol Med*. 2017; 49(6): e346.

Marakhova I, Domnina A, Shatrova A, Borodkina A, Burova E, Pugovkina N, Zemelko V, Nikolsky N. Proliferation-related changes in K⁺ content in human mesenchymal stem cells. *Sci Rep*. 2019; 9(1):346.

Markovic BS, Kanjevac T, Harrell CR, Gazdic M, Fellabaum C, Arsenijevic N, Volarevic V. Molecular and Cellular Mechanisms Involved in Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy of Inflammatory Bowel Diseases. *Stem Cell Rev*. 2018; 14(2):153-165.

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

Meirelles LdaS, Nardi NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Brit J Hematol*. 2003; 123:702-711.

Mejiá-Rentería HD, Núñez-Gil IJ. Takotsubo syndrome: Advances in the understanding and management of an enigmatic stress cardiomyopathy. *World J Cardiol*. 2016; 8(7): 413-424.

Merino B, Quesada I, Hernández-Cascales J. Glucagon Increases beating rate but not contractility in rat right atrium. Comparison with isoproterenol. *PLOS ONE*. 2015: 1-17.

Mohr A, Zwacka R. The future of mesenchymal stem cell-based therapeutic approaches for cancer – From cells to ghosts. *Cancer Lett*. 2018; 414:239-249.

Naegele M, Flammer AJ, Enseleit F, Roas S, Frank M, Hirt A, Kaiser P, Cantatore S, Templin C, Fröhlich, Romanens M, Lüscher TF, Ruschitzka F, Noll G, Sudano I. Endothelial function and sympathetic nervous system activity in patients with Takotsubo syndrome. *Int J Cardiol.* 2016; 224: 226-230.

Natsumeda M, Florea V, Rieger AC, Tompkins BA, Banerjee MN, Golpanian S, Fritsch J, Landin AM, Kashikar ND, Karantalis V, Loescher VY, Hatzistergos KE, Bagno L, Sanina C, Mushtaq M, Rodriguez J, Rosado M, Wolf A, Collon K, Vincent L, Kanelidis AJ, Schulman IH, Mitrani R, Heldman AW, Balkan W, Hare JM. A Combination of Allogeneic Stem Cells Promotes Cardiac Regeneration. *J Am Coll Cardiol.* 2017; 70(20):2504-2515.doi:10.1016/j.jacc.2017.09.036

Organização Mundial de Saúde (OMS). Ficha de informação- Doenças cardiovasculares, 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>>.

Patel DK, Desai SN, Gandhi HP, Devkar RV, Ramachadran AV. Cardio protective effect of *Coriadrum sativum l.* on isoproterenol induced myocardial necrosis in rats. *Food Chem Toxicol.* 2012; 50: 3120-3125.

Prasad A, Lerman A, Rihal CS. Apical ballooning syndrome (Takotsubo or stress cardiomyopathy): a mimic of acute myocardial infarction. *Am Heart J.* 2008; 155:408-417.

Reis JVG, Rosas G. Cardiomiopatia de Takotsubo: um diagnóstico diferencial da síndrome coronariana aguda: revisão de literatura. *Rev Med Minas Gerais.* 2010;20(4): 594-600.

Riba A, Deres L, Eros K, Szabo A, Magyar K, Sumegi B, Toth K, Halmosi R, Szabados E. Doxycycline protects against ROS-induced mitochondrial fragmentation and ISSO- induced heart failure. *PLOS ONE.* 2017: 1-16.

Rihl MF, Haas P, Holthausen RS. Takotsubo Cardiomyopathy: Case Report. *Rev AMRIGS.* 2015; 59(1): 30-34.

Rohban R, Pierber TR. Mesenchymal stem and progenitor cells in regeneration: tissue specificity and regenerative potential. *Stem Cells Int.* 2017; 2017:5173732.

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

Rona G. Catecholamine cardiotoxicity. *J Mol Cell Cardiol.* 1985; 17(4):291-306.

Sato H, Tateishi H, Uchida T. Takotsubo-type cardiomyopathy due to multivessel spasm. In: Kodama K, Haze K, Hon M, editors. *Clinical aspects of myocardial injury: from ischemia to heart failure.* Tokyo: Kagakuhyouronsya Publishing Co.; 1990; 56–64.

Scarpone M, Kuebler D, Chambers A, Filippo CM, Amatuzio M, Ichim TE, Patel A,

Caradonna E. Isolation of clinically relevant concentrations of bone marrow mesenchymal stem cells without centrifugation. *J Transl Med.* 2019; 17:10.

Shao L, Zhang Y, Lan B, Wang J, Zhang Z, Zhang L, Xiao P, Meng Q, Geng YJ, Yu XY, Li Y. MiRNA-Sequence Indicates That Mesenchymal Stem Cells and Exosomes Have Similar Mechanism to Enhance Cardiac Repair. *Biomed Res Int.* 2017;1-9.

Singh MK, Epstein JA. Epicardium-derived cardiac mesenchymal stem cells: expanding the outer limit of heart repair. *Circ Res.* 2012; 110: 904-906.

Stanton HC, Brenner G, Mayfield ED Jr. Studies on isoproterenol-induced cardiomegaly in rats. *Am Heart J.* 1969;77(1):72-80.

Taghavi S, Sharp TE III, Duran JM, Makarewich CA, Berretta RM, Starosta T, Kubo H, Barbe M, Houser SR. Autologous c-Kit⁺ Mesenchymal Stem Cell Injections Provide Superior Therapeutic Benefit as Compared to c-Kit⁺ Cardiac-Derived Stem Cells in a Feline Model of Isoproterenol-Induced Cardiomyopathy. *Clin Transl Sci.* 2015; 8(5):425-31.

Takahashi T, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006; 126: 663-676.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Naritta M, Ischisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell.* 2007; 131: 861-872.

Terashvili M, Bosnjak ZJ. Stem Cell Therapies in Cardiovascular Disease. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2019; 33(1):209-222.

Teven CM, Liu X, Hu N, Tang N, Kim SH, Huang E, Yang K, Li M, Gao JL, Liu H, *et al.* Epigenetic regulation of mesenchymal stem cells: a focus on osteogenic and adipogenic differentiation. *Stem Cells International.* 2011. doi:10.4061/2011/201371:1-18.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998;282(5391):1145-1147.

Tohyama S, Tanasaki S, Someya S, Fujita J, Fukuda K. Manipulation of pluripotent stem cell metabolism for clinical application. *Curr Stem Cell Rep.* 2017; 3: 28-34.

Wang SS, Jia J, Wang Z. Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Suppresses iNOS Expression and Ameliorates Neural Impairment in Alzheimer's Disease Mice. *J Alzheimers Dis.* 2018; 61(3):1005-1013.

Wexler BC, Willen D, Greenberg BP. Progressive electrocardiographic changes in male and female arteriosclerotic and non-arteriosclerotic rats during the course of isoproterenol-induced myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 1974; 8(4):460-8.

Willis BC, Salazar-Cantú A, Silva-Platas C, Fernández-Sada E, Villegas CA, Rios-

Argaiz E, González-Serrano P, Sánchez LA, Guerrero-Beltrán CE, García N, Torre-Amione G, García-Rivas GJ, Altamirano J. Impaired oxidative metabolism and calcium mishandling underlie cardiac dysfunction in a rat model of post-acute isoproterenol-induced cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015; 308(5):H467-H477.

Xiao H, Li H, Wang JJ, Zhang JS, Shen J, An XB, Zhang CC, Wu JM, Song Y, Wang XY, *et al*. IL-18 cleavage triggers cardiac inflammation and fibrosis upon β -adrenergic insult. *Eur Heart J*. 2018; 39(1):60-69.

Zhang Z, Yang J, Yan W, Li Y, Shen Z, Asahara T. Pretreatment of Cardiac Stem Cells With Exosomes Derived From Mesenchymal Stem Cells Enhances Myocardial Repair. *J Am Heart Assoc*. 2016; 5(1). e002856.

APÊNDICE A – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO

16/06/2019

A manuscript number has been assigned - LFS-D-19-02162

De: "Loren Wold" <eesserver@eesmail.elsevier.com>
Assunto: A manuscript number has been assigned - LFS-D-19-02162
Data: Dom, Junho 16, 2019 23:56
Para: valdo@mednet.com.br, valdo@pq.cnpq.br

*** Automated email sent by the system ***

Dear Dr. Dias da Silva,

Your submission entitled "BIOLOGICAL PROPERTIES OF CARDIAC MESENCHYMAL STEM CELLS IN A RAT MODEL OF HYPERADRENERGIC CARDIOMYOPATHY" has been assigned the following manuscript number: LFS-D-19-02162.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial Systems as an author.
The URL is <https://ees.elsevier.com/lfs/>.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Life Sciences

APÊNDICE B - SUPORTE FINANCEIRO

Este estudo foi financiado em parte pelo Programa de Apoio a Pós-Graduação (PAPG) da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) - via bolsa de mestrado para DCN.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior –Brasil (CAPES) -Código de Financiamento 001.

APÊNDICE C - CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Dôuglas Caixeta Nunes: Aluno de mestrado, participação em todas as etapas e protocolos.

Thais Soares Farnesi De Assunção, Lucas Felipe de Oliveira e Rhana Carla RuziskaTondato: Auxílio nos protocolos de cultivo de células.

Diógenes Rodrigo Maronezzi De Paula e Vanessa Capuano: Auxílio nos protocolos de eletro- e ecocardiografia.

Virgínia Oliveira Crema e Lorraine Stephanie Hiss: Auxílio na etapa de histologia.

Valdo José Dias Da Silva: Orientador e coordenador do projeto