

Homing Miocárdico após Infusão Intrapericárdica de Células Mononucleares de Medula Óssea

Myocardial Homing after Intrapericardial Infusion of Bone Marrow Mononuclear Cells

Érika Branco¹, Emerson Ticona Fioretto², Rosa Cabral³, Carlos Alberto Sarmiento Palmera⁴, Guilherme Buzon Gregores⁴, Angelo João Stopiglia⁴, Paulo César Maiorka⁴, Pedro Alves Lemos⁵, Carlos Campos⁵, Celso Takimura⁵, José Antônio Franchini Ramires⁵, Maria Angelica Miglino⁴

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA¹, Belém, PA; Universidade Federal do Sergipe – UFS², Aracaju, SE; Universidade Feral do Piauí – UFPI³, Teresina, PI; Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia FMVZ/USP⁴, São Paulo, SP; Instituto do Coração – Incor⁵, São Paulo, SP, Brasil

Introdução

Células-tronco têm sido utilizadas no tratamento de doenças cardíacas, estando relacionadas à possível neovascularização e formação de tecido¹. O transplante de células-tronco tem sido realizado através das técnicas intracoronária, intramiocárdica, e de infusão retrógrada²⁻⁴; entretanto, ela apresenta limitações e tem aplicação reduzida na prática clínica.

Estudos anteriores testaram o espaço pericárdico para administração de fármacos⁵. Em teoria, a abordagem transpericárdica apresenta vantagens potenciais para a administração de células, incluindo a característica não-vascular do saco pericárdico, o que pode permitir procedimentos repetidos. O espaço pericárdico pode servir como um compartimento de armazenagem, dessa forma aumentando a biodisponibilidade local das células infundidas. Entretanto, a abordagem transpericárdica para terapia de células-tronco tem sido pouco explorada.

Este estudo preliminar avalia se a administração de Células Mononucleares de Medula Óssea (CMMO) autólogas no saco pericárdico resulta em *homing* das células miocárdicas nos casos controle e com infarto do miocárdio induzido.

Métodos

Desenho do Estudo

O presente estudo objetivou avaliar se o *homing* das células miocárdicas ocorre após a injeção de CMMO autólogas no espaço pericárdico. Sete porcas domésticas foram divididas em dois grupos: infarto do miocárdio induzido (n=3) e não-infarto do miocárdio (n=3). Um animal do grupo infarto do miocárdio induzido morreu antes da injeção de CMMO. Os

animais foram sacrificados para exame do coração 21 dias após a injeção de CMMO. Os protocolos do estudo foram aprovados pelo Comitê de Bioética local.

Coleta da Amostra de Medula Óssea e Separação e Marcação de Células

Os animais foram pré-medicados com cloridrato de quetamina intramuscular (5mg/kg) e Midazolam (0,5 mg/kg). A indução foi realizada com propofol IV (5mg/kg) e a manutenção com isoflurano. Uma amostra de 60 mL de aspirado de medula óssea foi obtida utilizando-se uma agulha para punção óssea introduzida na crista ilíaca.

O aspirado de medula óssea foi diluído em solução salina e as CMMO foram separadas por gradiente de densidade utilizando-se Ficoll-Paque™ Plus® (Amersham Pharmacia). Após 20 minutos de centrifugação a 2.000 rpm (20°C), formou-se um halo de CMMO. As células da medula óssea foram aspiradas e adicionadas à solução salina para posterior centrifugação (7 minutos a 2.000 rpm e 20°C). O aglomerado de células foi suspenso em solução salina e filtrado em um Mesh de Aço Inoxidável. O filtrado foi re-suspenso em solução salina e re-centrifugado como descrito acima. Uma alíquota da solução foi submetida à coloração com azul-de-tripran e avaliada em uma câmara de Neubauer para determinar viabilidade. Separamos um total de 10⁸ células, as quais foram marcadas com 1ml Hoechst 33342 (Invitrogen/H1399, Brasil) e incubadas em banho-maria por 30 minutos a 37°C.

Técnica de Infusão Intrapericárdica

O espaço pericárdico foi acessado através da região sub-xifóide usando uma agulha de epidural (Figura 1). A agulha foi avançada sob orientação fluoroscópica até ultrapassar o pericárdio parietal. A posição da extremidade da agulha no saco pericárdico foi radiograficamente confirmada através da infusão de contraste iodado diluído. Uma vez no espaço pericárdico, um total de 10⁸ de CMMO coradas com Hoechst® diluídas em 10 ml de solução salina foi injetado.

Infarto Agudo do Miocárdio Experimental

Segundo as descrições anteriores⁶, um infarto agudo do miocárdio foi induzido em 3 animais imediatamente antes da injeção de CMMO. Após o acesso da artéria femoral através de dissecação romba, um cateter-guia 6F de Judkins

Palavras chave

Células-Tronco, Infarto do Miocárdio, Pericárdio.

Correspondência: Érika Branco •

Av. Pte. Tancredo Neves, 2501 – Montese - 66077-530 – Caixa Postal: 917- Belém – PA - Brasil
E-mail: erika.branco@ufra.edu.br
Artigo recebido em 09/07/08; revisado recebido 21/10/08; aceito em 21/10/08.

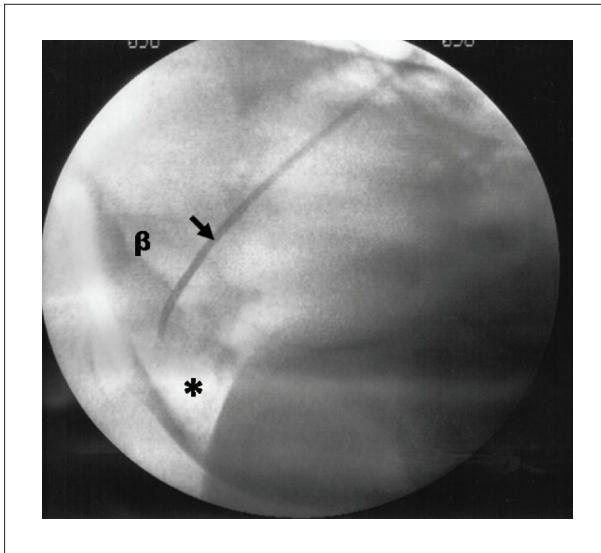


Figura 1: Local de infusão das células mononucleares da medula óssea de acordo com (espaço pericárdico-*) e visualização para o fluoroscópio. Epidural por punção (seta vermelha) e contraste iodado (β).

foi manipulado sob orientação fluoroscópica até a coronária esquerda e seletivamente canulado. Um fio guia de 0,014" foi inserido na artéria descendente anterior esquerda, sobre o qual um cateter-balão foi posicionado exatamente distal à origem do primeiro ramo diagonal. Um infarto agudo do miocárdio da parede anterior foi induzido através da oclusão total da artéria por um período de 45 minutos.

Os animais foram sacrificados após 21 dias. O coração foi removido e os ventrículos separados dos átrios no nível do sulco atrioventricular. Os ventrículos foram fatiados e os fragmentos coletados para análise das regiões basal, medial e apical. As amostras foram processadas para microscopia ótica padrão e análise imunohistoquímica. Os fragmentos utilizados na análise imunohistoquímica foram embebidos em uma solução de 3 partes de PBS e 7 partes de glicerol e crio-preservedas em nitrogênio e armazenadas em um freezer a -80°C . As análises foram realizadas em fatias congeladas usando-se um microscópio epifluorescente (microscópio Leica® DM 50). O *homing* miocárdico das CMMO foi estimado pelo número total de células coradas por Hoechst® presentes no miocárdio ventricular.

Análise estatística

Variáveis contínuas são apresentadas como média \pm desvio-padrão e variáveis discretas como quantidades e porcentagens. O teste T de Student foi utilizado para comparar a contagem de células entre os grupos do estudo.

Resultados

Resultados agudos

Uma morte experimental ocorreu no grupo de infarto induzido devido à fibrilação ventricular durante o inflar do balão. O animal morreu antes da administração das CMMO

e não foi considerado na análise. Todos os outros 6 animais completaram o procedimento sem complicações.

O acesso ao espaço pericárdico foi realizado sem intercorrências e a dose completa das CMMO foi administrada em todos os casos. Não houve complicações decorrentes da punção, perfuração da câmara cardíaca, arritmia ou instabilidade hemodinâmica durante a manipulação intrapericárdica e infusão das células.

Seguimento de 21 dias

Não houve mortes pós-procedimento. Todos os animais sobreviveram ao procedimento índice, completando o protocolo de 21 dias do estudo sem eventos adversos ou sinais de insuficiência cardíaca.

Em todos os animais, a superfície pericárdica parecia normal à inspeção visual, sem depósitos de fibrina, fibrose, aderências ou neovascularizações visíveis. Nos animais com infarto induzido, uma cicatriz miocárdica era claramente identificável na parede anteroapical.

Em ambos os grupos (infartado e não-infartado), a avaliação microscópica mostrou uma média de 109.494 ± 46.505 CMMO em *homing* miocárdico. Além disso, o *homing* miocárdico era significativamente mais pronunciado no grupo com infarto do que no grupo sem infarto (150.342 ± 22.456 vs. 68.645 ± 19.421 ; $p < 0,01$). Os graus de penetração das CMMO no miocárdio variaram no coração inteiro. Uma maior penetração de CMMO no miocárdio ocorreu na área infartada. As CMMO foram observadas aderidas ao epitélio da parede de pequenos vasos na área infartada (Figura 2). Pequenas quantidades de CMMO foram vistas no epicárdio e miocárdio nos animais do grupo controle (Figura 2).

Discussão

Em nosso estudo preliminar, demonstramos que a administração intrapericárdica é capaz de induzir o *homing* miocárdico de CMMO em suínos. Além disso, após 21 dias, o *homing* das células foi mais extenso nos animais com infarto agudo do miocárdio induzido.

Nossos resultados sugerem que as CMMO são capazes de penetrar no miocárdio, através do pericárdio visceral, após a sua administração no espaço pericárdico. Nossos achados são similares àqueles descritos para as técnicas intracoronária, retrógrada e intramiocárdica^{6,7}. Entretanto, a injeção intrapericárdica apresenta características que podem traduzir-se em vantagens para o uso clínico, relacionadas à sua natureza minimamente invasiva e a não-necessidade de entrada arterial. A segurança do acesso transpericárdico foi relatada anteriormente para outras aplicações, muito embora o treinamento em punção cardíaca seja altamente necessário. Entretanto, a abordagem transpericárdica pode teoricamente ser pelo menos tão segura quanto a administração intramiocárdica de células comumente relatada⁸. Além disso, os custos da aplicação da técnica transpericárdica são mais baixos do que as técnicas intracoronária, retrógrada e intramiocárdica^{3,9}.

Tem sido relatado que o fluido pericárdico tem uma baixa taxa de *turnover*, indicando a potencialidade do

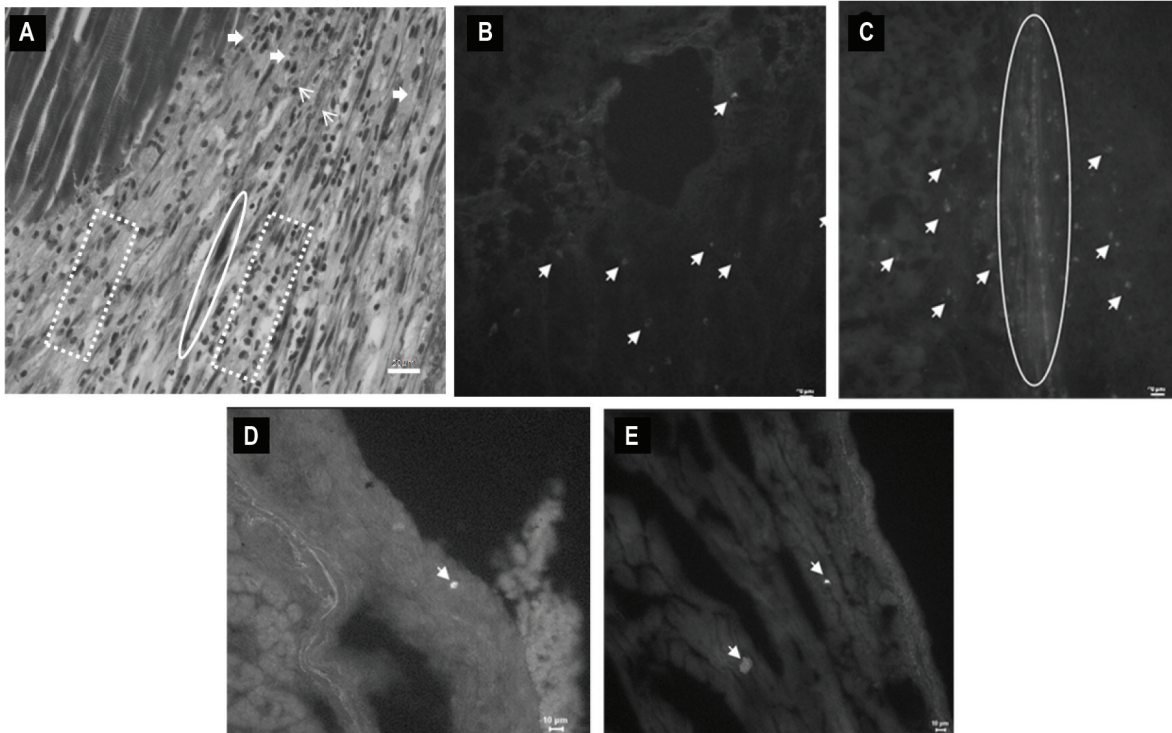


Figura 2 : Fotomicrografia do coração de animal 21 dias pós-infarto agudo do miocárdio mostrando em A: Note o tecido granular no tecido cardíaco, contendo fibras cardíacas longitudinais parcialmente integrais (círculo). Observe uma organização fibrótica imatura com formação de neovaso (seta fina), deposição de matriz extracelular (fibras verticais não-polimerizadas de colágeno) (seta grossa), fibroblastos e infiltrado inflamatório mononuclear moderado (retângulo pontilhado). Coloração: tricromo de Masson. Escala das barras: 20µm. B e C: Animais infartados: coloração de Hoechst® positiva nas células mononucleares de medula óssea no interstício miocárdico (setas) e homing de CMMO na parede do vaso (elipse). Coloração: Azul de Evans. Escala das barras: 10µm (A), 20µm (B). D e E: Animais-controle: coloração tricromo de Masson positiva no epicárdio, interstício miocárdico (setas). Coloração: Azul de Evans. Escala das barras: 10µm (A).

espaço pericárdico em funcionar como um reservatório para a liberação retardada de agentes farmacológicos, que podem ser administrados em altas concentrações sem efeitos sistêmicos^{5,10}. Consequentemente, a capacidade de armazenagem do espaço pericárdico pode se mostrar benéfica para a terapia celular, pois prolonga a biodisponibilidade das células viáveis para penetração miocárdica.

Em nosso estudo, observamos uma penetração difusa das CMMO através do miocárdio, o que contrasta com a natureza mais localizada das técnicas intracoronária, intramiocárdica ou retrógrada^{3,7,8}. É possível, portanto, prever possíveis aplicações da abordagem transpericárdica para formas difusas de cardiomiopatia. Por outro lado, a concentração de células foi significativamente mais alta nas regiões com infarto agudo do miocárdio. Esse achado sugere que fatores locais na região

infartada podem interagir para aumentar a migração e/ou sobrevivência celular no miocárdio lesionado.

Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de Financiamento

O presente estudo foi financiado por FAPESP e Incor-SP.

Vinculação Acadêmica

Este artigo é parte de tese de Doutorado de Érika Renata Branco pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo - FMVZ/USP - Departamento de Cirurgia

Referências

1. Bourassa MG, Detre KM, Johnston JM, Vlachos HA, Holubkov R. Effect of prior revascularization on outcome following percutaneous coronary intervention; NHLBI Dynamic Registry. *Eur Heart J*. 2002; 23: 1546-55.
2. Leor J, Patterson M, Quinones MJ, Kedes LH, Kloner RA. Transplantation of fetal myocardial tissue into infarcted myocardium of rat: a potential method for repair of infarcted myocardium? *Circulation*. 1996; 94 (Suppl II): 332-6.

- Hou DM, Cates P, Bekkers S, Miller MA, Carl L, Rouch CL, et al. Efficient myocardial delivery of microspheres and endothelial cells via selective retrograde coronary venous delivery [abstract]. *J Am Coll Cardiol*. 2002; 39: A76.
- Hou DM, McLaughlin F, Thiesse M, Rogers P, Johnson R, Wang J, et al. Widespread regional myocardial transfection by plasmid encoding Del-1 after retrograde coronary venous delivery. *Cathet Cardiovasc Interv*. 2003; 58: 207-11.
- Kolettis TM, Kazakos N, Katsouras CS, Niokou D, Pappa L, Koulouras V, et al. Intrapericardial drug delivery: pharmacologic properties and long-term safety in swine. *Int J Cardiol*. 2005; 99: 415-21.
- Hou DM, Youssef EA, Brinton TJ, Zhang P, Rogers P, Prince ET, et al. Radiolabeled cell distribution after intramyocardial, intracoronary, and interstitial retrograde coronary venous delivery – Implications for current clinical trials. *Circulation*. 2005; 112: 150-6.
- Vulliet PR, Greeeley SM, Macdonald KA, Kittelson M. Intra-coronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs. *Lancet*. 2004; 363: 783-4.
- Fuchs S, Baffour R, Zhou YF, Shou M, Pierre A, Tio FO, et al. Transendocardial delivery of autologous bone marrow enhances collateral perfusion and regional function in pigs with chronic experimental myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol*. 2003; 37: 1726-32.
- Mannam AP, Kalon KK, Cultip DE, Carrozza, JP, Cohen DJ, Lorell BH, et al. Safety of subxyphoid pericardial access using a blunt-tip needle. *Am J Cardiol*. 2002; 89: 891-3.
- Baek SH, Hrabie JA, Keefer LK, Hou D, Fineberg N, Rhoades R, et al. Augmentation of intrapericardial nitric oxide level by a prolonged-release nitric oxide donor reduces luminal narrowing after porcine coronary angioplasty. *Circulation*. 2002; 105: 2779-84.