

Maira Souza de Oliveira

**UTILIZAÇÃO DE FLAVONÓIDES E CÉLULAS-TRONCO NO TRATAMENTO
DA CARDIOTOXICIDADE INDUZIDA POR DOXORRUBICINA**

Tese apresentada à Escola de Veterinária
da Universidade Federal de Minas Gerais
como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Ciência Animal

Área: Medicina e Cirurgia Veterinárias

Orientador(a): Prof^a Dr.^a Marília Martins Melo
Co-Orientadores: Prof. Dr. Alfredo Miranda de Góes
Prof^a Dr.^a Ruthnéa Aparecida Lázaro Muzzi

Belo Horizonte
UFMG – Escola de Veterinária
2013

O48u Oliveira, Maira Souza de, 1980-
Utilização de flavonóides e células-tronco no tratamento da cardiotoxicidade induzida por doxorrubicina / Maira Souza de Oliveira. – 2013.
84 p. : il.

Orientadora: Marília Martins Melo
Co-orientadores: Alfredo Miranda de Góes, Ruthnéa Aparecida Lázaro Muzzi
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.
Inclui bibliografia

1. Sistema cardiovascular – Efeito das drogas – Teses. 2. Flavonóides – Teses.
3. Células-tronco – Teses. 4. Rato como animal de laboratório – Teses. I. Melo, Marília
Martins. II. Góes, Alfredo Miranda de. III. Muzzi, Ruthnéa Aparecida Lázaro.
IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.

CDD – 636.088 5

Tese apresentada em 27/02/2013, à Comissão Examinadora constituída por:

Prof^a. Dr^a. Marília Martins Melo
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Rosângela de Oliveira Alves Carvalho

Dra. Silviene Novikoff

Prof. Dr. Dawidson Assis Gomes

Prof. Dr. Benito Soto Blanco

*A Alcione e Teresa Cristina, meus pais queridos, por tudo.
A Luiz Octavio e Paulo Eduardo, meus mais fiéis torcedores.
Ao João Bosco, por fazer despertar em mim um olhar novo para a ciência.*

*“Assaz o senhor sabe: a gente quer passar um rio a nado, e passa;
mas vai dar na outra banda é num ponto muito mais em baixo,
bem diverso do em que primeiro se pensou”*

João Guimarães Rosa – Grande Sertão: Veredas

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas oportunidades e pelo amparo em todos os momentos.

À Prof^a. Dr^a. Marília Martins Melo pela confiança em mim e em meu trabalho. Por ter, primeiro, me recebido como aluna e orientada, e depois, me transformado em filha e amiga. Pelas orientações, pela vontade de me ver crescer e por batalhar pelos meus sonhos. Pelas palavras de conforto e de incentivo nos momentos difíceis, por estar sempre disponível e disposta a me ajudar. À senhora, o meu sincero agradecimento.

Ao Prof. Dr. Alfredo Miranda de Góes, Querido Chefe. Quando, neste manuscrito, usei palavras de Guimarães Rosa para dizer que eu quis “passar o rio a nado e passei”, agradeço a você por ter tornado essa minha travessia possível e suave. Obrigada por acreditar em mim, por me acolher como sua aluna, por abrir todas as portas e por ter investido em meu trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Ruthnéa Aparecida Lázaro Muzzi pelos ensinamentos na área da cardiologia, passados ao longo de vários anos, os quais me foram extremamente úteis nesse doutorado e pelas correções no manuscrito.

Ao Prof. Dr. Dawidson Assis Gomes por toda orientação, tantos ensinamentos e por ter me recebido tão prontamente em seu Laboratório.

Ao Prof. Dr. Timothy Kamp por ter me recebido em seu Laboratório e me proporcionado tamanho aprendizado. Agradeço pela orientação, pelas discussões sobre biologia celular e cardiologia, que tanto me enriqueceram, e pela amizade. Agradeço em especial, dentre os pesquisadores de sua equipe e os colaboradores, à Dra. Jianhua Zhang e ao Prof. Dr. Gary Lyons.

À Dra. Silviene Novikoff pelas palavras amigas e de incentivo, por tantos artigos científicos e conhecimento compartilhados, pelo precioso auxílio na obtenção da bolsa sanduíche e, por fim, por ter aceitado, com alegria e disponibilidade, me ajudar mais uma vez, comparecendo em minha defesa de tese.

À Prof^a. Dr^a. Rosângela de Oliveira Alves Carvalho e ao Prof. Dr. Benito Soto-Blanco por terem aceitado o convite desta banca.

À Prof^a. Dr^a. Eliane Gonçalves de Melo, que colaborou com meu projeto desde a aprovação pelo Departamento, até a pré-defesa, agradeço pelas correções no manuscrito, pela colaboração e amizade e por disponibilizar o Bloco Cirúrgico, bem como alguns dos alunos de sua equipe, em momentos fundamentais da realização de meus experimentos.

Ao Prof. Dr. Robson A. S. Santos e a Marcos B. Melo (Laboratório de Hipertensão Arterial, ICB/UFMG) pelo auxílio com os exames ecocardiográficos, os quais foram de fundamental importância para a qualidade dos resultados obtidos.

Ao Prof. Dr. Roberto Baracat de Araújo, por disponibilizar as instalações do Hospital Veterinário e pelo auxílio na aquisição do medicamento doxorrubicina.

À Tayio International Inc. e Rep & Saga, nas pessoas de Scott J. Smith e Fernando Santana pela doação do extrato de *Camellia sinensis*.

Aos professores Dr. Ernane Fagundes e Dr. Geovanni Dantas Cassali pelo auxílio na avaliação dos exames histopatológicos.

À Prof^ª. Dr^ª. Angela Maria Quintão Lana e a Danilo Gonçalves Bastos pelo auxílio nas análises estatísticas.

À Dra. Vany Ferraz, pelo auxílio na obtenção dos extratos das plantas.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Toxicologia (EV/UFMG), Ana Flávia, Marina, Lilian, Danilo, Mailson, Thaís, Isabela, Manuela e incluo a acadêmica da Medicina, Isabela, por todo auxílio e por compartilharem dos momentos bons e também dos difíceis. Agradeço, particularmente à Ana Flávia, pelas horas de estudo e discussão científica, pelo auxílio fundamental com os extratos das plantas, com as eletroforeses, com os exames de necropsia e por ter sido sempre presente, disponível e fiel amiga.

Aos amigos dos Laboratórios de Imunologia Celular e Molecular I e II (ICB/UFMG) pela acolhida, por fazerem com que eu me sentisse sempre bem-vinda, por tantos conhecimentos e dificuldades compartilhados. Agradeço, em especial, a dois anjos, Juliana e Betinha. Sem a ajuda e o amparo de vocês, os meus caminhos teriam sido muito mais difíceis. Ju, a você a minha amizade e o meu eterno agradecimento.

À Diretoria da Escola de Veterinária/UFMG, à Chefia do Departamento de Bioquímica e Imunologia/UFMG, à Diretoria do Hospital Veterinário/UFMG e à FEP/MVZ/Coordenação Clínica, por auxiliarem na disponibilização dos meios necessários ao desenvolvimento da pesquisa.

Ao Colegiado de Pós-Graduação da UFMG, nas pessoas do Prof. Dr. Roberto Maurício Carvalho Guedes e da funcionária Luzete Ornelas Queiroz, pela eficiência e o carinho com que sempre me atenderam.

A todos os professores com os quais convivi e trabalhei durante o curso, pelos ensinamentos, amizade e interesse que sempre demonstraram por mim e pela pesquisa.

Aos colegas da Pós-graduação pelo companheirismo e por compartilharmos das mesmas expectativas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado e da bolsa sanduíche, e pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa.

Ao Comitê de Ética em Experimentação Animal – CETEA, pela apreciação ética do projeto de pesquisa.

Enfim, muito obrigada a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|----|
| | LISTA DE TABELAS | 13 |
| | LISTA DE FIGURAS | 14 |
| | LISTA DE ABREVIATURAS | 18 |
| | CAPÍTULO 1. Atividades desenvolvidas na Universidade Federal de Minas Gerais | 19 |
| | RESUMO | 19 |
| | ABSTRACT | 20 |
| 1 | INTRODUÇÃO | 21 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 21 |
| 2.1 | CARDIOTOXICIDADE CAUSADA PELO QUIMIOTERÁPICO DOXORRUBICINA..... | 21 |
| 2.2 | COMPOSTOS FLAVÔNICOS..... | 22 |
| 2.3 | CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS..... | 23 |
| 3 | OBJETIVOS | 25 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 25 |
| 4.1 | ENSAIOS EXPERIMENTAIS <i>IN VITRO</i> | 25 |
| 4.1.1 | Extratos de planta ricos em flavonóides e medicamento utilizados..... | 25 |
| 4.1.2 | Definição dos grupos experimentais..... | 27 |
| 4.1.3 | Cultura de cardiomiócitos..... | 28 |
| 4.1.4 | Cultura de CTM..... | 28 |
| 4.1.5 | Caracterização das CTM..... | 29 |
| 4.1.6 | Cultura de células de tumor de mama..... | 30 |
| 4.1.7 | Ensaio de metabolização do metiltetrazolium (MTT)..... | 30 |
| 4.1.8 | Ensaio de incorporação do iodeto de propídeo (PI)..... | 30 |
| 4.2 | ENSAIOS EXPERIMENTAIS <i>IN VIVO</i> | 31 |
| 4.2.1 | Seleção dos animais e formação dos grupos experimentais..... | 31 |
| 4.2.2 | Caracterização das CTM..... | 32 |
| 4.2.3 | Avaliação clínica..... | 32 |
| 4.2.4 | Avaliação cardiológica..... | 32 |
| 4.2.5 | Patologia clínica..... | 33 |
| 4.2.6 | Histopatologia..... | 34 |
| 4.2.7 | Pesquisa das células-tronco eGFP no tecido cardíaco..... | 34 |
| 4.3 | ENSAIOS EXPERIMENTAIS <i>EX VIVO</i> | 35 |
| 4.3.1 | Obtenção e cultivo das células-tronco mesenquimais..... | 35 |
| 4.3.2 | Ensaio de metabolização do MTT..... | 35 |
| 4.3.3 | Atividade da fosfatase alcalina..... | 36 |
| 4.3.4 | Curva de crescimento celular..... | 36 |
| 4.3.5 | Caracterização fenotípica..... | 36 |
| 4.3.6 | Diferenciação cardiogênica..... | 36 |
| 4.3.7 | Expressão de marcadores de células da linhagem cardiogênica durante indução da diferenciação..... | 37 |
| 4.4 | ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 38 |
| 5 | RESULTADOS | 38 |
| 5.1 | ENSAIOS EXPERIMENTAIS <i>IN VITRO</i> | 38 |
| 5.2 | ENSAIOS EXPERIMENTAIS <i>IN VIVO</i> | 47 |
| 5.3 | ENSAIOS EXPERIMENTAIS <i>EX VIVO</i> | 57 |
| 6 | DISCUSSÃO | 60 |
| 7 | CONCLUSÕES | 68 |
| 8 | PERSPECTIVAS | 68 |
| | CAPÍTULO 2. Atividades desenvolvidas na University of Wisconsin | 69 |
| | RESUMO | 69 |
| | ABSTRACT | 70 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 71 |
| 2 | DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES..... | 71 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 72 |
| 3.1 | CULTIVO CELULAR..... | 72 |
| 3.2 | CARACTERIZAÇÃO CELULAR..... | 73 |
| 3.3 | PADRONIZAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO CARDIOGÊNICA..... | 73 |
| 3.4 | DETECÇÃO DE FLUORESCÊNCIA..... | 73 |
| 3.5 | CITOMETRIA DE FLUXO..... | 73 |
| 4 | RESULTADOS..... | 74 |
| 5 | CONSIDERAÇÕES..... | 78 |
| 6 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 79 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-------------|---|----|
| Tabela 1 - | Anticorpos utilizados na marcação celular para imunofenotipagem por citometria de fluxo. | 29 |
| Tabela 2 - | Sequência dos iniciadores utilizados na reação em cadeia da polimerase para a detecção do gene para proteína verde fluorescente (eGFP). | 35 |
| Tabela 3 - | Anticorpos utilizados na marcação celular para avaliação da indução cardiomiogênica por imunofluorescência e <i>Western blotting</i> . | 37 |
| Tabela 4 - | Resultados observados no ensaio de MTT em cultivo de cardiomiócitos, células de tumor de mama da linhagem MDA-MB 231 e células-tronco mesenquimais após incubação com extratos de <i>Arrabidaea chica</i> , <i>Camellia sinensis</i> e doxorubicina. Valores de absorvância (595 nm) e porcentual após normalização com o controle. | 44 |
| Tabela 5 - | Peso vivo (média e desvio padrão) de ratos Wistar e a diferença entre os valores obtidos ao início e ao final do experimento. | 47 |
| Tabela 6 - | Principais parâmetros (média e desvio padrão) ecocardiográficos de ratos Wistar avaliados ao final do experimento. | 50 |
| Tabela 7 - | Valores de hematologia (média e desvio padrão) obtidos de ratos Wistar ao final do período experimental. | 54 |
| Tabela 8 - | Valores do leucograma (média e desvio padrão) obtidos de ratos Wistar ao final do período experimental. | 54 |
| Tabela 9 - | Valores de bioquímica sérica (média e desvio padrão) obtidos de ratos Wistar ao final do período experimental. | 55 |
| Tabela 10 - | Valores de proteínas totais e fracionadas (média e desvio padrão) obtidos de ratos Wistar ao final do período experimental. | 55 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------|---|----|
| Figura 1 - | Organograma do procedimento empregado para obtenção do extrato de <i>Arrabidaea chica</i> . | 27 |
| Figura 2 - | Linha do tempo mostrando resumidamente todos os procedimentos ao longo do período experimental de 25 dias. ECG: eletrocardiograma; CTM: células-tronco mesenquimais; doxo: doxorrubicina. | 32 |
| Figura 3 - | Análise por espectrometria de massas por <i>electrospray</i> (EM-ESI) do extrato <i>A. chica</i> , no modo positivo [EM-ESI(+)]. | 39 |
| Figura 4 - | Caracterização fenotípica das células-tronco mesenquimais. Os gráficos acima mostram o perfil de expressão das células para os marcadores CD54, CD73, CD90, CD11b, CD34, CD45, MHC-I, MHC-II. O primeiro gráfico do painel (canto superior esquerdo) mostra a identificação da população celular a ser estudada. Abaixo dele, no canto inferior esquerdo, encontra-se o resultado obtido para avaliação de CTM apenas marcada com o anticorpo secundário. A linha preta horizontal presente em todos os gráficos constitui a fluorescência do controle negativo, sendo que os pontos a sua esquerda são considerados negativos para a marcação. A região colorida em preto constitui a fluorescência da população de células analisadas. A porcentagem das células positivas para cada marcador é informada no canto superior direito de cada gráfico. n=3. | 40 |
| Figura 5 - | Células-tronco mesenquimais (CTM) indiferenciadas (A) e após indução às diferenciações osteogênica (B) e adipogênica (C). Em B, após coloração pelo método de Von Kossa, nódulos de mineralização podem ser observados, em coloração marron, especialmente no canto direito da imagem. Em C, notam-se gotículas lipídicas coradas em vermelho pela coloração <i>Oil Red</i> . n=3, aumento 4x, barra escala = 125µm. | 40 |
| Figura 6 - | Viabilidade celular avaliada pelo ensaio de metabolização do MTT, após normalização considerando cada controle como 100% de células viáveis (eixo da abscissa se refere à porcentagem em relação ao controle de cada cultura celular). Toxicidade dos extratos de <i>Arrabidaea chica</i> (AC) e de <i>Camellia sinensis</i> (CS) incubados por 24 horas, nas doses de 12,5; 25 e 50 µg/ml em células de tumor de mama linhagem MDA-MB 231 (colunas quadriculadas), cardiomiócitos (colunas em preto) e células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (colunas listradas). | 41 |
| Figura 7 - | Viabilidade celular avaliada pelo ensaio de metabolização do MTT, após normalização considerando cada controle como 100% de células viáveis (eixo da abscissa se refere à porcentagem em relação ao controle de cada cultura celular). Porcentagem de células viáveis após utilização de doxorrubicina, na dose de 5 µmol/l durante 24 horas, em cultivos de células de tumor de mama linhagem MDA-MB 231 (coluna quadriculada), cardiomiócitos (coluna em preto) e células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (coluna listrada). Respectivos controles não mostrados. Letras diferentes indicam diferença estatística (p<0,05). | 42 |
| Figura 8 - | Valores de absorvância (595 nm) obtidos pelo ensaio de metabolização do MTT para viabilidade celular, avaliando o efeito da doxorrubicina e dos | 43 |

| | | |
|-------------|--|----|
| | extratos de <i>Arrabidaea chica</i> (AC) e de <i>Camellia sinensis</i> (CS) quando incubados em cardiomiócitos. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$). | |
| Figura 9 - | Valores de absorvância (595 nm) obtidos pelo ensaio de metabolização do MTT para viabilidade celular, avaliando o efeito da doxorubicina e dos extratos de <i>Arrabidaea chica</i> (AC) e de <i>Camellia sinensis</i> (CS) quando incubados em células de tumor de mama linhagem MDA-MB 231. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$). | 43 |
| Figura 10 - | Valores de absorvância (595 nm) obtidos pelo ensaio de metabolização do MTT para viabilidade celular, avaliando o efeito da doxorubicina e dos extratos de <i>Arrabidaea chica</i> (AC) e de <i>Camellia sinensis</i> (CS) quando incubados em células-tronco mesenquimais. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$). | 44 |
| Figura 11 - | Valores de morte celular (% em relação ao controle) obtidos com o ensaio de incorporação de iodeto de propídeo para avaliação do ciclo celular, pesquisando o efeito da doxorubicina (doxo) e dos extratos de <i>Arrabidaea chica</i> (AC) e de <i>Camellia sinensis</i> (CS) quando incubados em cardiomiócitos. * <i>versus</i> Controle; ** <i>versus</i> Doxo ($p < 0,05$). | 46 |
| Figura 12 - | Valores de morte celular (% em relação ao controle) obtidos com o ensaio de incorporação de iodeto de propídeo para avaliação do ciclo celular, pesquisando o efeito da doxorubicina (doxo) e dos extratos de <i>Arrabidaea chica</i> (AC) e de <i>Camellia sinensis</i> (CS) quando incubados em células de tumor de mama linhagem MDA-MB-231. * <i>versus</i> Controle; ** <i>versus</i> Doxo ($p < 0,05$). | 46 |
| Figura 13 - | Traçados eletrocardiográficos representativos (velocidade 50 mm/s, sensibilidade 2N) de ratos Wistar do grupo tratado com doxorubicina. Os traçados à esquerda do painel foram obtidos no tempo zero e os à direita, ao final do experimento. Nota-se aumento na amplitude de onda P (de 0,04 mV [A1] para 0,10 mV [A2]), de onda R (de 0,11 mV [B1] para 0,20 mV [B2]) e de onda T (amplitude superior à da onda R [C2] o que não era detectado para o mesmo animal no início do experimento [C1]). | 48 |
| Figura 14 - | Função ventricular pelo modo-M. Ilustrações à esquerda do painel (1) indicam tempo zero, e à direita (2), o final do experimento. Em 1, todos os grupos apresentam semelhante padrão, ao passo que em 2, o animal do grupo doxorubicina (doxo) apresenta contração ventricular diminuída e assincronia (seta) entre a movimentação do septo interventricular (SIV) e a parede posterior do ventrículo esquerdo (PP). CS: <i>Camellia sinensis</i> ; CTM: célula-tronco mesenquimal; VE: câmara interna do ventrículo esquerdo. | 49 |
| Figura 15 - | Valores de fração de ejeção (F.Ej.) e de encurtamento (F.Enc.) calculados a partir de mensurações feitas no modo-M em ecocardiografia realizada em ratos Wistar ao final do experimento. CS: <i>Camellia sinensis</i> ; Doxo: doxorubicina; CTM: célula-tronco mesenquimal. * <i>versus</i> Controle; ** <i>versus</i> Doxo (p -value é indicado para cada variável). | 50 |
| Figura 16 - | Parâmetros radiais de ecocardiografia <i>speckle-tracking</i> obtidos a partir de mensurações feitas no modo bidimensional em exame realizado ao final do | 51 |

- experimento. CS: *Camellia sinensis*; Doxo: doxorubicina; CTM: célula-tronco mesenquimal. * *versus* Controle; ** *versus* Doxo (*p-value* é indicado para cada variável).
- Figura 17 - Parâmetros longitudinais de ecocardiografia *speckle-tracking* obtidos a partir de mensurações feitas no modo bidimensional em exame realizado ao final do experimento. Letras diferentes indicam diferença estatística (*p-value* é indicado para cada variável). CS: *Camellia sinensis*; Doxo: doxorubicina; CTM: célula-tronco mesenquimal. 52
- Figura 18 - Vetores obtidos quando da avaliação com o algoritmo *optical flow* por meio da ecocardiografia *speckle-tracking* bidimensional, tomados ao final do experimento. Notar que a amplitude dos vetores difere entre os grupos. No controle e no CS os vetores são amplos, no grupo doxo, pequenos e nos grupos doxo+CTM e doxo+CS os vetores apresentam-se em tamanho intermediário. CS: *Camellia sinensis*; CTM: célula-tronco mesenquimal; doxo: doxorubicina. 53
- Figura 19 - Cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina de coração de ratos Wistar obtidos ao final do período experimental. Ausência de lesões em animais dos grupos controle (A1 corte longitudinal, A2 corte transversal) e CS (B corte longitudinal). No grupo doxo (C corte transversal) foram detectadas áreas de degeneração hialina (setas) e de necrose (regiões destacadas em preto). No grupo doxo+CTM (D corte transversal), pequenos focos de degeneração hialina (setas). No grupo doxo+CS (E corte longitudinal), hemorragia (setas) e edema intersticial, representado pelo padrão de dissociação das fibras musculares. Imagens obtidas em aumento de 60x. CS: *Camellia sinensis*; CTM: célula-tronco mesenquimal; doxo: doxorubicina. 56
- Figura 20 - Detecção do gene eGFP no coração por meio da técnica de PCR. Na terceira canaleta encontra-se material genético de animal transgênico heterozigoto, usado como controle positivo da reação, mostrando amplificação de duas bandas, a de 129 pb e a de 438 pb. As canaletas quatro e cinco contêm DNA de coração de animais utilizados no experimento, respectivamente dos grupos controle e doxo+CTM, que não são animais transgênicos. Animais não transgênicos só amplificam a banda de 438 pb (quarta canaleta). Notar que o animal não transgênico tratado com CTM (quinta canaleta), além de amplificar a banda de 438 pb também é capaz de amplificar a de 129 pb que é exclusiva de material genético transgênico, confirmando a presença das CTM no coração. CS: *Camellia sinensis*; CTM: célula-tronco mesenquimal; doxo: doxorubicina. 57
- Figura 21 - Curva de crescimento mostrando o número de células ao longo do tempo, avaliando a cinética de proliferação das células-tronco mesenquimais extraídas de ratos submetidos a tratamento com doxorubicina (linha inferior) e grupo controle (linha superior) nos dias 3, 5 e 7. n=3; *p<0,05. 58
- Figura 22 - Marcação para as moléculas de superfície CD45, CD54, CD73 e CD90 (coloração verde) em células-tronco mesenquimais indiferenciadas extraídas da medula óssea de ratos Wistar do grupo doxorubicina, indicando manutenção do padrão para esse tipo celular. A coloração em azul marca os núcleos celulares. Imagens obtidas em microscópio confocal. 59

| | | |
|-------------|---|----|
| Figura 23 - | Expressão de troponina T cardíaca e conexina-43 por meio de <i>Western blotting</i> realizado em células-tronco extraídas de ratos dos grupos controle e doxorrubicina (doxo). As células indiferenciadas de ambos os grupos não expressaram troponina T (canaletas 1 e 2, primeira linha) e as do grupo doxo produziram menor quantidade de conexina-43 (canaletas 1 e 2, segunda linha). As células induzidas à diferenciação apresentaram padrão semelhante para conexina-43, considerando-se ambos os grupos (canaletas 3 e 4, segunda linha). Por outro lado, as células do grupo doxo, mesmo induzidas à diferenciação, não foram capazes de produzir troponina T, diferentemente das células do controle (canaletas 3 e 4, primeira linha). Amostra de tecido cardíaco de rato adulto foi utilizada como controle positivo (quinta canaleta) e o GAPDH, como normalizador. Doxo: doxorrubicina; Dif: indução à diferenciação; Indif: indiferenciado. | 60 |
| Figura 24 - | Marcação para Oct-4 (painel superior, coloração verde) e Nanog (painel inferior, coloração vermelha) em células-tronco embrionárias geneticamente modificadas (linhagem cTnT ^{eGFP}), indicando manutenção do padrão para esse tipo celular. A coloração em azul marca os núcleos celulares. Imagens obtidas em microscópio confocal. | 74 |
| Figura 25 - | Células-tronco embrionárias geneticamente modificadas (linhagem cTnT ^{eGFP}) após 15 dias de indução à diferenciação cardiogênica. A linhagem estudada se torna fluorescente ao expressar troponina T cardíaca. Observação de um mesmo campo, em visualização de campo claro por microscópio invertido (à esquerda) e por microscópio de fluorescência (à direita). Imagens obtidas em aumento de 20x. | 75 |
| Figura 26 - | Resultados de citometria de fluxo realizados em células sanguíneas (granulócitos) para avaliação da expressão de SIRPA. Gráfico à esquerda mostra resultado obtido para o controle (anticorpo isotipo, 5µl anticorpo/10 ⁶ células) e à direita, para SIRPA (anticorpo anti-SIRPA, 5µl anticorpo/10 ⁶ células). | 75 |
| Figura 27 - | Resultados de três experimentos de citometria de fluxo realizados em células-tronco embrionárias geneticamente modificadas (linhagem cTnT ^{eGFP}) após 20 dias de diferenciação para avaliação da expressão de SIRPA. Acima, no painel, os resultados para o controle (anticorpo isotipo, 5µl anticorpo/10 ⁶ células) e abaixo, para o SIRPA (anticorpo anti-SIRPA, 5µl anticorpo/10 ⁶ células). | 76 |
| Figura 28 - | Resultados de citometria de fluxo em células-tronco embrionárias geneticamente modificadas (linhagem cTnT ^{eGFP}) após 20 dias de diferenciação para avaliação de diferentes concentrações do anticorpo anti-SIRPA. | 77 |
| Figura 29 - | Resultados de três experimentos de citometria de fluxo realizados em células-tronco embrionárias geneticamente modificadas (linhagem cTnT ^{eGFP}) após 20 dias de diferenciação para avaliação da expressão de SIRPA. Acima, no painel, os resultados para o controle (anticorpo isotipo, 5µl anticorpo/10 ⁶ células) e abaixo, para o SIRPA (anticorpo anti-SIRPA, 15µl anticorpo/10 ⁶ células). | 78 |

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP: adenosina tri-fosfato
BCIP: 5-bromo 4-cloro 3-indolilfosfato p -toluidina
CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CcO: citocromo C oxidase
CETEA: Comitê de Ética em Experimentação Animal
CHGM: concentração de hemoglobina globular média
CK: creatinaquinase
CK-MB: fração muscular da creatinaquinase
CLAE: cromatografia líquida de alta eficácia
CTE: célula-tronco embrionária
CTM: célula-tronco mesenquimal
cTnT: troponina T cardíaca
DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DNA: ácido desoxirribonucléico
Doxo: doxorrubicina
Doxo+CS: doxorrubicina + extrato de *Camellia sinensis*
Doxo+CTM: doxorrubicina + célula-tronco mesenquimal
ECG: eletrocardiografia
EDTA: etilenodiaminotetracético
eGFP: proteína verde fluorescente
EV: Escola de Veterinária
F.Ej.: fração de ejeção
F.Enc.: fração de encurtamento
HBSS: solução balanceada de Hank's
HGM: hemoglobina globular média
HLA: antígeno leucocitário humano
ICB: Instituto de Ciências Biológicas
IL: interleucina
IP: intraperitoneal
iPS: célula-tronco pluripotente induzida
LDH: lactato desidrogenase
MEF: fibroblastos embrionários de camundongo
MTT: tetrametiliazólio
NBT: nitroblue tetrazólio clorídrico
PBS: tampão salina fosfato
PCR: reação em cadeia da polimerase
PDEE: programa de doutorado com estágio no exterior
PI: iodeto de propídeo
PVDF: fluoreto de polivinilideno
SCF: fator celular estromal
SDS: dodecil sulfato de sódio
SFB: soro fetal bovino
SIRPA: *signal regulatory protein alpha*
SUS: Sistema Único de Saúde
TBS: solução salina tamponada com Tris (1M Tris e 3M NaCl, pH7,4)
TBST: solução TBS acrescida de 0,5% Tween-20
UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais
VE: ventrículo esquerdo
VG: volume globular
VGM: volume globular médio

Capítulo 1

Atividades desenvolvidas na UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

RESUMO

Objetivou-se o estudo da toxicidade causada pela doxorrubicina (doxo) no sistema cardiovascular e em células-tronco mesenquimais (CTM). Foram pesquisados os efeitos cardioprotetores de extratos ricos em flavonóides das plantas *Arrabidaea chica* e *Camellia sinensis* em ensaios *in vitro* e de células-tronco mesenquimais indiferenciadas e extrato de *C. sinensis in vivo*. Foram avaliadas também as células-tronco mesenquimais extraídas de animais que receberam doxo (ensaios *ex vivo*) com a finalidade de se inferir sobre o uso autólogo dessas células no tratamento regenerativo do miocárdio de pacientes submetidos à quimioterapia que apresentem cardiomiopatia secundária. Nos ensaios *in vitro*, a viabilidade celular de cardiomiócitos incubados com extratos de planta associados à doxo foi superior àqueles incubados somente com a doxo. Ademais, os extratos não alteraram a atividade antitumoral da doxo, quando avaliadas culturas de células de tumor de mama. Dessa forma, conclui-se que *A. chica* e *C. sinensis* apresentam potencial cardioprotetor, sem alterar a atividade antitumoral da doxo. No ensaio *in vivo*, ratos que receberam doxo e foram tratados com CTM e extrato de *C. sinensis* apresentaram, na avaliação ecocardiográfica da função ventricular, valores semelhantes aos animais do grupo controle e maiores que os apresentados por aqueles que receberam somente a doxo. Assim, conclui-se que o emprego de CTM indiferenciadas e de extrato de *C. sinensis* são capazes de prevenir a lesão cardíaca tóxica. Por fim, nos ensaios *ex vivo*, as CTM extraídas de animais em uso de doxo apresentaram-se viáveis e com o padrão de expressão de marcadores de superfície, porém com alterações na produção de fosfatase alcalina, menor taxa de crescimento celular e com redução na expressão de conexina-43 (células indiferenciadas) e troponina T (células induzidas à diferenciação cardiogênica). Tais resultados indicam que a doxo apresenta efeito tóxico em CTM, desaconselhando o transplante autólogo das mesmas como alternativa terapêutica em indivíduos submetidos à quimioterapia.

Palavras-chave: terapia celular, ecocardiografia strain, eletrocardiografia

ABSTRACT

The aim of the present research was to study doxorubicin (doxo) toxicity toward cardiovascular system and stem cells. It was evaluated cardioprotective effects of flavonoid extracts from *Arrabidaea chica* and *Camellia sinensis* *in vitro*, and of mesenchymal stem cells (MSC) and *C. sinensis* extract *in vivo*. Moreover MSC from subjects receiving doxo were evaluated. Cell viability, assessed by MTT assay and propidium iodide staining for flow cytometry, was higher for cardiomyocytes treated with both doxo and plants' extracts, if compared to those treated with doxo alone. Cell viability results for breast cancer cell cultures indicated that both plant extracts had no effect on antitumor activity of doxo. Rats treated with either MSC or *C. sinensis* extract showed echocardiography parameters of ventricular function similar to control and higher than those animals which received only doxo. Besides MSC from animals treated with doxo had normal cell viability and had kept their normal surface marker pattern, they showed lower alkaline phosphatase production, decreased proliferation rate, and lower expression of connexin-43 (undifferentiated cells) and troponin T (cells under cardiomyogenic differentiation). Taken together, the present study indicated that *A. chica*, *C. sinensis* and stem cell therapy could potentially have a cardioprotective effect against doxo toxicity. Moreover doxo was able to induce toxicity for MSC raising the possibility of autologous stem cell transplantation as a non-suitable option for subjects under chemotherapy with such antineoplastic agent.

Keywords: cell therapy, strain echocardiography, electrocardiography

1. INTRODUÇÃO

As doenças crônicas são as principais causas de mortalidade em todo o mundo. De acordo com o último levantamento da Organização Mundial de Saúde 52,22% dos óbitos na população mundial foram causados por doenças cardiovasculares e 15,12% por câncer, em 2011. Por isso são necessárias novas estratégias para a redução da mortalidade baseadas na prevenção e no tratamento dessas doenças. Um dos quimioterápicos mais utilizados na medicina humana e na medicina veterinária é a doxorubicina (doxo) que se mostra bastante eficaz no tratamento de tumores sólidos (em útero, mama, pulmão) e hematopoiéticos (Butany et al., 2009). Contudo, apresenta cardiotoxicidade como principal efeito adverso, levando ao desenvolvimento de cardiomiopatia dilatada e posterior quadro de insuficiência cardíaca (Albini et al., 2010).

Apesar do potencial cardiotóxico, a doxo é amplamente utilizada devido ao custo relativamente baixo, se comparado a outros quimioterápicos, e às taxas de eficácia semelhantes a outros agentes. No Brasil, a maioria das mulheres com neoplasia maligna de mama é atendida por meio do Sistema Único de Saúde (SUS) que oferece como opção para o tratamento neoadjuvante os regimes baseados em antracíclicos, associados ou não à ciclofosfamida (Pessoa et al., 2007). Esses autores destacam, por isso, a necessidade de mais estudos sobre as respostas aos tratamentos instituídos com antraciclina, ao invés de apenas considerar estudos estrangeiros, onde muitas vezes os tratamentos quimioterápicos envolvem o uso de outras drogas, como taxanes e trastuzumab. Na medicina veterinária, não só no Brasil como em outros países, a doxo é altamente utilizada, tanto em regimes monoterápicos, como em associação com

outros medicamentos (DeRegis et al., 2003; Moore et al., 2007; Sorenmo et al., 2007).

Dessa forma, dada a relevância do emprego da doxo, torna-se imperativo o estudo de métodos para prevenção e tratamento da insuficiência cardíaca decorrente do seu uso. Diante deste contexto, foi proposto o estudo da cardiotoxicidade causada pela doxo, mediante avaliação de extratos de planta ricos em compostos flavônicos e terapia com células-tronco mesenquimais (CTM) como alternativas terapêuticas. Além disso, propôs-se verificar se as células-tronco de indivíduos em uso de doxo apresentam-se biologicamente normais, podendo ser utilizadas (transplante autólogo) no tratamento da lesão cardíaca.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cardiotoxicidade causada pelo quimioterápico doxorubicina

A doxo é um antibiótico pertencente à classe das antraciclina, usado em todo o mundo no tratamento quimioterápico de diversos tipos de câncer. Seu principal efeito adverso é a toxicidade cardíaca, que é acumulativa e irreversível, podendo ocorrer de forma aguda ou crônica. A cardiotoxicidade compreende a ocorrência de insuficiência cardíaca congestiva irreversível, arritmias e cardiomiopatia dilatada, sendo a principal responsável pela mortalidade em pacientes tratados com doxo (Albini et al., 2010).

Dentre os mecanismos de ação da doxo, os mais estudados incluem a inibição da síntese de DNA e RNA, inibição da enzima topoisomerase II que bloqueia transcrição e replicação do DNA, liberação de proteínas apoptóticas e produção de espécies reativas de oxigênio (Sawyer et al., 2002; Elliott, 2006; Chandran et al., 2009). Outros fatores

considerados na suscetibilidade do miocárdio à ação da doxo são a baixa concentração de enzimas antioxidantes, como a catalase, no interior dos cardiomiócitos e a alta porcentagem de mitocôndrias no tecido cardíaco, as quais são capazes de acumular até o dobro da concentração extracelular de doxo (Davies & Doroshov, 1986). A cadeia respiratória mitocondrial é formada por inúmeras cadeias polipeptídicas aglomeradas em complexos, identificados de I a IV. O complexo IV é composto por subunidades catalíticas, sendo a maior delas a CcO (citocromo C oxidase), responsável pela catálise do citocromo C gerando a diferença de potencial eletroquímico necessária para a síntese de ATP. Foi demonstrado que a doxo inibe em até 60% a expressão das subunidades CcO em mitocôndrias de cardiomiócitos, resultando em alterações na energética celular e consequente morte celular (Chandran et al., 2009).

A doxo promove morte celular das células neoplásicas, porém não de forma seletiva, ocorrendo também, apoptose de cardiomiócitos, situação continuamente estudada, apesar de ser muito reportada na literatura, indicando a necessidade de se compreender melhor os mecanismos patológicos envolvidos (Olivetti et al., 1997; Poizat et al., 2000; Kumar et al., 2011). Apoptose, ou morte celular programada, é um mecanismo que permite a remoção de células lesadas ou indesejáveis de um organismo, via ativação de uma série de proteínas chamadas caspases (Shi, 2002). Ativação de caspase pode ser iniciada tanto por ativação de receptores de superfície, quanto por estresse celular. A via apoptótica induzida por estresse é regulada por proteínas da família Bcl2. Alterações na proporção entre proteínas Bcl2 pró e anti-apoptóticas afetam a sobrevivência de miócitos (Liu et al., 2010). Foi demonstrado que a doxo promove alteração na homeostase

energética celular uma vez que a integridade mitocondrial não está preservada e aumento na atividade da caspase 3 (Chandran et al., 2009). Foi demonstrado, também, que a doxo inibe a expressão do gene GATA4 que é essencial na sobrevivência dos cardiomiócitos uma vez que regula apoptose por meio de ativação transcricional da proteína antiapoptótica BclXL (Aries et al., 2004; Park et al., 2010). Além da inibição da expressão de GATA4, a doxo também suprime a expressão de CARP (“cardiac ankyrin repeat protein”). Ambas as proteínas são responsáveis pela manutenção da integridade do sarcômero, por meio da regulação da transcrição gênica de proteínas do miofilamento. Assim, outro mecanismo de ação tóxica da doxo é via depleção dos níveis de GATA4 e CARP resultando em desarranjo miofibrilar dos sarcômeros e comprometendo a atividade contrátil do cardiomiócito (Chen et al., 2012). Outra característica da doxo é a promoção de estresse oxidativo celular via formação de espécies reativas do oxigênio e radicais livres, lesando não apenas células tumorais, como também os cardiomiócitos (Elliot, 2006).

Nesse contexto, percebe-se que quanto melhor entendidos forem os mecanismos de ação da doxo, melhores serão conduzidos os estudos em busca de opções para a prevenção ou tratamento da cardiotoxicidade. Assim, o uso de flavonóides seria uma opção para se prevenir a ocorrência de estresse oxidativo e a utilização de células-tronco, outra opção para se recuperar regiões lesadas por apoptose no miocárdio.

2.2 Compostos flavônicos

Os flavonoides pertencem ao grupo dos polifenóis que constituem um dos diversos grupos de metabólitos secundários originados de plantas. Os flavonoides são o

subgrupo mais conhecido e de maior distribuição geográfica no mundo (Bravo, 1998). Os benefícios cardioprotetores de flavonoides extraídos de diversas fontes, como por exemplo, da uva (Sato et al., 2001), do vinho tinto (Balestrieri et al., 2008), do alho (Chuah et al., 2007) e da *Camelliasinensis* (Chacko et al., 2010), têm sido relatados na literatura. Outra fonte de flavonoides é a *Arrabidaea chica*, planta que vem sendo estudada pelo Laboratório de Toxicologia da Escola de Veterinária da UFMG (Ribeiro et al., 2012). O conteúdo de flavonoides na *A. chica* foi determinado, sendo $4,5 \pm 0,1$ mg/g nas folhas e ausente no caule (Silva et al., 2007). Os teores totais de flavonoides obtidos de suas folhas por meio de extrações com 30%, 50% e 70% de etanol foram, respectivamente, de 4,86 % m/m; 10,49 % m/m e 14,97 % m/m (Barbosa et al., 2008).

A. chica é uma planta da família Bignoniaceae encontrada principalmente na América tropical (sul do México ao sul do Brasil) e África (Takemura et al., 1995), sendo conhecida no Brasil pelos nomes populares de pariri e cajuru. Suas folhas são utilizadas como agente anti-inflamatório, antifúngico, antianêmico, adstringente e para o tratamento de cólica intestinal, diarreia sanguinolenta e leucemia (Takemura et al., 1995; Zorn et al., 2001; Westphal et al., 2007). Possui ainda atividade antitumoral conforme constatado por nossa equipe de pesquisa (Ribeiro et al., 2012).

Por ser uma planta amplamente distribuída no Brasil, de baixo custo e de boa palatabilidade (Barbosa et al., 2008), e por não haver estudos sobre a possível ação cardioprotetora de seus extratos ricos em flavonoides, a *A. chica* se torna uma opção a ser investigada.

A despeito da escassez de estudos sobre *A. chica*, o emprego de extratos de *C. sinensis*

é mais amplamente estudado. Contudo, a maioria das pesquisas envolve ou estudos *in vitro*, ou modelos *in vivo* de lesões cardíacas decorrentes de alterações de reperfusão e isquemia e quadros de hipertensão arterial, pouco enfocando o modelo de cardiopatia induzida pela toxicidade do doxo, havendo muito que se pesquisar nesse contexto.

Como está comprovada a toxicidade pela doxo no cardiomiócito por meio de estresse oxidativo e indução de apoptose, o uso de substâncias antioxidantes, como os flavonoides, parece ser uma opção viável como prevenção e no tratamento, considerando-se também que tais compostos promovem diminuição na produção de proteínas pró-apoptóticas Bax e Bad favorecendo o aumento na relação Bcl2-BclXL/Bax-Bad (Soobrattee et al., 2005; Soucek et al., 2011).

2.3 Células-tronco

A medicina regenerativa é uma área da pesquisa que envolve a terapia celular e a engenharia de tecidos com o objetivo de regenerar e/ou substituir órgãos e tecidos lesados ou perdidos (Ikada, 2006). A adequada escolha da fonte de células é fundamental para o sucesso terapêutico. Quanto ao doador, as células podem ser classificadas em autólogas (do próprio paciente), alogênicas (de um doador) ou xenogênicas (doador de espécie diferente do receptor). Quanto ao grau de diferenciação, elas podem ser classificadas em especializadas ou células-tronco.

Dentre as desvantagens do uso de células alogênicas ou xenogênicas citam-se a necessidade de se instituir terapia imunossupressora, uma vez que tais células são imunogênicas, e a possibilidade de transmissão de doenças.

As células especializadas apresentam como desvantagens o fato de haver limitação na quantidade de material disponível e de não serem capazes de expansão. Assim, a opção aparentemente mais viável é o emprego de células-tronco uma vez que apresentam baixo potencial imunogênico e são passíveis de proliferação, auto-renovação e diferenciação em linhagens especializadas, apresentando alto potencial para aplicação clínica (Ikada, 2006).

As células-tronco podem ser totipotentes, pluripotentes ou multipotentes. São consideradas totipotentes as células da mórula, devido à capacidade de originar um indivíduo completo (Fischbach & Fischbach, 2004).

As células-tronco embrionárias (CTE), isoladas da massa interna do blastocisto (Evans & Kaufman, 1981; Thompson et al., 1998), são consideradas pluripotentes pela capacidade de diferenciação em células dos três folhetos embrionários. Tais células são também caracterizadas por ilimitada capacidade de auto-renovação, contudo, podem apresentar alto potencial tumorigênico e seu emprego é associado a questões éticas, o que limita possibilidades de pesquisa e aplicabilidade terapêutica (Barreto Filho & Oliveira, 2012).

As células-tronco de pluripotência induzida (iPS) são obtidas por meio da reprogramação de células somáticas, sendo possível reverter e alcançar o estado de pluripotência (Takahashi & Yamanaka, 2006) e podem ser uma forma de contornar as questões éticas relacionadas às embrionárias. Porém alguns aspectos moleculares e funcionais sobre as células iPS ainda são desconhecidos, sendo necessários mais estudos.

Diferentemente do exposto, as células-tronco adultas ou mesenquimais (CTM) não apresentam restrições éticas e são melhor

caracterizadas e estudadas, tornando-se uma opção na medicina regenerativa. A principal desvantagem das células-tronco adultas é sua característica de multipotência, não sendo capazes de originar células de todos os folhetos embrionários (Barreto Filho & Oliveira, 2012). Embora as células-tronco mais estudadas sejam as mesenquimais extraídas da medula óssea, células com características semelhantes foram isoladas de diversos tecidos: adiposo (Zuk et al., 2001), pele (Toma et al., 2001), membranas fetais (Bailo et al., 2004) e líquido amniótico (De Coppi et al., 2007).

Com o intuito de caracterizar a população celular, a Sociedade Internacional para Terapia Celular definiu critérios mínimos para se classificar células como CTM (Dominici et al., 2006): aderência a superfície plástica; multipotência *in vitro* (capacidade de diferenciar em osteoblastos, condroblastos e adipócitos em condições adequadas); padrão de expressão de marcadores de superfície sendo positivo para CD105, CD73 e CD90 e negativo para CD34, CD14, CD79a, CD19 e HLA-DR.

A terapia celular utilizando células-tronco tem sido investigada para o tratamento de várias enfermidades, inclusive as cardiovasculares, especialmente injúrias isquêmicas e hipertensão arterial (Garbade et al., 2009; Gopinath et al., 2010). Com relação à utilização de células-tronco para o tratamento da cardiomiopatia induzida pela doxox, pouco se foi pesquisado (Chen et al., 2010) havendo necessidade de mais estudos. A principal vantagem da terapia celular para o tratamento de doenças cardíacas empregando-se as CTE é o fato de que essas células são eficientemente diferenciadas para a linhagem cardiomiogênica, gerando células espontaneamente contráteis (Zhang et al., 2012). Contudo, sua utilização envolve questões éticas e os experimentos requerem investimentos bem mais elevados. Por sua

vez, as CTM, apesar de não gerarem células terminalmente diferenciadas (contráteis), não envolvem questões éticas e os recursos financeiros requeridos para os estudos são inferiores aos exigidos pelas CTE.

Outro aspecto abordado como vantagem para utilização de CTM é a possibilidade de serem obtidas de um indivíduo, expandidas em cultura e depois reintroduzidas no próprio paciente, não induzindo rejeição pelo sistema imunológico (McLaren, 2001). Considerando tal aspecto, é possível supor que indivíduos em tratamento com a doxo e que apresentem cardiomiopatia possam utilizar suas próprias CTM no reparo da lesão cardíaca. Contudo, recentemente foi reportada a ocorrência de apoptose de células cardíacas progenitoras quando essas foram incubadas com doxo (De Angelis et al., 2010), tornando imperativo o estudo da toxicidade da doxo sobre as CTM.

Uma vez que os resultados obtidos da investigação de CTM como método terapêutico ainda são variáveis entre os autores, percebe-se a necessidade de se aprimorarem as pesquisas, especialmente na cardiomiopatia induzida pela toxicidade à doxo. Ressalta-se que, como a prática de transplante autólogo é preconizada a fim de se evitar a ocorrência de rejeição, é de fundamental importância avaliar se a administração de doxo poderia interferir no potencial das CTM de um indivíduo em quimioterapia.

3. OBJETIVOS

Diante do exposto, foi proposto o estudo da cardiotoxicidade induzida pela doxo com os seguintes objetivos:

- Avaliar se extratos ricos em flavonoides, extraídos de *A. chica* e de *C. sinensis*, apresentam potencial cardioprotetor sem interferir na ação quimioterápica da doxo;

- Estudar o emprego do extrato de *C. sinensis* e de células-tronco como alternativas terapêuticas eficazes em modelo experimental *in vivo* de lesão cardíaca tóxica decorrente da administração de doxo;

- Estudar a biologia das CTM extraídas de indivíduos em terapia com doxo inferindo sobre o uso de transplante autólogo dessas células como alternativa terapêutica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais foram realizados após aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob o protocolo 176/2010.

Os ensaios experimentais foram realizados na Escola de Veterinária (EV: Laboratório de Toxicologia e Centro Cirúrgico do Hospital Veterinário) e no Instituto de Ciências Biológicas (ICB: Laboratório de Imunologia Celular e Molecular I e II e Laboratório de Hipertensão Arterial) da UFMG.

4.1 Ensaios experimentais *in vitro*

4.1.1 Extratos de planta ricos em flavonóides e medicamento utilizados

Folhas da planta *A. chica* foram secas à sombra em temperatura ambiente. Uma excisada encontra-se depositada no Herbário da UNICAMP, em Campinas, São Paulo, sob o número UEC 145.956.

O extrato foi obtido segundo protocolos de Leite et al. (2006) e Urbonaviciute et al. (2006) com algumas modificações (Figura

1). Folhas (20 g) secas e trituradas de *A. chica* foram colocadas em 100 ml de solução etanol e água (70% e 30%) para extração. Esse extrato etanólico foi submetido a uma hora de banho ultrassônico, deixado em repouso ao abrigo da luz e em temperatura ambiente (*overnight*) e, posteriormente, submetido novamente a banho ultrassônico por uma hora, totalizando um período de extração de 18 horas.

Após esse procedimento, o extrato foi filtrado e levado ao rotavapor até completa evaporação do etanol. O conteúdo foi transferido para balão de separação e foram adicionados 100 ml de hexano. Após homogeneização da mistura, foram obtidas duas fases distintas (fase apolar/hexânica na porção superior e fase polar/aquosa na porção inferior), sendo coletada a fase aquosa. Nesta, foram adicionados 100 ml de uma solução de acetato de etila e éter etílico (3:1). Verificou-se o pH da mistura, sendo corrigido para um valor de 10,0 com acréscimo de hidróxido de amônio. Novamente foi realizada separação de fases em balão de separação, sendo utilizada a aquosa (fase na porção inferior do balão).

A última etapa do procedimento compreendeu o acréscimo de 100 ml de acetato de etila e 100 ml de água acidificada (adição de ácido clorídrico para ajuste do pH em 1,0), separação de fases no balão de separação sendo coletada a fase menos polar, também denominada orgânica (fase na porção superior do balão). Essa última etapa foi repetida a fim de se obter um extrato mais puro. Esse extrato obtido ao final de todo o procedimento foi deixado para secar no interior de capela em fluxo

laminar, obtendo-se um extrato em pó o qual foi pesado (2,0 g). Houve um rendimento de 1,0 g extrato/10 g folhas secas trituradas para o processo de extração utilizado. O extrato de *A. chica*, em pó, foi dividido em alíquotas e acondicionado em frascos de vidro a -20°C, sendo retomado em tampão salina fosfato (PBS) antes da utilização nos ensaios.

Para análise por meio de espectrometria de massas (EM) do extrato de *A. chica* utilizou-se o equipamento HR-LCMS-IT-TOF Shimadzu do Departamento de Química da UFMG. A injeção foi manual, o extrato solubilizado em metanol. A fonte utilizada foi electrospray (modo positivo 4,5 KV) (ESI-+), o fluxo de gás nebulizador (N₂) igual a 1,5 l/min, pressão do gás de secagem igual a 100 KPa e a temperatura da interface igual a 200 °C. No espectro o eixo y indica a abundância dos picos e o eixo x indica a relação massa/carga (m/z).

Foi utilizado um extrato comercial de *C. sinensis*, o Sunphenon DCF® (Taiyo Kagaku Co.).

As soluções dos extratos de *A. chica* e de *C. sinensis* foram filtradas em filtros de seringa de 0,22 µm antes de serem incubadas às culturas celulares.

Utilizou-se cloridrato de doxorrubicina 2mg/ml (Adriblastina®, Pfizer). Para ajuste das doses, a solução do medicamento foi diluída com o meio de cultura basal ("Dulbecco's Modified Eagle Medium" - DMEM), sendo filtrada em filtro de seringa de 0,22 µm antes de ser utilizada nos ensaios.

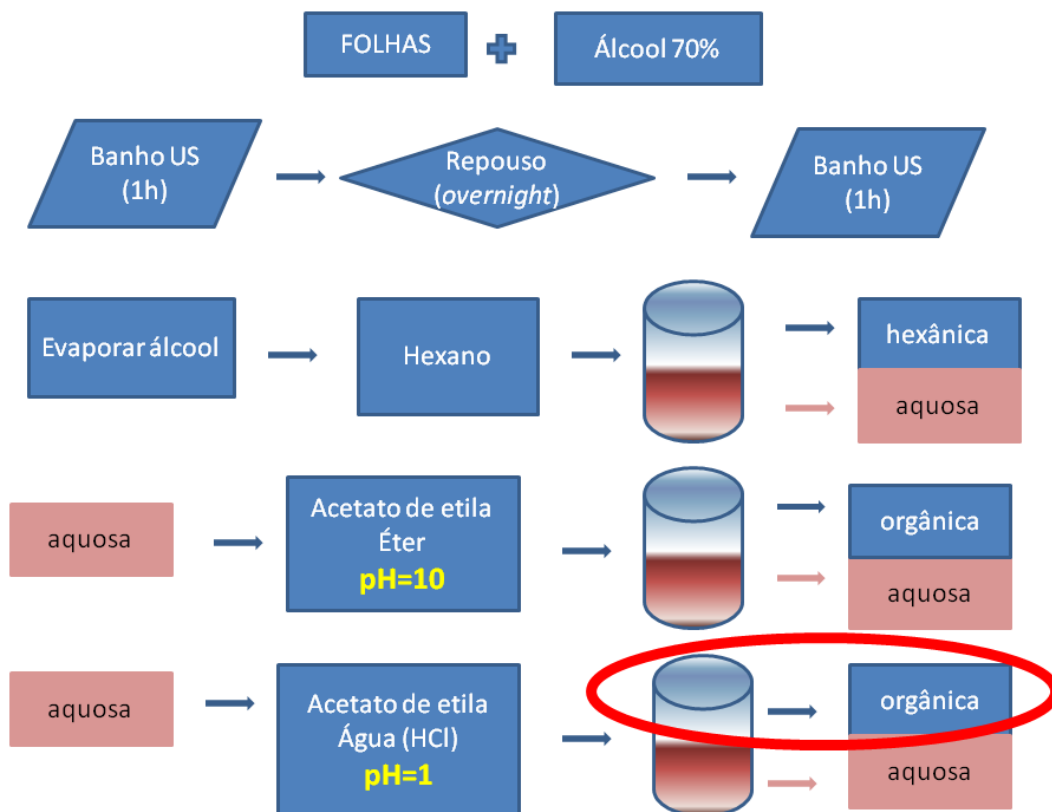


Figura 1: Organograma do procedimento empregado para obtenção do extrato de *Arrabidaea chica*.

4.1.2 Definição dos grupos experimentais

Os ensaios foram realizados em cultivos de cardiomiócitos, CTM e células de tumor de mama. As dosagens utilizadas foram baseadas na literatura, tanto para a doxo (Spallarossa et al., 2004) quanto para o extrato de *C. sinensis* (Souček et al., 2011), sendo que a *A. chica* foi empregada nas mesmas condições do outro extrato.

Para utilização da doxo, fez-se o estudo de regressão testando diferentes tempos de incubação (duas horas, quatro horas, 16 horas e 24 horas) para estabelecimento do período de tempo que ocasionasse 50% de morte celular no cultivo de cardiomiócitos. Os experimentos foram, então, conduzidos

com a associação dos extratos incubados por 24 horas e da doxo incubada com o tempo estipulado.

Foram realizados no mínimo quatro experimentos independentes e os tratamentos foram sempre aplicados em triplicata, da seguinte forma:

- extrato de *A. chica* (12,5; 25, 50, 100 e 200 µg/ml, por 24 horas);
- extrato de *C. sinensis* (12,5; 25, 50, 100 e 200 µg/ml, por 24 horas);
- doxo (5 µmol/l por 2, 4, 16 e 24 horas);
- extrato de *A. chica* (mesmas doses) por 24 horas, seguido de doxo por 10 horas;

- extrato de *C. sinensis* (mesmas doses) por 24 horas, seguido de doxo por 10 horas.

4.1.3 Cultura de cardiomiócitos

A cultura de cardiomiócitos neonatais de *Rattus norvegicus albinus* (linhagem Wistar) foi obtida conforme previamente descrito (Ott et al., 2008), com algumas modificações.

Resumidamente, fragmentos de aproximadamente 1,0 mm³ de corações de oito animais neonatos foram incubados com uma solução 500 µg/ml de tripsina em solução balanceada de Hank's (HBSS), sob agitação constante, à temperatura entre 2°C e 8°C durante 18 horas. Posteriormente, adicionou-se solução de colagenase tipo II (1 mg/ml em HBSS), incubou-se em estufa a 37°C por 40 minutos, submetendo o material à agitação a cada 5 minutos. Após esse período, procedeu-se à ressuspensão do material digerido, utilizando-se pipeta automática de 1,0 ml para obtenção de fragmentos ainda menores. Filtrou-se o material usando filtro de tecido ("cell strainer") para remoção de grandes fragmentos não digeridos, adicionou-se DMEM suplementado com 10% SFB, submeteu-se a centrifugação a 1450 rpm por 5 minutos e fez-se o plaqueamento das células em placas de 24 poços.

As células foram cultivadas com meio DMEM suplementado com bicarbonato de sódio, 10% de SFB, 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomicina, 250 ng/ml de anfotericina B e mantidas em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ a 37°C. O cultivo celular foi considerado apto para receber os tratamentos após verificação ao microscópio de cardiomiócitos em contração e pelo acompanhamento do cultivo celular.

Para padronização da densidade celular utilizada, foram avaliadas três densidades (5x10⁴, 1x10⁵, 5x10⁵ células/poço) em placas de 24 poços.

4.1.4 Cultura de CTM

As CTM foram extraídas do tecido adiposo de *R. norvegicus albinus* (linhagem Wistar) conforme previamente descrito (Zuk et al., 2002), com pequenas modificações.

Resumidamente, extraiu-se tecido adiposo inguinal de ratos com aproximadamente seis semanas de idade, lavou-se com PBS e procedeu-se à digestão enzimática com colagenase tipo II durante 2 horas a 37°C, submetendo-se o material à agitação a cada 15 minutos. Ao final desse período, adicionou-se SFB para inibir a atividade da colagenase e centrifugou-se a amostra a 330g por 10 minutos. A parte depositada no fundo do tubo ("pellet") foi ressuspensa em meio basal e plaqueada em frascos de cultura celular de 75 cm² de área de superfície (garrafas T75). O meio basal utilizado foi o DMEM alta glicose, suplementado com 10% de SFB, 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomicina, 250 ng/ml de anfotericina B. As culturas celulares foram mantidas em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ a 37°C.

O isolamento da população de CTM baseou-se na habilidade destas em aderirem ao plástico do frasco de cultura celular. Atingindo-se aproximadamente 90% de confluência, as células eram desprendidas utilizando-se tripsina/EDTA a 0,25% e plaqueadas em novas garrafas T75 na razão de 1:3. Para realização dos ensaios, as CTM foram plaqueadas em placas de 24 poços a 5x10⁴ células/poço, densidade já padronizada no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do ICB/UFMG.

4.1.5 Caracterização das CTM

Previamente à utilização nos ensaios experimentais, as células, ao atingirem a quarta passagem, foram caracterizadas por citometria de fluxo para a expressão das moléculas de superfície celular CD54, CD73, CD90 e MHC-I, que são marcadores expressos em CTM indiferenciadas. Também foram avaliadas as expressões de CD34 e CD45 (marcadores hematopoiéticos), CD11b (marcador endotelial) e MHC-II que não é expressado por CTM.

Para tanto, as CTM (5×10^5 células para cada anticorpo) foram incubadas com os

anticorpos primários (Tabela 1) a 4°C por 30 minutos. Posteriormente foram lavadas com PBS e incubadas com anticorpo secundário anti-mouse IgG Alexa Fluor® 488 conjugado na diluição de 1:200 (Invitrogen, USA), a 4°C por 30 minutos. Como controle negativo de fluorescência, foi adicionado anticorpo secundário a CTM não marcadas com anticorpo primário. Células sem quaisquer marcações foram fixadas e utilizadas com a finalidade de estabelecer a população a ser analisada. Foi utilizado o aparelho Guava® easyCyte™ 6-2L Flow Cytometer, Millipore. Os eventos (5000) foram coletados usando o software Incyte (Millipore) e analisados no software FlowJo versão 7.5.6.

Tabela 1: Anticorpos utilizados na marcação celular para imunofenotipagem por citometria de fluxo.

| Antígeno | Espécie onde foi produzido | Concentração de uso | Código do produto | Fornecedor |
|--------------|----------------------------|---------------------|-------------------|--------------------------|
| CD45 | Camundongo | 1:50 | ab610266 | Abcam |
| CD54 | Camundongo | 1:50 | ab554967 | Abcam |
| CD73 | Camundongo | 1:50 | ab551123 | Abcam |
| CD90 | Camundongo | 1:50 | ab554895 | Abcam |
| CD34 | Camundongo | 1:100 | sc7324 | Santa Cruz Biotechnology |
| CD11b/c | Camundongo | 1:100 | 554859 | BD Biosciences |
| MHC-I (RT1A) | Camundongo | 1:100 | 554917 | BD Biosciences |
| MHC-II | Camundongo | 1:50 | ab8351 | Abcam |

Adicionalmente, as CTM foram induzidas às diferenciações adipogênica, osteogênica e condrogênica.

As CTM foram induzidas à diferenciação adipogênica fazendo-se o cultivo celular em DMEM suplementado com 10% SFB, acrescido de dexametasona (0,5 μ M), insulina (1 μ M), indometacina (60 μ M) e isobutilmetilxantina (0,5 mM) (Hammoudi et al., 2012). Foram plaqueadas 5×10^4 células/poço em placas de seis poços, o meio de cultura era trocado a cada três dias

e o cultivo foi mantido por 21 dias. Após esse período, as células foram submetidas à coloração *Oil Red* a fim de evidenciar as gotículas lipídicas, que se coram em vermelho, presentes no interior das células que se comprometeram com a linhagem adipogênica.

As CTM foram induzidas à diferenciação osteogênica fazendo-se o cultivo celular em DMEM suplementado com 10% SFB, acrescido de ácido ascórbico (50 μ g/ml), β -glicerofosfato (10 mM) e dexametasona

(0,1 μM) (Zuk et al., 2001). Foram plaqueadas 5×10^4 células/poço em placas de seis poços, o meio de cultura era trocado a cada três dias e o cultivo foi mantido por 21 dias. Após esse período, as células foram submetidas à coloração pelo método de *Von Kossa* a fim de evidenciar os nódulos de mineralização representados por coloração marrom.

CTM indiferenciadas foram cultivadas de forma usual (DMEM 10% SFB) simultaneamente às diferenciações e utilizadas como controle dos ensaios de diferenciação.

4.1.6 Cultura de células de tumor de mama

Células de tumor de mama da linhagem MDA-MB-231 foram utilizadas com o intuito de avaliar se os extratos das plantas interfeririam na atividade antitumoral da doxo. Para realização dos ensaios as células foram cultivadas com meio DMEM suplementado com bicarbonato de sódio, 10% de SFB, 100 U/ml de penicilina, 100mg/ml de estreptomicina, 250 ng/ml de anfotericina B e mantidas em atmosfera umidificada com 5% de CO_2 a 37°C , sendo feito acompanhamento microscópico periódico da cultura para realização dos ensaios. As células foram plaqueadas em placas de 24 poços a $2,5 \times 10^4$ células/poço, densidade já padronizada no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do ICB/UFMG.

4.1.7 Ensaios de metabolização do metiltetrazolium (MTT)

As células foram submetidas ao ensaio de metabolização do MTT. Trata-se de método colorimétrico que avalia a capacidade de enzimas desidrogenases, presentes em

células viáveis, em converter o MTT, sal solúvel em água, em cristais de formazan, produto insolúvel em água. Esses cristais são solubilizados mediante adição de dodecil sulfato de sódio (SDS) e, a densidade óptica é transmitida pelo espectrofotômetro na faixa de 595 nm. O número de células viáveis é diretamente proporcional à quantidade de cristais de formazan produzida.

Para isto, elas foram plaqueadas em placas de 24 poços (densidade inicial, em células/poço, de 1×10^5 para cardiomiócitos, 5×10^4 para células-tronco, $2,5 \times 10^4$ para tumor de mama). Os tratamentos (extratos de planta e/ou doxo) foram administrados conforme descrito no item 4.1.2. Posteriormente, os cultivos celulares foram incubados com o MTT (solução 5 mg/ml em PBS) por duas horas e os cristais de formazan gerados foram observados em microscópio invertido e, então, solubilizados com a adição de SDS 10%-HCl para quantificação por densidade óptica a 595 nm, em leitor automático de micro-placas.

4.1.8 Ensaios de incorporação do iodeto de propídeo (PI)

Foram realizados ensaios de incorporação do iodeto de propídeo (PI) para avaliação de morte celular por citometria de fluxo (Riccardi & Nicoletti, 2006).

Resumidamente, as células foram plaqueadas em placas de seis poços (densidade inicial, em células/poço, de 6×10^5 para cardiomiócitos; $3,5 \times 10^5$ para células-tronco e $1,5 \times 10^5$ para tumor de mama) e a elas foi adicionada a solução fluorocrômica hipotônica (HFS – 0,1% p/v de citrato de sódio trissódico, 0,5% p/v de Triton-X 100 e 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de iodeto de propídeo). Após período de incubação de

quatro horas, a 4°C e ao abrigo da luz, o sobrenadante foi recolhido e analisado.

Utilizou-se o citômetro de fluxo FACScan, o programa CELLQuest e os dados obtidos, considerando-se 20.000 eventos por análise em cada ensaio, foram analisados no programa WinMDI 2.8.

4.2 Ensaios experimentais *in vivo*

Todo o desenho experimental (tratamentos, doses, intervalos de administração, número de animais, duração do experimento) foi concebido após análises de resultados obtidos em experimento piloto (Oliveira et al., 2013).

4.2.1 Seleção dos animais e formação dos grupos experimentais

Foram utilizados 40 ratos (*R. norvegicus albinus*), da linhagem Wistar, machos, com peso inicial entre 290 – 330g e obtidos do Centro de Bioterismo do ICB/UFMG. Os animais permaneceram todo o período experimental no biotério do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do ICB/UFMG, alojados em caixas plásticas (50x50x40cm), em temperatura ambiente, com fotoperíodo de 12 horas (claro/escuro) e recebendo ração comercial e água *ad libitum*.

Os animais foram distribuídos igualmente em cinco grupos (n = 8/grupo) e após uma semana de adaptação começaram a receber os tratamentos da seguinte forma:

Grupo 1 (Controle): 1,0 ml de água destilada via gavagem diariamente; 1,0 ml de salina via intraperitoneal (IP) a cada sete dias;

Grupo 2 (Extrato de *C. sinensis* - CS): 200 mg/kg de extrato via gavagem diariamente; 1,0 ml de salina via IP a cada sete dias;

Grupo 3 (doxorubicina - doxo): 1,0 ml de água destilada via gavagem diariamente; 5 mg/kg de doxo via IP a cada sete dias;

Grupo 4 (doxo e extrato de *C. sinensis* – doxo+CS): 200 mg/kg de extrato via gavagem diariamente; 5 mg/kg de doxo via IP a cada sete dias;

Grupo 5 (doxo e CTM – doxo+CTM): 1,0 ml de água destilada via gavagem diariamente; 5mg/kg de doxo via IP a cada sete dias; duas aplicações intravenosas (veia da cauda) de 3×10^6 CTM indiferenciadas cada, sendo uma 48 horas antes da primeira doxo e a outra 48 horas antes da terceira injeção de doxo;

Foram feitas quatro aplicações semanais de doxo, utilizando-se o medicamento de referência (Adriblastina®, Pfizer) a uma concentração de 2 mg/ml. O término do período experimental se deu 48 horas após a última aplicação de doxo.

O extrato de *C. sinensis* utilizado (Sunphenon DCF®, Taiyo Kagaku Co.) foi o mesmo dos ensaios *in vitro* (item 4.1.1).

As CTM foram extraídas de tecido adiposo de ratos Lewis LEW-Tg (EGFP) F455.5/Rrrc obtidos do *Rat Resource and Research Center* (Missouri, EUA), da mesma maneira que a detalhada no item 5.1.4. As CTM utilizadas foram cultivadas até quarta ou quinta passagens, quando eram individualizadas, contadas (hemocitômetro), lavadas em PBS, ressuspendidas em salina (200 µl) e injetadas nos animais.

A linha do tempo sobre os procedimentos experimentais é mostrada na Figura 2.

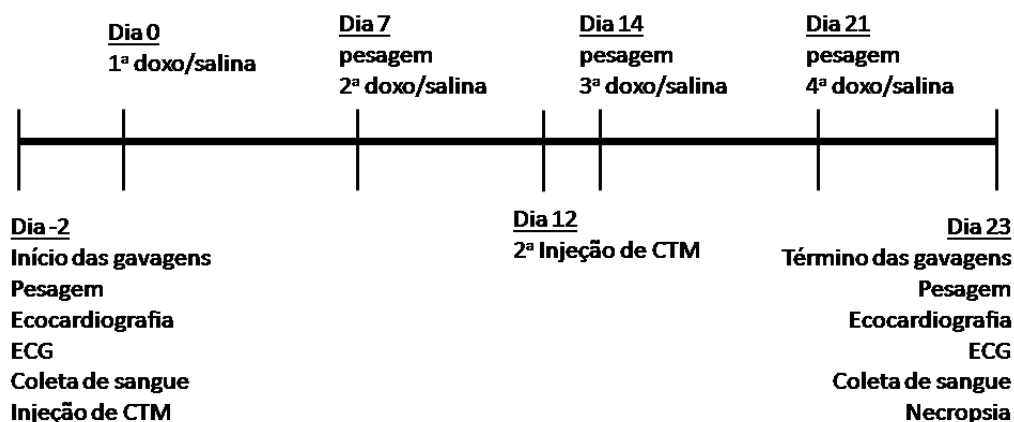


Figura 2: Linha do tempo mostrando resumidamente todos os procedimentos ao longo do período experimental de 25 dias. ECG: eletrocardiograma; CTM: células-tronco mesenquimais; doxo: doxorubicina.

4.2.2 Caracterização das CTM

As CTM utilizadas nos experimentos foram caracterizadas da mesma maneira que a descrita no item 4.1.5.

4.2.3 Avaliação clínica

Os animais foram avaliados diariamente sendo considerados o estado geral, características e qualidade da pelagem, indícios de desidratação, sinais de apatia, presença de diarreia e ocorrência de óbitos.

Os animais foram pesados semanalmente e os tratamentos foram ajustados de acordo com o peso.

Antes do início do experimento, todos os animais foram submetidos à coleta de sangue e a exames cardiológicos para descartar quaisquer anormalidades e acompanhar sua evolução até o final do experimento.

4.2.4 Avaliação cardiológica

Os animais foram submetidos, antes e ao final do experimento, à avaliação eletrocardiográfica (ECG) e ecocardiográfica, mediante anestesia inalatória em circuito fechado (inalador anestésico Metalvet Plus) com isoflurano (Isofurine® 5% para indução e 2% a 2,5% para manutenção). Após o monitoramento com ECG ao final do experimento, os animais foram eutanasiados por meio de aprofundamento da anestesia inalatória.

A monitoração com o ECG (ECG-PC, TEB) teve duração de 20 minutos (após um período inicial de registro de um minuto que foi desconsiderado na análise), sendo feita com o animal em decúbito dorsal e os eletrodos posicionados nos membros torácicos e pélvicos de forma usual. Foram avaliadas as durações e amplitudes das defleções e dos intervalos, porém foi dada maior ênfase ao estudo das arritmias. Todas as análises foram feitas pelo mesmo pesquisador.

O exame ecocardiográfico (Vevo 2100, Visual Sonics) compreendeu a avaliação dos modos bidimensional, modo-M, Doppler e *speckle-tracking* bidimensional. Todos os exames foram feitos por um mesmo examinador em estudo “cego” e seguiram as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia. Utilizando-se o modo-M foram realizadas medidas no eixo curto ao nível dos músculos papilares, tais como diâmetros diastólico e sistólico finais do ventrículo esquerdo (VE) e espessuras do septo interventricular e da parede posterior do VE para o cálculo das medidas de fração de ejeção (F.Ej.) e fração de encurtamento (F.Enc.).

Realizou-se também o estudo da deformação ventricular, ou *strain*, por meio de avaliação *speckle-tracking* bidimensional, utilizando-se software específico (Vevo Strain, Visual Sonics) e aplicando-se algoritmo *optical flow*. Para tal, acessaram-se imagens obtidas no modo 2D, parasternal esquerdo, eixo curto e longo (medidas radiais e longitudinais, respectivamente) a fim de se determinar os parâmetros velocidade, deslocamento, deformação ou *strain* e taxa de deformação ou taxa de *strain*. Resumidamente, imagens ecocardiográficas foram obtidas numa média de 220 fps, com utilização de transdutor bifrequencial (16 e 21 MHz) e selecionadas tendo por base a visualização adequada das bordas do endocárdio e a ausência de artefatos. Três ciclos cardíacos consecutivos foram selecionados de acordo com a qualidade da imagem. Cada imagem de eixo longo do miocárdio do VE foi dividida em seis segmentos anatômicos padronizados para se proceder à análise de *strain* regional ao longo de todo o ciclo cardíaco. Para a análise global de *strain* considerou-se a média dos valores obtidos nos seis segmentos.

4.2.5 Patologia clínica

O sangue foi colhido por punção na veia da cauda (tempo zero) e cardíaca imediatamente antes do procedimento de eutanásia. Foram coletadas amostras em tubos com EDTA 10% para exames hematológicos (tempo zero e final) e em tubos sem anticoagulante para obtenção do soro para avaliações bioquímicas (final do experimento).

O número global de eritrócitos e leucócitos e o valor da hemoglobina foram determinados em hemocítômetro (CELM CC-530). O hematócrito foi determinado em centrífuga para microhematócrito (Microspin). Foram calculados os seguintes índices hematimétricos: volume globular médio (VGM), hemoglobina globular média (HGM) e concentração de hemoglobina globular média (CHGM). Esfregaços sanguíneos foram corados pelo método de Maygrünwald–Giemsa para contagem diferencial de leucócitos.

O sangue coletado sem anticoagulante foi centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos para obtenção do soro, o qual foi utilizado para avaliação de proteínas totais por refratometria (refratômetro manual Ningbo Utech International CO LTDA, modelo 301). O perfil proteico fracionado foi obtido por meio de eletroforese horizontal utilizando gel de agarose 12%, tampão Tris. Os géis foram corados com Ponceau e descorados em uma série de lavagens em etanol e ácido acético. As bandas eletroforéticas foram escaneadas e lidas em software apropriado (CELM SE- 250). A concentração protéica (g/dL) foi determinada através da multiplicação do percentual de cada fração obtida pela concentração da proteína total.

As dosagens séricas de creatinaquinase (CK), isoenzima CK-MB, lactato

desidrogenase (LDH), ureia e creatinina foram realizadas por método cinético (analisador semi-automático TP Analyser) usando *kits* comerciais (Bioclin®). A dosagem de glicose sanguínea foi realizada em glicosômetro digital (Optium Xceed, Abbott), imediatamente após a coleta de sangue, utilizando-se sangue total.

4.2.6 Histopatologia

Após eutanásia, parte do coração de cada animal foi fixada em solução tamponada de formalina 10%, emblocada em parafina e corada com hematoxilina e eosina para futura análise por microscopia de luz (Olympus BX 41 com câmera Spot In sight Color acoplada).

4.2.7 Pesquisa das células-tronco eGFP no tecido cardíaco

A detecção de células-tronco eGFP no tecido cardíaco foi realizada por meio da análise da presença do gene da proteína verde fluorescente (eGFP) nos corações tratados. Para tanto, parte do coração de cada animal foi utilizada para extração de DNA genômico e realização de PCR duplex. A extração do DNA genômico foi feita utilizando-se o reagente DNAzol® (Invitrogen) e seguindo-se as instruções do fabricante. De maneira resumida, as amostras foram homogeneizadas em DNAzol® e o DNA foi precipitado e lavado, respectivamente, em etanol 100% e 75%. Por fim, o DNA genômico foi solubilizado em NaOH 8mM.

Três iniciadores (Tabela 2) foram utilizados para a amplificação de dois amplicons. O primeiro deles, LWS 455 5F, anela em uma região do DNA presente tanto em animais com genoma do tipo selvagem, quanto em

animais com inserção do gene eGFP. Em combinação com o iniciador LWS 455 5R, que se anela apenas com uma sequência gênica presente em genomas do tipo selvagem, os iniciadores falqueiam uma região presente apenas em animais selvagens e após amplificação por PCR geram um amplicon de 438 pb. Já em combinação com o iniciador U3r-4, que se anela com uma região do gene eGFP inserido no genoma dos animais transgênicos, o par de iniciadores gera um amplicon de 129 pb após amplificação por PCR. Desta forma, o conjunto de iniciadores consegue detectar a presença dos diferentes materiais genéticos após amplificação, sendo que animais não transgênicos (não GFP) só produzem o amplicon de 438 pb, animais transgênicos homozigotos, só o amplicon de 129 pb e os transgênicos heterozigotos, ambos os amplicons.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) acontece ao longo de vários ciclos compostos por passos nos quais a temperatura é adequada a fim de aperfeiçoar as etapas da reação. No início da reação há aquecimento até 94°C, temperatura à qual as fitas de DNA separam-se e tornam-se passíveis de replicação. Esse passo dura 3 minutos no primeiro ciclo e 30 segundos nos posteriores e é seguido de um passo de 30 segundos no qual a temperatura é ajustada de acordo com os iniciadores utilizados, neste caso 64°C, já que nesse passo ocorre o anelamento entre DNA e iniciadores. A extensão da cadeia de DNA é feita a 72°C, temperatura ótima da enzima polimerase utilizada. Esse ciclo foi então repetido 34 vezes de modo que houve uma amplificação exponencial (2^{34}) da sequência de DNA flanqueada pelos iniciadores. A amplificação finalizou com mais um passo final de alongamento, desta vez com a duração de 10 minutos. Os produtos da amplificação foram submetidos à

eletroforese em gel de agarose ultrapura a 2% adicionado SYBERSafe (Molecular probes – Invitrogen) ou brometo de etídeo (ICM Biomedicals) de modo a permitir a visualização do DNA amplificado. A análise do número de pares de base do segmento gênico obtido foi realizada por

meio da comparação com um padrão de peso molecular. O protocolo descrito foi estabelecido a partir de orientações obtidas do instituto *Rat Resource and Research Center* (Missouri, EUA).

Tabela 2: Sequência dos iniciadores utilizados na reação em cadeia da polimerase para a detecção do gene para proteína verde fluorescente (eGFP).

| Iniciador | Sequência |
|------------|--------------------------|
| LWS 455 5F | AACCTCCCAGTGCTTTGAACGCTA |
| LWS 455 5R | GGTGCAAGCCTCAACTTCTTTGT |
| U3r-4 | ATCAGGGAAGTAGCCTTGTGTGTG |

4.3 Ensaios experimentais *ex vivo*

Para realização deste experimento foram utilizadas CTM extraídas da medula óssea dos animais dos grupos controle e doxo do experimento *in vivo*. Optou-se por células derivadas da medula óssea dada a caquexia dos animais do grupo doxo, o que inviabilizou a obtenção de tecido adiposo.

células mesenquimais baseou-se na habilidade destas em aderirem ao plástico do frasco de cultura celular. Atingindo-se aproximadamente 90% de confluência, as células eram desprendidas utilizando-se tripsina/EDTA a 0,25% e plaqueadas em novas garrafas T75 na razão de 1:2. Em todos os ensaios foram utilizadas células entre quarta e quinta passagens.

4.3.1 Obtenção e cultivo das CTM

Tíbia e fêmur foram coletados de cada animal e acondicionados em tubos cônicos contendo meio DMEM sem suplementação com SFB. Em fluxo horizontal, eluiu-se a medula dos ossos utilizando-se meio DMEM e procedeu-se à centrifugação a 330g por 10 minutos. A parte depositada no fundo do tubo (“pellet”) foi ressuspendida em DMEM alta glicose, suplementado com 10% de SFB, 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomicina, 250 ng/ml de anfotericina B e plaqueada em garrafas T75. As culturas celulares foram mantidas em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ a 37°C. O isolamento da população de

4.3.2 Ensaios de metabolização do MTT

As CTM foram monitoradas quanto à viabilidade pelo ensaio de conversão do MTT, realizado em triplicata. Para isto, elas foram transferidas para placas de 24 poços (1x10⁵ células/poço) e incubadas com o MTT (5 mg/mL em PBS) por 2 horas. Após este período os cristais de formazan gerados foram observados em microscópio invertido e, então, solubilizados com a adição de SDS 10%-HCl para quantificação por densidade óptica a 595 nm, em leitor automático de micro placas.

4.3.3 Atividade da fosfatase alcalina

A atividade da fosfatase alcalina foi avaliada através do ensaio baseado na reação cromogênica decorrente da clivagem de um grupamento fosfato do 5-bromo 4-cloro 3-indolilfosfato ρ -toluidina (BCIP) pela fosfatase alcalina produzida pelas CTM. Essa reação produz um próton que reduz o nitroblue tetrazólio clorídrico (NBT), formando um precipitado insolúvel de cor púrpura. Esse precipitado é solubilizado mediante adição de SDS e a densidade óptica é transmitida pelo espectrofotômetro na faixa de 595 nm. A produção de fosfatase alcalina é diretamente proporcional à quantidade de precipitado produzida.

Para tal, as CTM foram plaqueadas como descrito no item anterior. Uma solução de BCIP- NBT, preparada de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen), foi adicionada a cada poço. Após 2 horas de incubação, os cristais de cor púrpura gerados foram observados ao microscópio invertido e em seguida adicionou-se SDS 10% HCl para a solubilização dos precipitados púrpura. A densidade óptica das soluções foi medida a 595 nm em um leitor automático de micro placas.

4.3.4 Curva de crescimento

O tempo de crescimento das CTM dos dois diferentes grupos foi determinado pela contagem do número de células em tempos definidos. No tempo zero, 1×10^4 células na quarta passagem e incubadas foram plaqueadas em placas de 6 poços, incubadas à 37°C atmosfera umidificada e 5% de CO₂ nos seguintes intervalos de tempo: 1, 3, 5 e 7 dias. Ao final de cada tempo as células foram contadas em hemocitômetro.

Para tal, as células eram previamente lavadas com PBS, incubadas com tripsina/EDTA por 5 minutos em estufa, centrifugadas e ressuspensas em 1,0 ml de DMEM 10% SFB. Para cada tempo foram feitas três repetições do plaqueamento e de cada um, feita triplicata da contagem.

4.3.5 Caracterização fenotípica

As CTM de ambos os grupos foram caracterizadas por imunofluorescência para a expressão das moléculas de superfície celular CD45, CD54, CD73 e CD90.

Resumidamente, as CTM foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído 4%. Em seguida, foram incubadas à temperatura ambiente por 1 hora com solução de bloqueio (1% albumina sérica bovina e 5% soro de cabra em PBS). Posteriormente, foram lavadas com PBS e incubadas com os anticorpos descritos na tabela 1 na diluição de 1:100, durante 12 a 16 horas, a 4°C. Por fim, foram incubadas com anticorpo secundário anti-mouse IgG Alexa Fluor® 488 conjugado na diluição de 1:500 (Invitrogen, USA), a 25°C por 1,0 hora. Como controle negativo de fluorescência, foi adicionado anticorpo secundário às CTM não marcadas com anticorpo primário. A marcação dos núcleos foi feita com uma solução de Hoescht 0,6 μ g/ml em PBS.

4.3.6 Diferenciação cardiomiogênica

As CTM dos grupos controle e doxo foram induzidas à diferenciação cardiomiogênica, sendo cultivadas em meio indutor previamente estabelecido (Planat-Bénard et al., 2004). Esse meio é composto basicamente de DMEM suplementado com

20% de SFB e acrescido de interleucina (IL)-3, IL-6, fator celular estromal (SCF), β -mercaptoetanol, L-glutamina, apo-transferrina humana, insulina recombinante humana.

Os ensaios experimentais foram realizados após um período de indução à diferenciação de quatro dias. Esse intervalo foi estabelecido mediante resultados de nossa equipe de pesquisa (submetidos para publicação), os quais indicam pico de expressão gênica de marcadores da linhagem cardiomiogênica, avaliados por PCR em tempo real. Como controle do experimento, CTM dos dois grupos foram

mantidas indiferenciadas, sendo cultivadas rotineiramente com DMEM 10% SFB.

4.3.7 Expressão de marcadores de células da linhagem cardiomiogênica durante indução da diferenciação

Avaliou-se a expressão das proteínas α -actinina sarcomérica, conexina-43 e troponina T cardíaca (Tabela 3) tanto pelas células induzidas à diferenciação, quanto em CTM indiferenciadas, de ambos os grupos (controle e doxo).

Tabela 3: Anticorpos utilizados na marcação celular para avaliação da indução cardiomiogênica por imunofluorescência e *Western blotting*.

| Antígeno | Tipo | Espécie onde foi produzido | Concentração de uso | Código do produto | Fornecedor |
|--------------------------------|------------|----------------------------|---------------------|-------------------|------------|
| α -actinina sarcomérica | Monoclonal | Camundongo | 1:1000 | Ab9465 | Abcam |
| conexina-43 | Policlonal | Coelho | 1:8000 | Ab11370 | Abcam |
| troponina T cardíaca | Monoclonal | Camundongo | 1:1000 | Ab8295 | Abcam |

Procedeu-se a imunofluorescência para avaliação de α -actinina sarcomérica. Diferentemente do procedimento descrito no item 4.3.5, as células foram incubadas com solução de permeabilização (0,1% Triton X-100), por 10 minutos, após a fixação em paraformaldeído.

Foi realizado *Western blotting* para avaliação das proteínas troponina T cardíaca (35,4 kDa) e conexina-43 (43 kDa). Foi utilizada amostra de coração de *R. norvegicus albinus* como controle positivo.

Resumidamente, 20 a 40 μ g de proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida 10%. Em seguida, as proteínas eram transferidas do gel para membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (BioRad) pelo sistema de transferência semi-seco (BioRad). A membrana foi então bloqueada com 5% de leite desnatado em solução salina tamponada com Tris (1M Tris e 3M NaCl, pH7,4 – TBS) com 0,5% Tween-20 (Sigma) (TBST) por 1,0 hora e depois incubadas *overnight* a 4°C com anticorpo primário (Tabela 3), diluído em TBST com 5% de leite desnatado. As membranas foram lavadas três vezes de 5 minutos em

TBST antes de serem incubadas por 1,0 hora com anticorpo secundário, a temperatura ambiente. Os anticorpos secundários anti-coelho ou anti-camundongo foram conjugados com peroxidase (1:5000) (Millipore).

As bandas foram reveladas por reação de quimioluminescência com ECL Plus (Amersham). Os filmes foram escaneados e as análises quantitativas realizadas utilizando o software Image J.

4.4 Análise estatística

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, de acordo com Sampaio (2007). Os resultados foram avaliados quanto à normalidade e homocedasticidade (programa Instat) e posteriormente submetidos à análise de variância (ANOVA). As variáveis paramétricas e aquelas normalizadas após transformação logarítmica ou quadrática foram analisadas por teste t, t pareado ou Tukey, dependendo da comparação realizada. As variáveis não paramétricas foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis. Nível de significância adotado foi

5% ($p < 0,05$) e o programa estatístico utilizado foi o R.

5. RESULTADOS

5.1 Ensaios experimentais *in vitro*

Como detectado previamente pelo Laboratório de Toxicologia da Escola de Veterinária da UFMG por meio de CLAE, o extrato total de *A. chica* apresentou grande quantidade de flavonoides, como por exemplo, o canferol (Ribeiro et al., 2012).

O extrato de *C. sinensis* utilizado apresentou a seguinte composição, segundo o fabricante: polifenóis totais (>80%), catequinas totais (>80%), epigalocatequina (>45%) e cafeína (<1%).

Por meio da análise por espectrometria de massas por *electrospray* (EM-ESI) do extrato *A. chica*, no modo positivo [EM-ESI(+)] pode-se inferir sobre a presença de canferol, de acordo com o pico que apresenta relação massa/carga (m/z) em 287,079 (Figura 3).

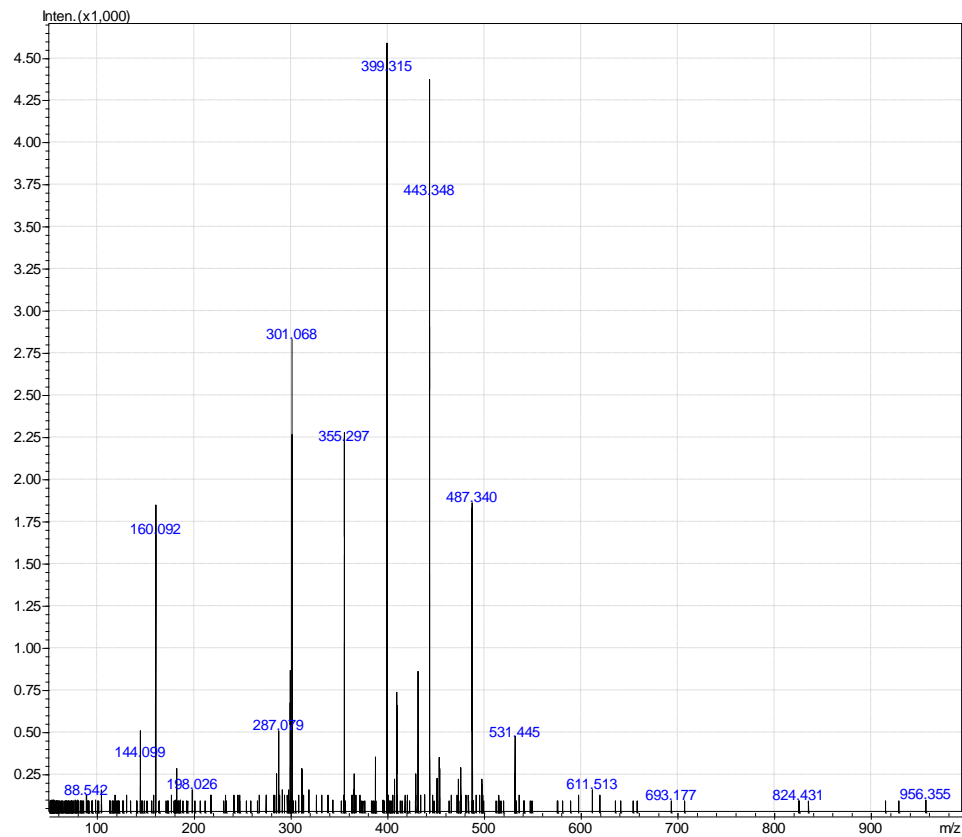


Figura 3: Análise por espectrometria de massas por *electrospray* (EM-ESI) do extrato *A. chica*, no modo positivo [EM-ESI(+)].

Com o método de extração utilizado, foi obtido um rendimento de 1,0 g de extrato/10g de folhas de *A. chica*. Esse baixo rendimento direcionou o uso do extrato de *A. chica* apenas para os ensaios *in vitro*, sendo inviável, neste momento, sua utilização no experimento *in vivo*, cujo período de estudo seria prolongado (toxicidade crônica da doxo).

Como as dosagens e o tempo de exposição das células à doxo e aos extratos de planta seriam padronizados na cultura de cardiomiócitos estabeleceu-se, primeiramente, a densidade celular ideal para essa cultura. Baseado no acompanhamento microscópico do cultivo celular, a cultura que melhor se comportou foi aquela com plaqueamento inicial de

1×10^5 células/poço na placa de 24, sendo, então, a densidade celular escolhida. Com relação ao período ideal de incubação com a doxo, obteve-se uma equação linear ($y = 20,55 + 2,93x$), significativa ($p < 0,01$), de alta magnitude ($R^2 = 0,98$) pela qual se espera 50% de morte de cardiomiócitos para 10 horas de exposição das células à doxo. Assim, padronizou-se que o período de exposição à doxo seria de 10 horas para todas as três culturas celulares.

As CTM foram fenotipadas para comprovação da população em estudo. Os resultados da citometria de fluxo (Figura 4) indicaram que as células apresentaram o perfil de marcação esperado para CTM conforme apregoado pela Sociedade Internacional para Terapia Celular. Além

disso, as CTM foram capazes de produzir gotículas lipídicas e nódulos de mineralização, quando induzidas,

respectivamente, às diferenciações adipogênica e osteogênica (Figura 5).

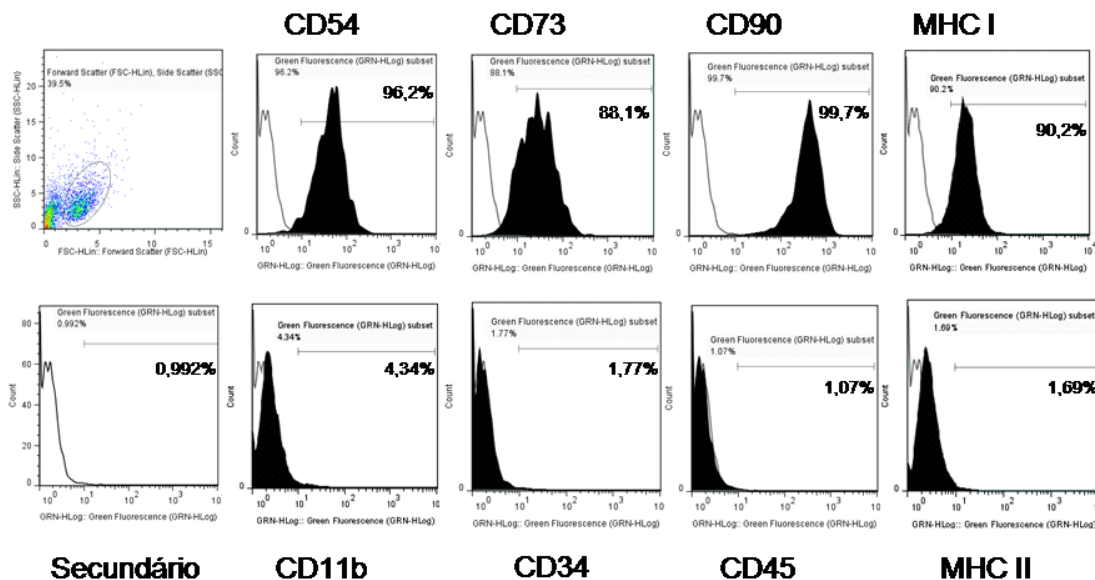


Figura 4: Caracterização fenotípica das células-tronco mesenquimais. Os gráficos acima mostram o perfil de expressão das células para os marcadores CD54, CD73, CD90, CD11b, CD34, CD45, MHC-I, MHC-II. O primeiro gráfico do painel (canto superior esquerdo) mostra a identificação da população celular a ser estudada. Abaixo dele, no canto inferior esquerdo, encontra-se o resultado obtido para avaliação de CTM apenas marcada com o anticorpo secundário. A linha preta horizontal presente em todos os gráficos constitui a fluorescência do controle negativo, sendo que os pontos a sua esquerda são considerados negativos para a marcação. A região colorida em preto constitui a fluorescência da população de células analisadas. A porcentagem das células positivas para cada marcador é informada no canto superior direito de cada gráfico. n=3.

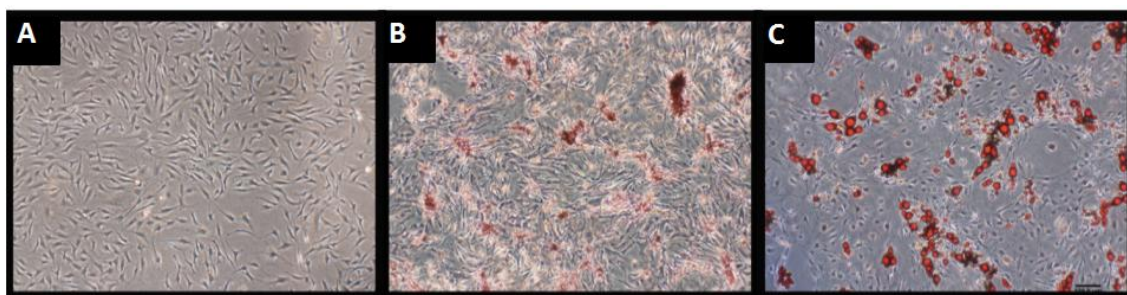


Figura 5: Células-tronco mesenquimais (CTM) indiferenciadas (A) e após indução às diferenciações osteogênica (B) e adipogênica (C). Em B, após coloração pelo método de Von Kossa, nódulos de mineralização podem ser observados, em coloração marrom, especialmente no canto direito da imagem. Em C, notam-se gotículas lipídicas coradas em vermelho pela coloração *Oil Red*. n=3, aumento 4x, barra escala = 125µm.

Inicialmente os extratos de planta foram incubados às culturas celulares por 24 horas, em diferentes concentrações. Nos três cultivos celulares as doses de 200 e 100 µg/ml se mostraram tóxicas, resultando em uma média de 40% a 60% de morte celular, se comparadas ao controle ($p < 0,05$), segundo a técnica de conversão do MTT. Dessa forma, essas concentrações foram desconsideradas do estudo, sendo avaliadas as doses de 12,5; 25 e 50 µg/ml. A figura 6 mostra a viabilidade das diferentes células quando incubadas com os dois extratos de planta em diferentes concentrações, sendo

interessante notar que em nenhum dos três cultivos celulares houve diminuição significativa da viabilidade, para quaisquer extratos, em nenhuma das doses utilizadas. Tal resultado mostra que as doses de 12,5; 25 e 50 µg/ml não são tóxicas para as células.

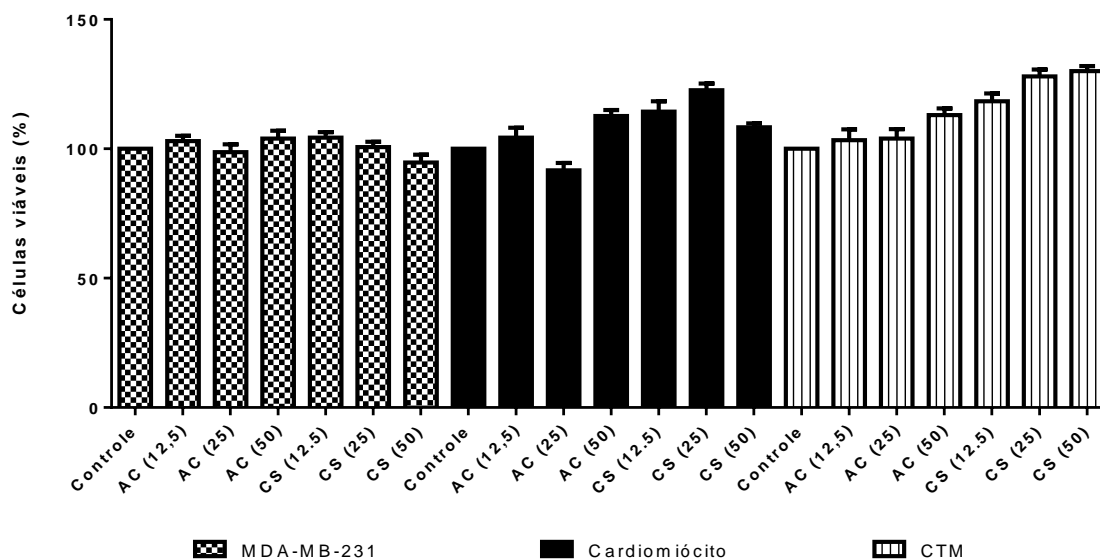


Figura 6: Viabilidade celular avaliada pelo ensaio de metabolização do MTT, após normalização considerando cada controle como 100% de células viáveis (eixo da abscissa se refere à porcentagem em relação ao controle de cada cultura celular). Toxicidade dos extratos de *Arrabidaea chica* (AC) e de *Camellia sinensis* (CS) incubados por 24 horas, nas doses de 12,5; 25 e 50 µg/ml em células de tumor de mama linhagem MDA-MB 231 (colunas quadriculadas), cardiomiócitos (colunas em preto) e células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (colunas listradas).

Os três diferentes cultivos celulares foram incubados com a doxo na dose de 5 µmol/l durante 24 horas para o estudo de sua toxicidade, sendo constatada diferença entre os cultivos celulares ($p < 0,05$).

Conforme ilustrado na figura 7, o cultivo de cardiomiócitos foi o mais sensível (14,7%

de células viáveis), seguido de CTM (44,5%) e células de tumor de mama (62,1%), sendo os três grupos estatisticamente diferentes entre si. A partir desses dados pode-se inferir mortalidade celular de 85,3% em cardiomiócitos, de 55,5% em CTM e de 37,9% em células de tumor de mama.

Tais resultados indicam elevada mortalidade de CTM e de cardiomiócitos

que não são células-alvo da ação do quimioterápico.

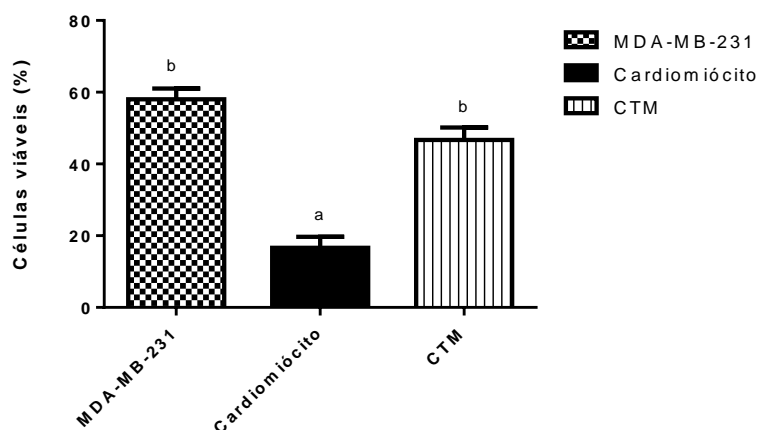


Figura 7: Viabilidade celular avaliada pelo ensaio de metabolização do MTT, após normalização considerando cada controle como 100% de células viáveis (eixo da abscissa se refere à porcentagem em relação ao controle de cada cultura celular). Porcentagem de células viáveis após utilização de doxorubicina, na dose de 5 $\mu\text{mol/l}$ durante 24 horas, em cultivos de células de tumor de mama linhagem MDA-MB 231 (coluna quadriculada), cardiomiócitos (coluna em preto) e células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (coluna listrada). Respective controles não mostrados. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

A associação dos extratos de plantas com a doxo mostrou que ambos os extratos foram capazes de diminuir significativamente a morte celular causada pelo fármaco, tanto em cardiomiócitos, quanto em CTM. Contudo, houve diferença quanto a esse potencial protetor, sendo o extrato de *C. sinensis* superior ao extrato da *A. chica* ($p < 0,05$). Além disso, os extratos das plantas não interferiram no potencial

antitumoral da doxo, o que foi constatado com os resultados para as células de tumor de mama.

As células tumorais, quando incubadas com doxo associada aos extratos, apresentaram semelhante morte celular quando incubadas somente com a doxo ($p < 0,05$). Esses dados encontram-se nas figuras de 8 a 10 e tabela 4.

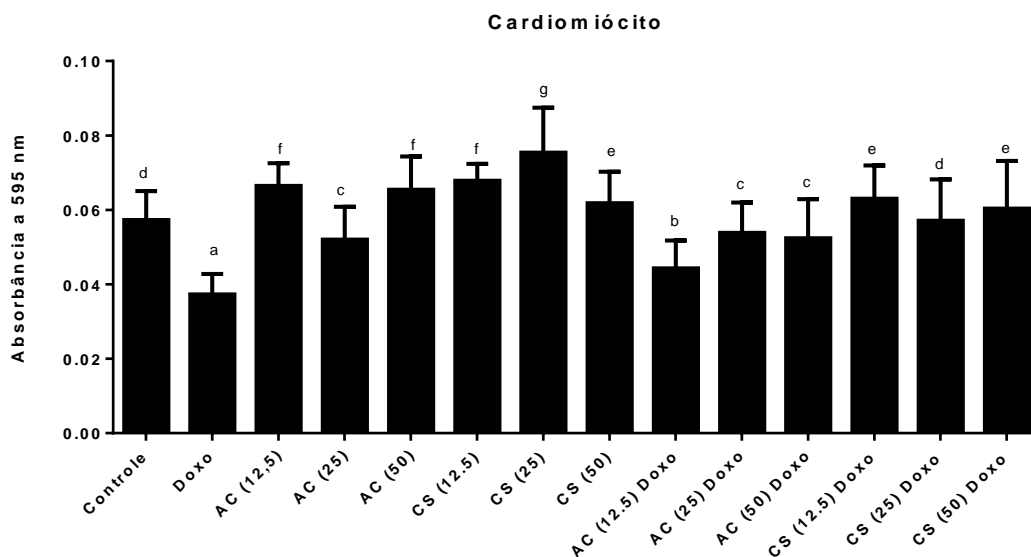


Figura 8: Valores de absorbância (595 nm) obtidos pelo ensaio de metabolização do MTT para viabilidade celular, avaliando o efeito da doxorubicina e dos extratos de *Arrabidaea chica* (AC) e de *Camellia sinensis* (CS) quando incubados em cardiomiócitos. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

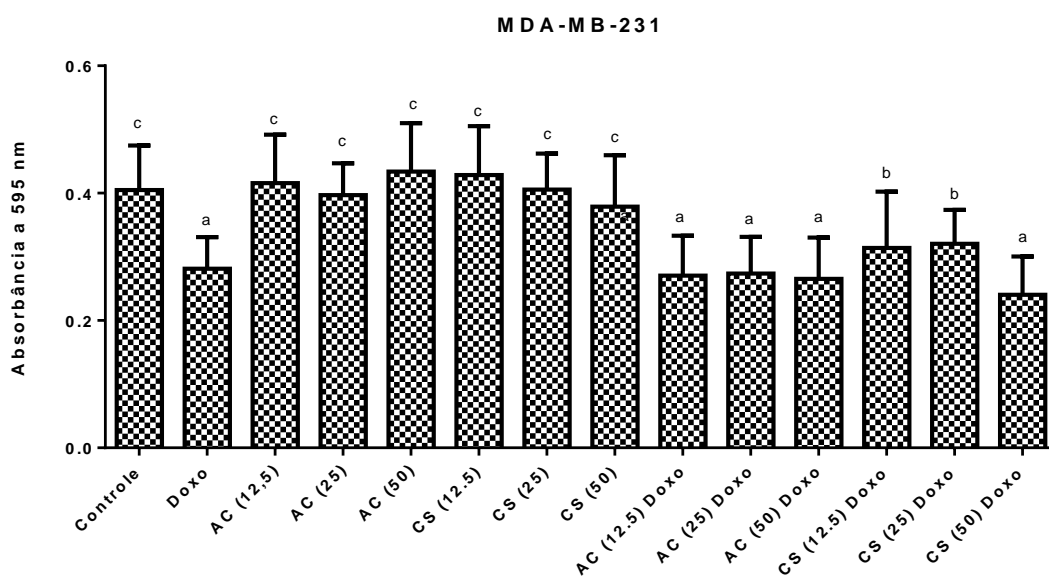


Figura 9: Valores de absorbância (595 nm) obtidos pelo ensaio de metabolização do MTT para viabilidade celular, avaliando o efeito da doxorubicina e dos extratos de *Arrabidaea chica* (AC) e de *Camellia sinensis* (CS) quando incubados em células de tumor de mama linhagem MDA-MB 231. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

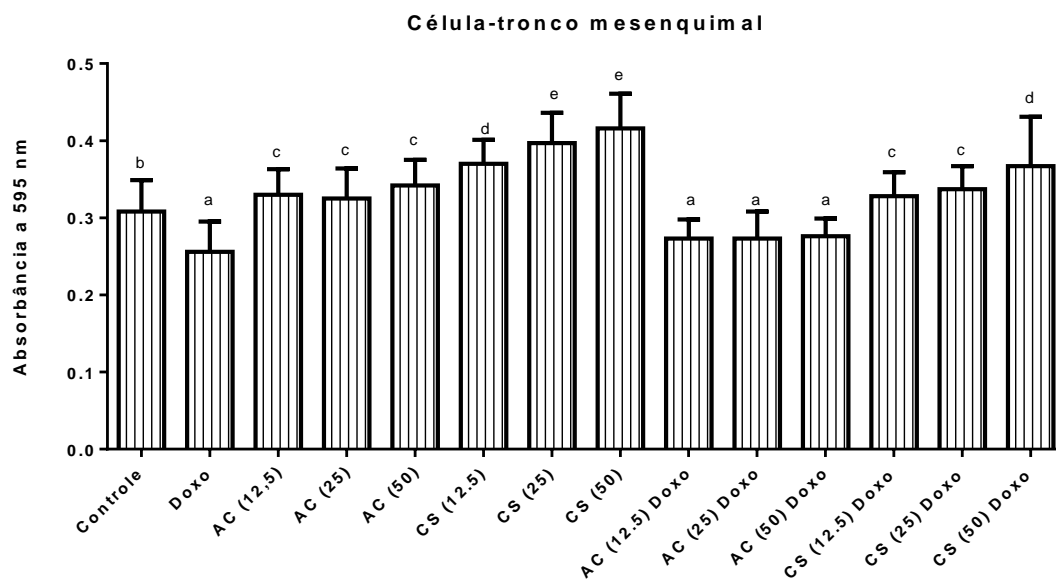


Figura 10: Valores de absorbância (595 nm) obtidos pelo ensaio de metabolização do MTT para viabilidade celular, avaliando o efeito da doxorubicina e dos extratos de *Arrabidaea chica* (AC) e de *Camellia sinensis* (CS) quando incubados em células-tronco mesenquimais. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Tabela 4: Resultados observados no ensaio de MTT em cultivo de cardiomiócitos, células de tumor de mama da linhagem MDA-MB 231 e células-tronco mesenquimais após incubação com extratos de *Arrabidaea chica*, *Camellia sinensis* e doxorubicina. Valores de absorbância (595 nm) e porcentual após normalização com o controle.

| Tipo celular | Tratamentos experimentais† | Absorbância (595 nm)‡ | Valor em % |
|----------------|----------------------------|-----------------------|------------|
| Cardiomiócitos | Doxo | 0,037270 a | 60 |
| | AC (12,5) Doxo | 0,044252 b | 78 |
| | AC (25) | 0,051974 c | 78 |
| | AC (50) Doxo | 0,052381 c | 97 |
| | AC (25) Doxo | 0,053789 c | 112 |
| | CS (25) Doxo | 0,057085 d | 94 |
| | Cont | 0,057270 d | 100 |
| | CS (50) Doxo | 0,060344 e | 106 |
| | CS (50) | 0,061752 e | 82 |
| | CS (12,5) Doxo | 0,062956 e | 116 |
| | AC (50) | 0,065381 f | 125 |
| | AC (12,5) | 0,066456 f | 190 |
| | CS (12,5) | 0,067789 f | 103 |
| | CS (25) | 0,075344 g | 111 |
| Tumor de mama | CS (50) Doxo | 0,240185 a | 59 |
| | AC (50) Doxo | 0,265444 a | 66 |
| | AC (12,5) Doxo | 0,270593 a | 67 |
| | AC (25) Doxo | 0,273741 a | 68 |
| | Doxo | 0,281148 a | 69 |

Continua...

Tabela 4: Resultados observados no ensaio de MTT em cultivo de cardiomiócitos, células de tumor de mama da linhagem MDA-MB 231 e células-tronco mesenquimais após incubação com extratos de *Arrabidaea chica*, *Camellia sinensis* e doxorubicina. Valores de absorbância (595 nm) e porcentual após normalização com o controle

Continuação...

| Tipo celular | Tratamentos experimentais [†] | Absorbância (595 nm) [‡] | Valor em % |
|----------------|--|-----------------------------------|------------|
| Tumor de mama | CS (12,5) Doxo | 0,313778 b | 77 |
| | CS (25) Doxo | 0,320296 b | 79 |
| | CS (50) | 0,378815 c | 94 |
| | AC (25) | 0,397037 c | 98 |
| | Cont | 0,404889 c | 100 |
| | CS (25) | 0,405444 c | 100 |
| | AC (12,5) | 0,415630 c | 103 |
| | CS (12,5) | 0,428333 c | 106 |
| | AC (50) | 0,433778 c | 107 |
| Células-tronco | Doxo | 0,256407 a | 83 |
| | AC (25) Doxo | 0,272778 a | 89 |
| | AC (12,5) Doxo | 0,273185 a | 89 |
| | AC (50) Doxo | 0,275741 a | 90 |
| | Cont | 0,307704 b | 100 |
| | AC (25) | 0,324741 c | 106 |
| | CS (12,5) Doxo | 0,328000 c | 107 |
| | AC (12,5) | 0,329593 c | 107 |
| | CS (25) Doxo | 0,336481 c | 109 |
| | AC (50) | 0,341593 c | 111 |
| | CS (50) Doxo | 0,366630 d | 119 |
| | CS (12,5) | 0,370074 d | 120 |
| | CS (25) | 0,397074 e | 129 |
| | CS (50) | 0,415704 e | 135 |

[†]CS = *Camellia sinensis*, Doxo = doxorubicina, AC = *Arrabidaea chica*, Cont = controle, 12,5; 25 e 50 = doses utilizadas dos extratos, em µg/ml.

[‡]Média de três ensaios experimentais independentes, para cada tipo de cultivo celular.

Letras diferentes indicam diferença estatística por ANOVA - Scott-knott (p<0,05) dentro de cada cultivo celular.

Considerando-se que a leitura dos resultados do ensaio de MTT se baseia em análise colorimétrica, uma limitação foi a utilização de substâncias que apresentavam cor. A doxo na forma líquida e os extratos das plantas na apresentação em pó apresentavam coloração avermelhada. Após diluição para utilização nas culturas celulares todos os tratamentos se apresentavam com coloração muito discreta, bastante clara, mas que possivelmente poderia ser detectada quando da leitura no leitor de micro placas. Dada à impossibilidade de se reproduzir a exatidão dos tratamentos no controle e no

branco, os achados de absorbância para os grupos tratados podem ter sido superestimados.

Por esse motivo, procedeu-se aos ensaios de incorporação de PI, os quais apresentaram semelhante padrão de resposta, corroborando os dados do MTT. Os extratos das duas plantas preveniram morte celular pela doxo em cardiomiócitos (Figura 11) e não somente não interferiram na atividade antitumoral do quimioterápico, como até potencializaram seus efeitos nas células MDA-MB-231 (Figura 12).

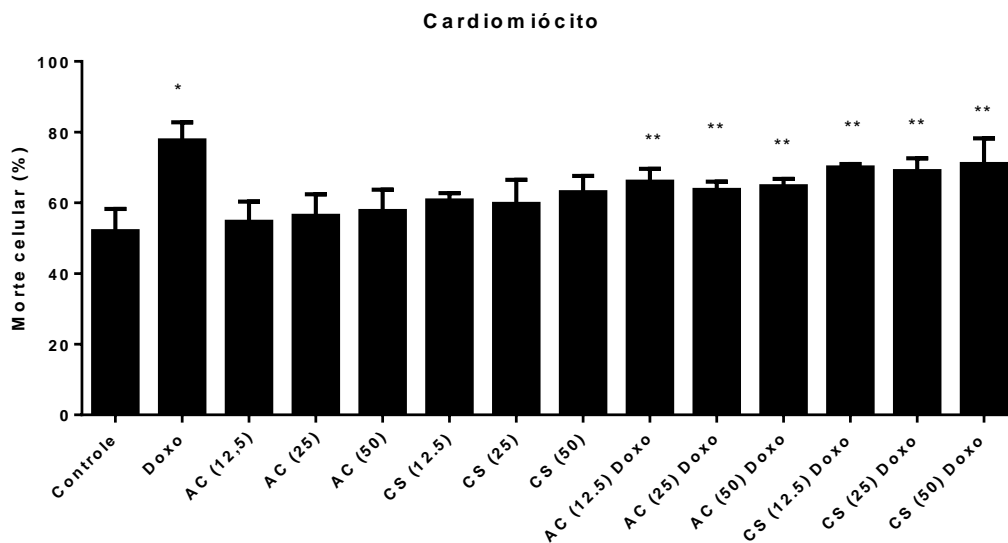


Figura 11: Valores de morte celular (% em relação ao controle) obtidos com o ensaio de incorporação de iodeto de propídeo para avaliação do ciclo celular, pesquisando o efeito da doxorubicina (doxo) e dos extratos de *Arrabidaea chica* (AC) e de *Camellia sinensis* (CS) quando incubados em cardiomiócitos. * *versus* Controle; ** *versus* Doxo ($p < 0,05$).

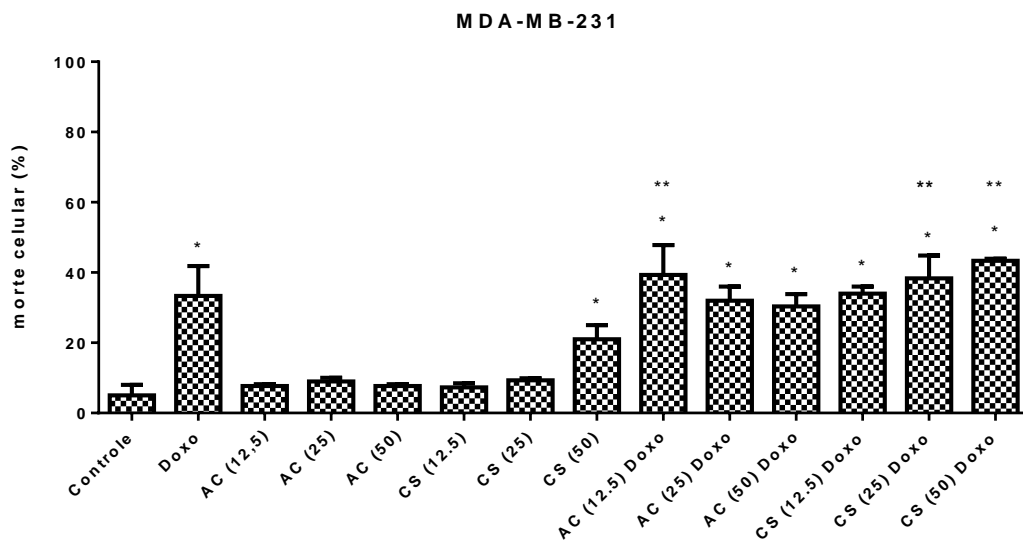


Figura 12: Valores de morte celular (% em relação ao controle) obtidos com o ensaio de incorporação de iodeto de propídeo para avaliação do ciclo celular, pesquisando o efeito da doxorubicina (doxo) e dos extratos de *Arrabidaea chica* (AC) e de *Camellia sinensis* (CS) quando incubados em células de tumor de mama linhagem MDA-MB-231. * *versus* Controle; ** *versus* Doxo ($p < 0,05$).

Avaliações por microscopia de fluorescência indicaram um padrão alterado de marcação do núcleo das células-tronco com o PI o que inviabilizou a realização do ensaio nesse tipo celular.

Uma limitação desses ensaios foi a taxa de mortalidade relativamente alta encontrada no grupo controle de cardiomiócitos (média de 52% de mortalidade, considerando três experimentos independentes). Tal fato pode se justificar por excesso de manipulação do cultivo celular decorrente do protocolo utilizado e por se tratar de uma cultura celular primária, diferentemente do observado para células MDA-MB-231 que é uma linhagem imortalizada (média de 5% de mortalidade, considerando três experimentos independentes).

5.2 Ensaio experimentais *in vivo*

Dos 40 animais, 15 morreram, sendo cinco de cada um dos grupos doxo, doxo+CTM e doxo+CS. Contudo, um dos animais do grupo doxo veio a óbito logo após a realização do ecocardiograma. Dessa forma,

com exceção da ecocardiografia, as demais avaliações foram feitas em apenas dois animais do grupo doxo.

Comparando com o controle e o grupo CS, todos os animais que receberam doxo perderam peso ao longo do experimento ($p < 0,05$), sendo os menores valores para os grupos doxo e doxo+CS. Considerando-se os pesos dos animais ao final e ao início do experimento, os grupos controle e CS apresentaram ganho médio de peso de 60 g e 33 g, respectivamente, enquanto os demais apresentaram perda média de peso de 46 g (Doxo+CTM), 55 g (Doxo) e 62 g (Doxo+CS) (Tabela 5).

Nos três grupos que receberam a doxo (doxo, doxo+CTM, doxo+CS) havia animais debilitados, apáticos, desidratados, com pelagem opaca e apresentando diarreia mucosa de coloração esverdeada. Diferentemente, todos os animais dos grupos controle e CS apresentavam-se com aspecto saudável até o final do experimento.

Tabela 5: Peso vivo (média e desvio padrão) de ratos Wistar e a diferença entre os valores obtidos ao início e ao final do experimento.

| Variáveis | Grupos | | | | |
|-------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | Controle | CS | Doxo | Doxo+CTM | Doxo+CS |
| Peso inicial (g) | 314(17,5) | 319(29,1) | 308(26,6) | 315(27,0) | 307(21,5) |
| Peso final (g) | 374 (24,5) ^a | 352(23,7) ^a | 253(46,7) ^b | 269(13,3) ^b | 245(24,8) ^b |
| <i>Delta</i> peso | +60(21,3) | +33(45,8)* | -55(49,0) | -46(33,4) | -62(27,1) |

CS: *Camellia sinensis*; Doxo: doxorubicina; CTM: células-tronco mesenquimais. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$). * *versus* Controle ($p < 0,05$).

Com relação ao ECG, não foram observadas alterações nos exames realizados no tempo zero. Comparando-se o exame do final do experimento com o do tempo zero, foram detectados aumentos na

amplitude das ondas P, R e T, em diferentes animais dos três grupos que receberam a doxo (Figura 13). Arritmias cardíacas não foram diagnosticadas.

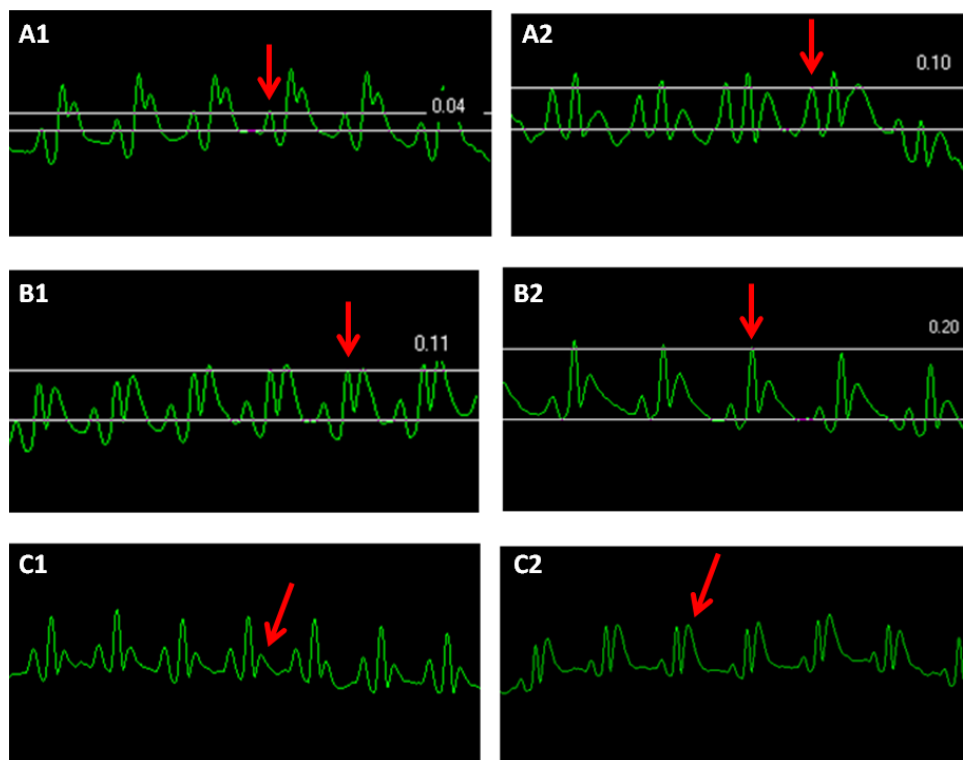


Figura 13: Traçados eletrocardiográficos representativos (velocidade 50 mm/s, sensibilidade 2N) de ratos Wistar do grupo tratado com doxorrubicina. Os traçados à esquerda do painel foram obtidos no tempo zero e os à direita, ao final do experimento. Nota-se aumento na amplitude de onda P (de 0,04 mV [A1] para 0,10 mV [A2]), de onda R (de 0,11 mV [B1] para 0,20 mV [B2]) e de onda T (amplitude superior à da onda R [C2] o que não era detectado para o mesmo animal no início do experimento [C1]).

A avaliação ecocardiográfica no tempo zero indicou que todos os animais estavam saudáveis e não foram detectadas diferenças estatísticas em nenhum parâmetro avaliado, nos cinco diferentes grupos.

O estudo da função ventricular, tradicionalmente avaliada pelo modo-M, mostrou que, em relação ao tempo zero, apenas os animais do grupo doxo apresentaram significativa disfunção contrátil, indicando sucesso na indução da cardiotoxicidade com a dose de doxo utilizada.

Os animais dos grupos doxo+CTM e doxo+CS, embora tenham recebido doxo, conseguiram preservar a função ventricular, mantendo os valores estatisticamente iguais aos do tempo zero, indicando ter havido efeito cardioprotetor tanto das CTM, quanto do extrato de *C. sinensis*. Como esperado, os grupos controle e CS apresentaram, ao final do experimento, valores semelhantes aos do tempo zero. A figura 14 ilustra esses achados.

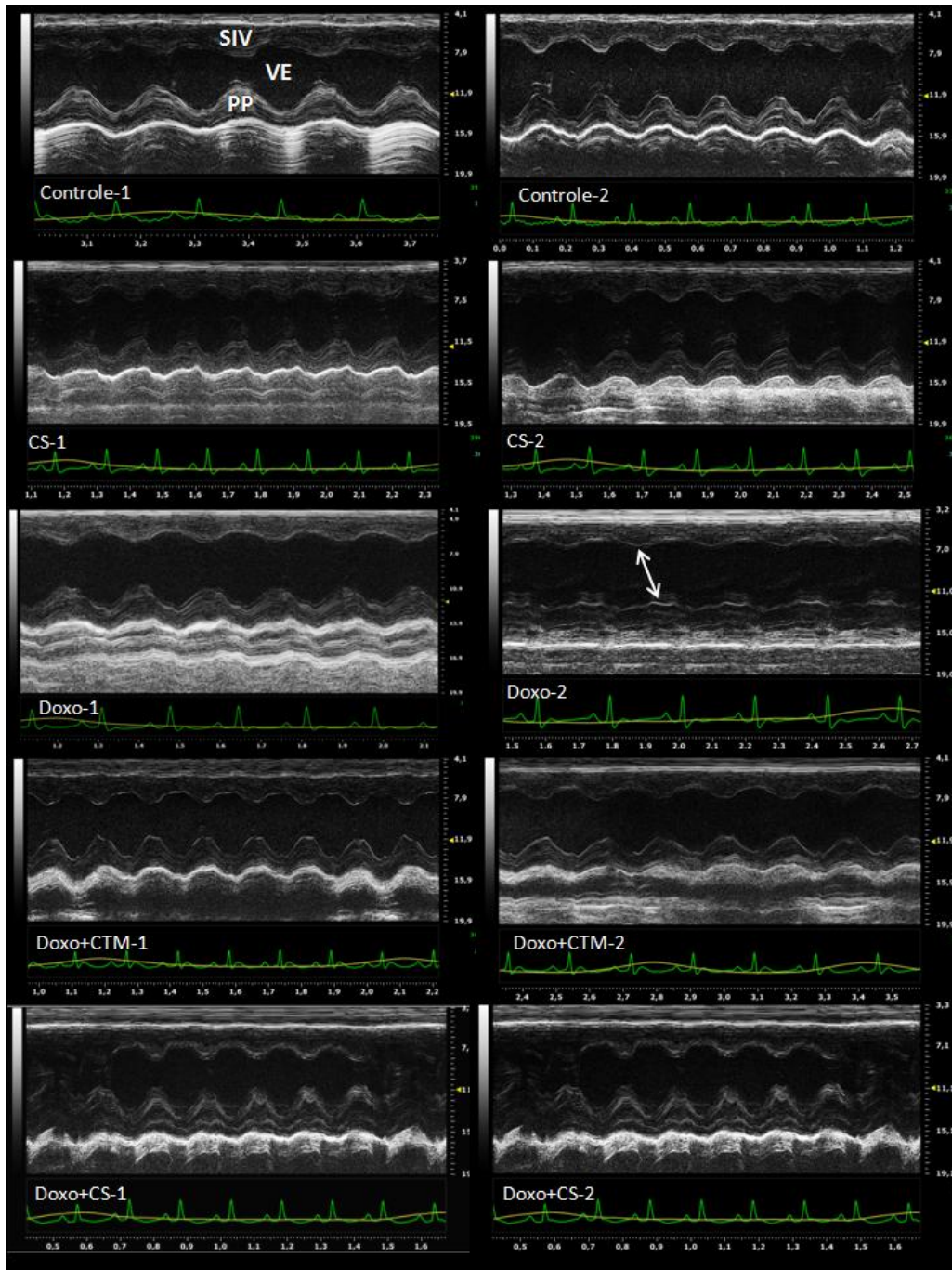


Figura 14: Função ventricular pelo modo-M. Ilustrações à esquerda do painel (1) indicam tempo zero, e à direita (2), o final do experimento. Em 1, todos os grupos apresentam semelhante padrão, ao passo que em 2, o animal do grupo doxorubicina (doxo) apresenta contração ventricular diminuída e assincronia (seta) entre a movimentação do septo interventricular (SIV) e a parede posterior do ventrículo esquerdo (PP). CS: *Camellia sinensis*; CTM: célula-tronco mesenquimal; VE: câmara interna do ventrículo esquerdo.

Os valores de F.Ej., F.Enc. e *strain* radial dos animais dos grupos doxo+CTM e doxo+CS, ao final do experimento, se apresentaram estatisticamente semelhantes ao controle e maiores que os do grupo doxo. Com relação à medida de *strain* longitudinal, apenas os animais tratados com CTM (grupo doxo+CTM)

apresentaram valores semelhantes ao controle. O grupo doxo+CTM apresentou a medida de *strain* longitudinal significativamente maior que o doxo+CS, cujos valores estavam semelhantes ao grupo doxo. A tabela 6 e as figuras 15 a 17 sumarizam esses achados.

Tabela 6: Principais parâmetros (média e desvio padrão) ecocardiográficos de ratos Wistar avaliados ao final do experimento.

| Variáveis | Grupos | | | | |
|--------------------------|------------|------------|-------------|-------------|------------|
| | Controle | CS | Doxo | Doxo+CTM | Doxo+CS |
| FC (bpm) | 332(9,9) | 362(32,4) | 332(49,9) | 331(18,8) | 355(55,5) |
| DC | 68,1(9,7)a | 70,7(8,2)a | 48,2(16,8)b | 54,1(10,8)b | 48,8(7,3)b |
| F. Ej. (%) | 68,9(1,9)a | 69,9(5,9)a | 54,4(4,4)b | 72,3(3,7)a | 68,7(7,4)a |
| F. Enc. (%) | 36,9(2,1)a | 37,4(2,7)a | 28,8(6,1)b | 44,2(5,4)a | 39,8(6,1)a |
| Vol. Ej. | 205(29,0)a | 198(15,6)a | 139(31,1)b | 164(32,3)ab | 119(37,6)b |
| <i>Strain</i> radial (%) | 17,1(6,1)a | 24,8(7,9)a | 8,1(1,1)b | 23,9(15,5)a | 16,7(5,2)a |
| <i>Strain</i> long (%) | 15,2(4,2)a | 15,6(3,2)a | 7,1(2,0)b | 16,2(2,1)a | 9,7(1,1)b |

CS: *Camellia sinensis*; Doxo: doxorubicina; CTM: células-tronco mesenquimais; FC: frequência cardíaca; bpm: batimentos por minuto; DC: débito cardíaco; F.Ej.: fração de ejeção; F.Enc.: fração de encurtamento; Vol.Ej.: volume de ejeção; *strain* long: *strain* longitudinal. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

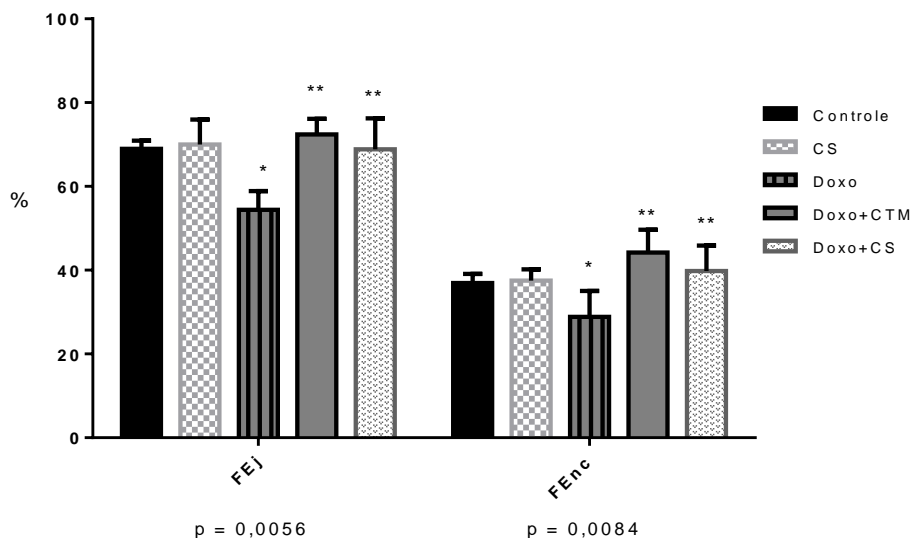


Figura 15: Valores de fração de ejeção (F.Ej.) e de encurtamento (F.Enc.) calculados a partir de mensurações feitas no modo-M em ecocardiografia realizada em ratos Wistar ao final do experimento. CS: *Camellia sinensis*; Doxo: doxorubicina; CTM: célula-tronco mesenquimal. * *versus* Controle; ** *versus* Doxo (p -value é indicado para cada variável).

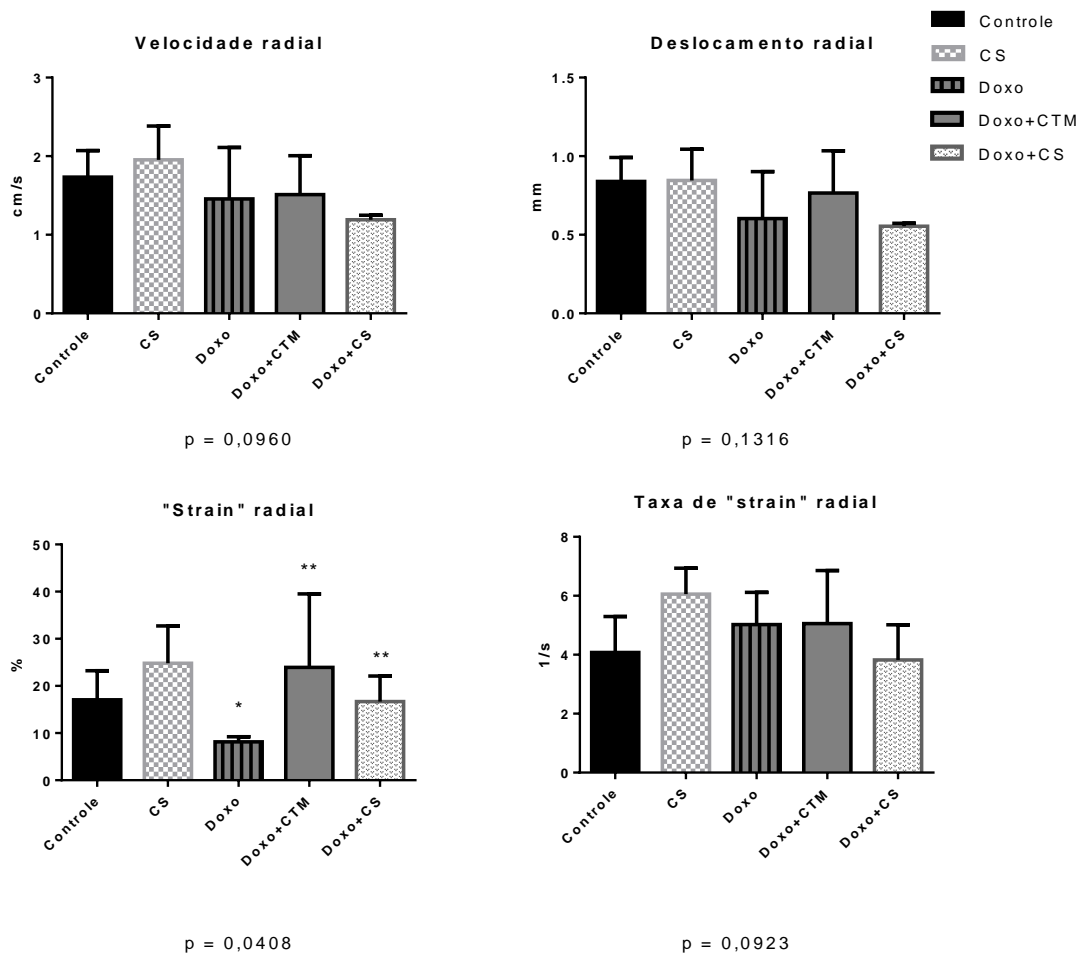


Figura 16: Parâmetros radiais de ecocardiografia *speckle-tracking* obtidos a partir de mensurações feitas no modo bidimensional em exame realizado ao final do experimento. CS: *Camellia sinensis*; Doxo: doxorubicina; CTM: célula-tronco mesenquimal. * *versus* Controle; ** *versus* Doxo (*p-value* é indicado para cada variável).

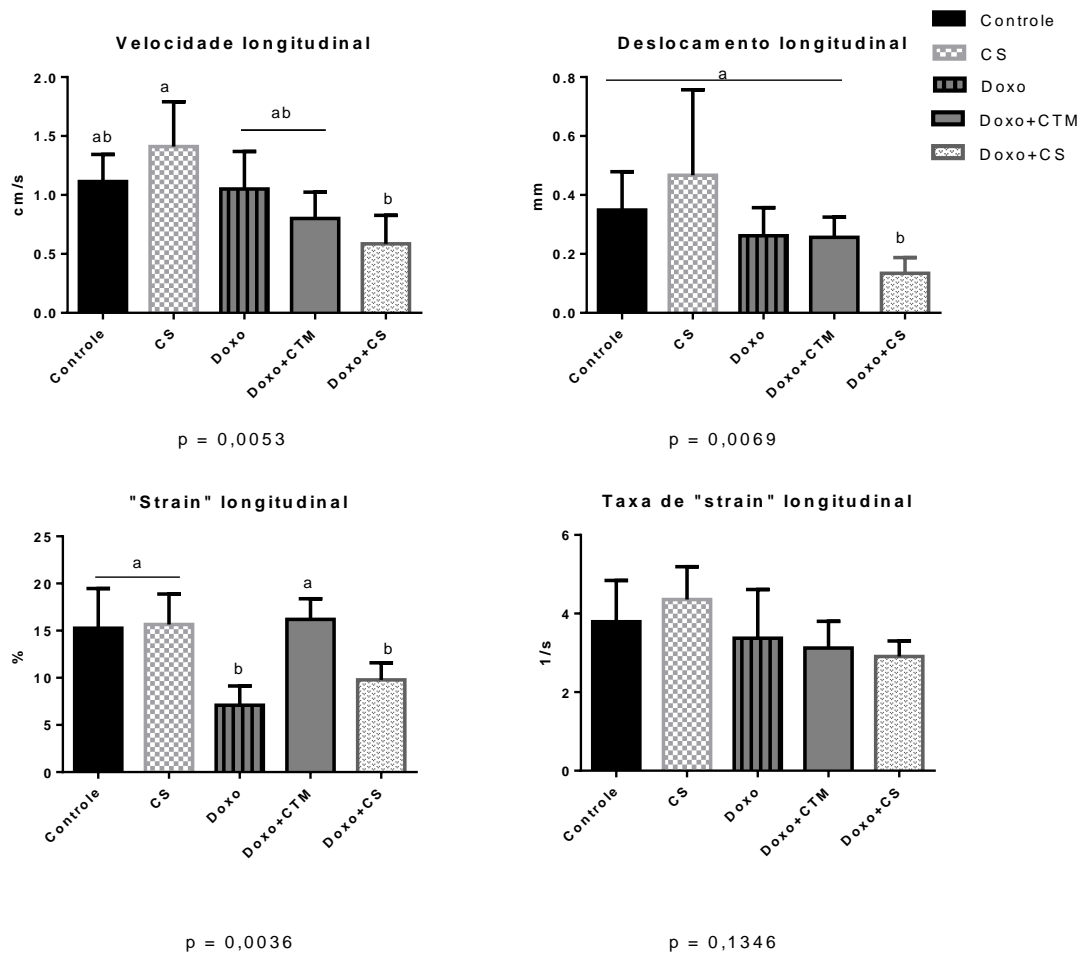


Figura 17: Parâmetros longitudinais de ecocardiografia *speckle-tracking* obtidos a partir de mensurações feitas no modo bidimensional em exame realizado ao final do experimento. Letras diferentes indicam diferença estatística (*p-value* é indicado para cada variável). CS: *Camellia sinensis*; Doxo: doxorubicina; CTM: célula-tronco mesenquimal.

A tecnologia *optical flow* empregada na ecocardiografia *speckle-tracking* permite visibilizar a movimentação de diferentes segmentos do miocárdio durante o ciclo cardíaco. Por meio de vídeos pode-se observar a movimentação ventricular acompanhando a amplitude dos vetores gerados. Amplitudes amplas indicam maior movimentação, ao passo que amplitudes pequenas indicam menor movimentação como resultado de disfunção ventricular.

A figura 18 traz uma imagem congelada de um vídeo representativo de cada grupo, captada no momento de maior amplitude dos vetores. A observação de vetores amplos nos grupos controle e CS, pequenos no doxo e intermediários em doxo+CTM e doxo+CS corroboram os resultados reportados na tabela 6 e figuras 15 a 17, que mostraram cardiotoxicidade induzida pela doxo e preservação da função cardíaca com uso de CTM e flavonóides.

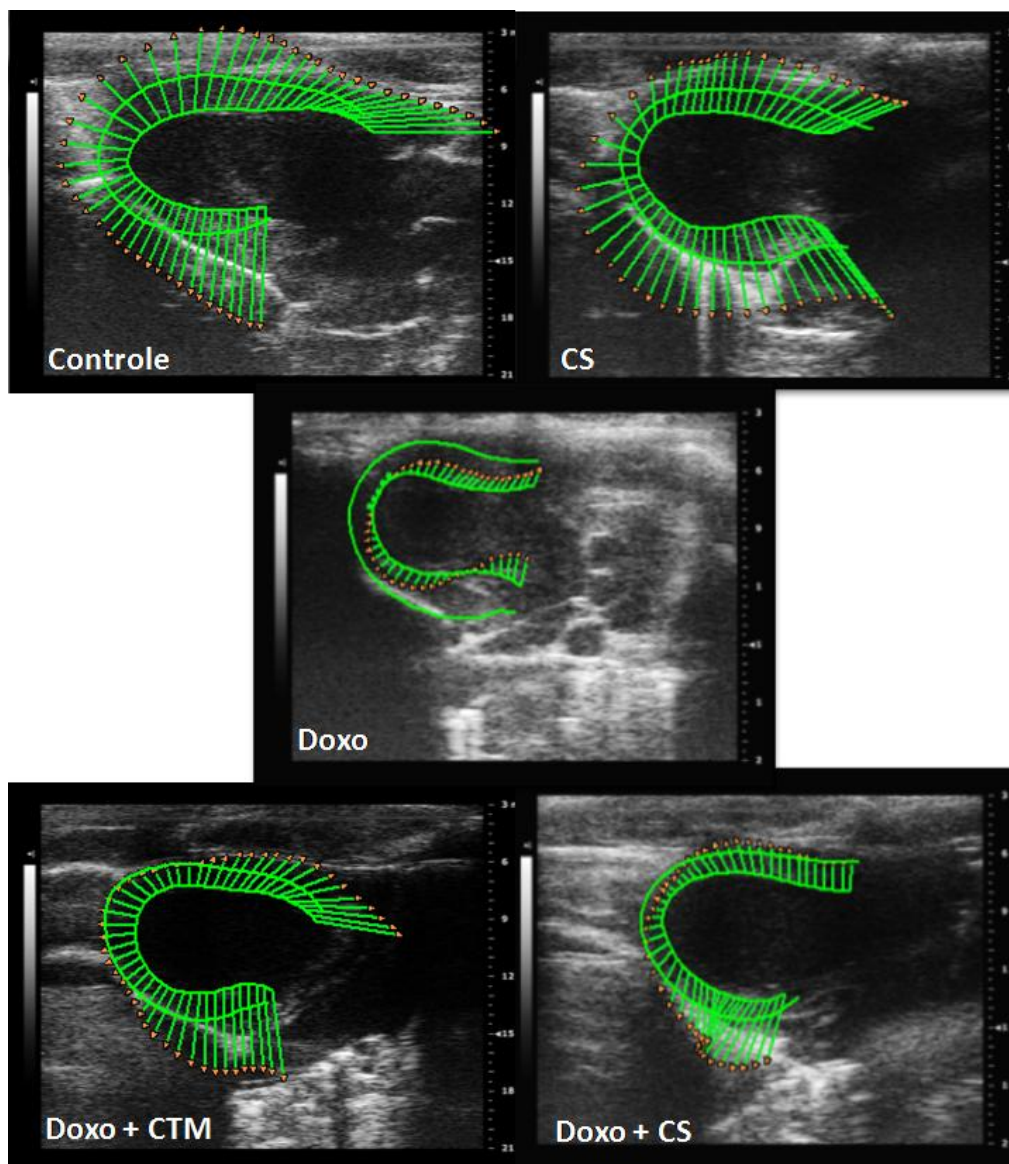


Figura 18: Vetores obtidos quando da avaliação com o algoritmo *optical flow* por meio da ecocardiografia *speckle-tracking* bidimensional, tomados ao final do experimento. Notar que a amplitude dos vetores difere entre os grupos. No controle e no CS os vetores são amplos, no grupo doxo, pequenos e nos grupos doxo+CTM e doxo+CS os vetores apresentam-se em tamanho intermediário. CS: *Camellia sinensis*; CTM: célula-tronco mesenquimal; doxo: doxorubicina.

Os resultados de hematologia e bioquímica sérica encontram-se nas tabelas 7 a 10. Animais dos três grupos que receberam doxo, comparados ao controle e grupo CS,

apresentaram valores estatisticamente menores para todos os parâmetros da série vermelha do sangue (Tabela 7).

Tabela 7: Valores de hematologia (média e desvio padrão) obtidos de ratos Wistar ao final do período experimental.

| Variáveis | Grupos | | | | |
|---------------------------------|-------------|------------|------------|------------|------------|
| | Controle | CS | Doxo | Doxo+CTM | Doxo+CS |
| Hemácias (x10 ⁶ /μl) | 8,1(0,9)a | 8,4(0,7)a | 7,4(0,8)b | 6,0(0,9)b | 6,1(0,8)b |
| Hemoglobina (g/dl) | 13,4 (0,4)a | 13,7(0,6)a | 12,2(1,6)b | 11,0(1,5)b | 11,9(0,3)b |
| VG (%) | 39,1(2,7)a | 39,3(2,8)a | 34,5(4,9)b | 31,7(4,6)b | 26,5(9,5)b |
| VGM (fl) | 48,7(6,6) | 47,3(5,1) | 46,2(1,9) | 53,3(1,3) | 42,5(9,5) |
| HGM (%) | 16,7(2,1) | 16,5(1,6) | 16,3(0,5) | 18,6(1,1) | 19,8(2,5) |
| CHGM (g/dl) | 34,4(2,1) | 35,1(1,7) | 35,2(0,3) | 34,9(1,1) | 49,3(17,8) |

CS: *Camellia sinensis*; Doxo: doxorubicina; CTM: células-tronco mesenquimais; VG: volume globular; VGM: volume globular médio; HGM: hemoglobina globular média; CHGM: concentração de hemoglobina globular média. Letras diferentes indicam diferença estatística (p < 0,05).

Com relação ao leucograma, os grupos doxo e doxo+CS apresentaram resultados estatisticamente menores que os demais para a maioria dos parâmetros (Tabela 8).

Dentre esses animais, destaca-se um do grupo doxo que apresentou contagem muito baixa de leucócitos (apenas 200 leucócitos totais/μl).

Tabela 8: Valores do leucograma (média e desvio padrão) obtidos de ratos Wistar ao final do período experimental.

| Variáveis | Grupos | | | | |
|-------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | Controle | CS | Doxo | Doxo+CTM | Doxo+CS |
| Leucócitos totais (/μl) | 6200(1,4)a | 5500(1,1)a | 5900(5,1)a | 5300(5,5)a | 1100(0,5)b |
| Linfócitos (/μl) | 4600(1,3)a | 4100(0,8)a | 1300(1,7)b | 2300(2,1)b | 700(0,3)b |
| Neutrófilos (/μl) | 1300(0,3) | 1200(0,4) | 2500(3,4) | 2500(2,9) | 200(0,1) |
| Monócitos (/μl) | 200(0,04) | 100(0,05) | 400(0,5) | 200(0,1) | 40(0,02) |
| Eosinófilos (/μl) | 100(0,06) | 100(0,1) | 80(0,1) | 80(0,1) | 0(0) |
| Bastonetes (/μl) | 20(3,7) | 7(1,8) | 0(0) | 131(19,1) | 0(0) |

CS: *Camellia sinensis*; Doxo: doxorubicina; CTM: células-tronco mesenquimais. Letras diferentes indicam diferença estatística (p < 0,05).

As dosagens de CK total e CK-MB estavam elevadas somente no grupo doxo+CS e as de LDH, aumentadas nos três grupos que receberam doxo, sendo ainda significativamente maiores no grupo doxo. Não houve diferença entre os grupos para os demais parâmetros de bioquímica sérica

(Tabela 9). Detectou-se diminuição significativa para os valores de proteínas totais nos grupos doxo+CTM e doxo+CS e de γ-globulinas para os grupos doxo e doxo+CTM (Tabela 10).

Tabela 9: Valores de bioquímica sérica (média e desvio padrão) obtidos de ratos Wistar ao final do período experimental.

| Variáveis | Grupos | | | | |
|--------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | Controle | CS | Doxo | Doxo+CTM | Doxo+CS |
| Glicose (g/dl) | 121(31) | 125(25) | 102(32) | 97(4,5) | 109(1,5) |
| CK (U/l) | 831(400)ab | 679(450)ab | 335(116)b | 483(295)b | 1408(348)a |
| CK-MB (U/l) | 109(132)b | 423(322)a | 128(105)b | 112(20)b | 467(170)a |
| LDH (U/l) | 2038(660)a | 1556(857)a | 700(112)c | 887(593)b | 857(237)b |
| Ureia (mg/dl) | 48(15) | 36(2,8) | 70(43) | 39(16) | 59(38) |
| Creatinina (mg/dl) | 0,54(0,12) | 0,58(0,05) | 0,64(0,23) | 0,72(0,09) | 0,58(0,15) |

CS: *Camellia sinensis*; Doxo: doxorubicina; CTM: células-tronco mesenquimais; hem: hemácias; CK: creatina quinase; CK-MB: creatina quinase isoenzima MB; LDH: lactato desidrogenase. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Tabela 10: Valores de proteínas totais e fracionadas (média e desvio padrão) obtidos de ratos Wistar ao final do período experimental.

| Variáveis | Grupos | | | | |
|-------------------------------|-----------|------------|------------|------------|------------|
| | Controle | CS | Doxo | Doxo+CTM | Doxo+CS |
| Proteínas totais (g/dl) | 7,9(0,5)a | 7,63(0,3)a | 7,9(0,1)a | 6,9(0,3)b | 6,7(0,5)b |
| Albumina (g/dl) | 3,2(1,1) | 2,1(1,1) | 2,9(0,9) | 2,1(0,3) | 2,0(0,4) |
| α 1- globulinas (g/dl) | 1,1(0,6) | 1,3(0,4) | 1,7(0,3) | 1,8(0,4) | 0,8(0,4) |
| α 2- globulinas (g/dl) | 0,6(0,5) | 0,7(0,2) | 1,1(0,5) | 1,0(0,1) | 1,3(0,5) |
| β 1- globulinas (g/dl) | 0,9(0,5) | 0,9(0,6) | 0,7(0,1) | 0,7(0,04) | 1,1(0,2) |
| β 2- globulinas (g/dl) | 1,3(0,5) | 1,5(0,5) | 1,3(0,4) | 1,2(0,2) | 1,0(0,5) |
| γ -globulinas (g/dl) | 0,7(0,3)a | 1,0(0,7)a | 0,1(0,06)b | 0,2(0,03)b | 0,5(0,01)a |

CS: *Camellia sinensis*; Doxo: doxorubicina; CTM: células-tronco mesenquimais. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Os cortes histológicos corados em HE dos corações mostraram-se sem lesões para os grupos controle (n=8) e CS (n=8) e alterados em diferentes graus para os demais grupos (n=3 em cada grupo) (Figura 19).

De forma geral, nos animais do grupo doxo detectaram-se áreas de fibrose e diversas regiões acidofílicas indicativas de degeneração hialina importante (Figura 19, C). No grupo doxo+CTM foram observados apenas pequenos pontos de degeneração hialina (Figura 19, D). No grupo doxo+CS as lesões encontradas foram hemorragia,

dilatação de vasos e dissociação das fibras musculares indicativo de edema intersticial (Figura 19, E). Foi possível observar que nos grupos doxo e doxo+CS as lesões estavam presentes quase na totalidade das áreas avaliadas, ao contrário do observado no grupo doxo+CTM onde as alterações estavam restritas a uma pequena área do miocárdio.

Contudo, é importante ressaltar as limitações de uma avaliação comparativa, pois apenas parte do coração, retirada aleatoriamente, foi destinada ao exame histopatológico.

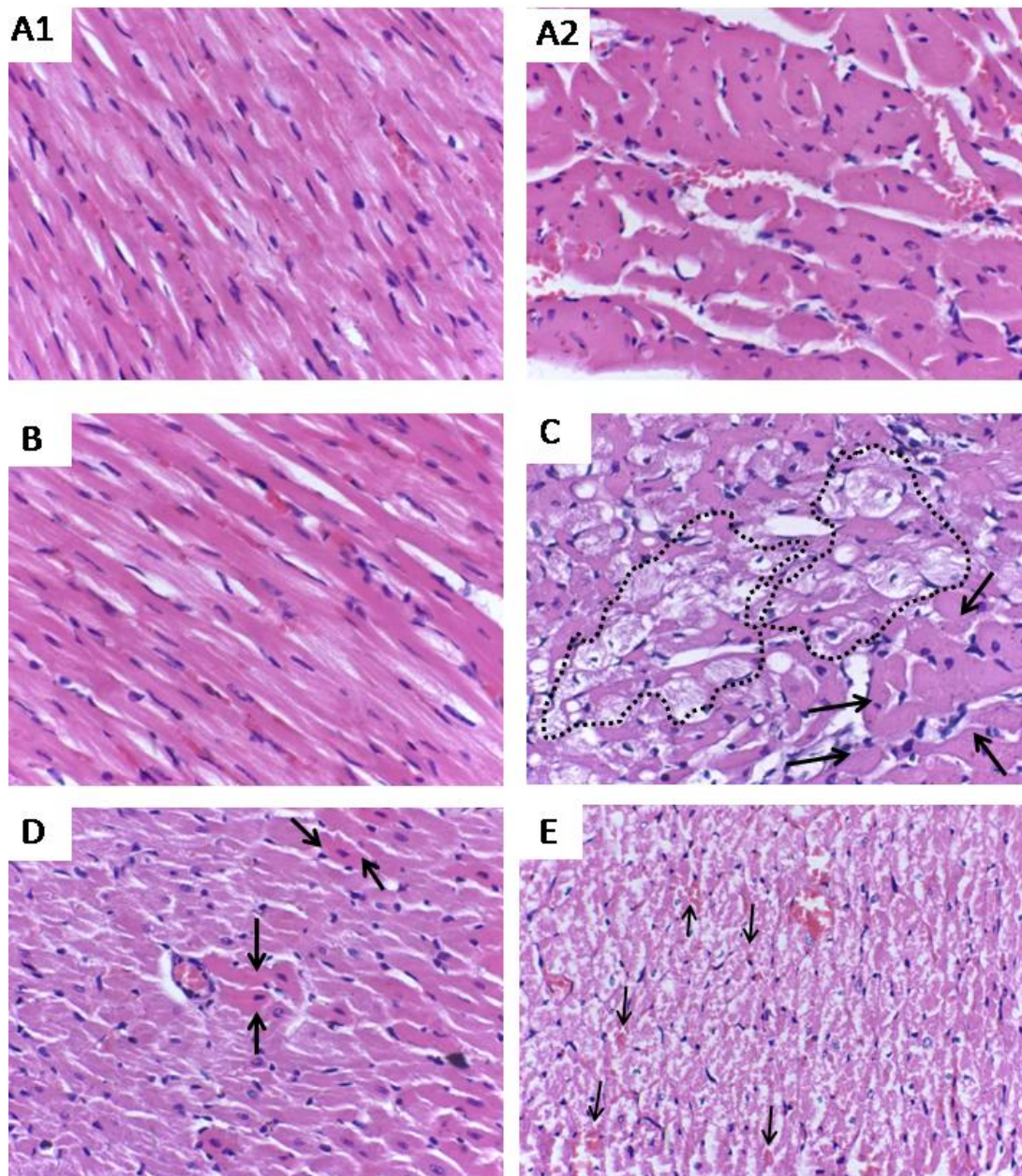


Figura 19: Cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina de coração de ratos Wistar obtidos ao final do período experimental. Ausência de lesões em animais dos grupos controle (A1 corte longitudinal, A2 corte transversal) e CS (B corte longitudinal). No grupo doxo (C corte transversal) foram detectadas áreas de degeneração hialina (setas) e de necrose (regiões destacadas em preto). No grupo doxo+CTM (D corte transversal), pequenos focos de degeneração hialina (setas). No grupo doxo+CS (E corte longitudinal), hemorragia (setas) e edema intersticial, representado pelo padrão de dissociação das fibras musculares. Imagens obtidas em aumento de 60x. CS: *Camellia sinensis*; CTM: célula-tronco mesenquimal; doxo: doxorubicina.

A presença no tecido cardíaco das CTM portadoras do gene eGFP foi avaliada por meio de PCR ao final das quatro semanas de experimento, em todos os grupos, não somente naquele que recebeu as células. Os resultados de PCR indicaram que 14 dias após a última injeção de CTM as células estavam presentes no miocárdio de animais

tratados (Figura 20). Desta forma, o efeito benéfico da injeção sistêmica de CTM pode ser explicado, dentre outros, pela presença das células no tecido cardíaco dos animais tratados.

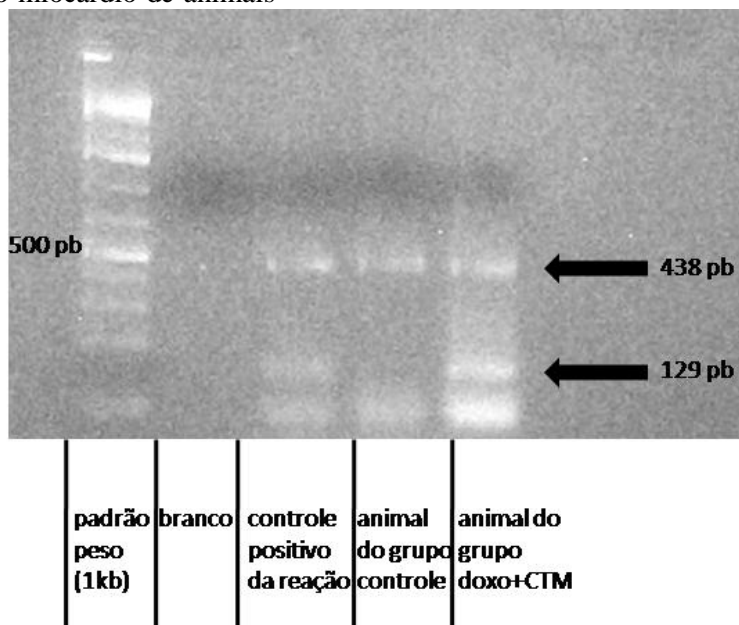


Figura 20: Detecção do gene eGFP no coração por meio da técnica de PCR. Na terceira canaleta encontra-se material genético de animal transgênico heterozigoto, usado como controle positivo da reação, mostrando amplificação de duas bandas, a de 129 pb e a de 438 pb. As canaletas quatro e cinco contêm DNA de coração de animais utilizados no experimento, respectivamente dos grupos controle e doxo+CTM, que não são animais transgênicos. Animais não transgênicos só amplificam a banda de 438 pb (quarta canaleta). Notar que o animal não transgênico tratado com CTM (quinta canaleta), além de amplificar a banda de 438 pb também é capaz de amplificar a de 129 pb que é exclusiva de material genético transgênico, confirmando a presença das CTM no coração. CS: *Camellia sinensis*; CTM: célula-tronco mesenquimal; doxo: doxorubicina.

5.3 Ensaios experimentais *ex vivo*

O teste de viabilidade celular detectou resultados estatisticamente semelhantes para ambos os grupos, sendo 0,226 (controle) e 0,227 (doxo) os valores de absorbância detectados. Houve menor produção de fosfatase alcalina pelas células do grupo doxo (0,119) se comparadas às do controle (0,143) ($p < 0,05$). Por esses dados

observou-se que embora as células do grupo doxo estivessem viáveis, sua capacidade de produzir fosfatase alcalina estava diminuída. A curva de crescimento celular (Figura 21) demonstrou diferença entre os grupos, sendo que as células do grupo doxo apresentaram taxas de proliferação menores que o controle aos cinco e sete dias ($p < 0,05$).

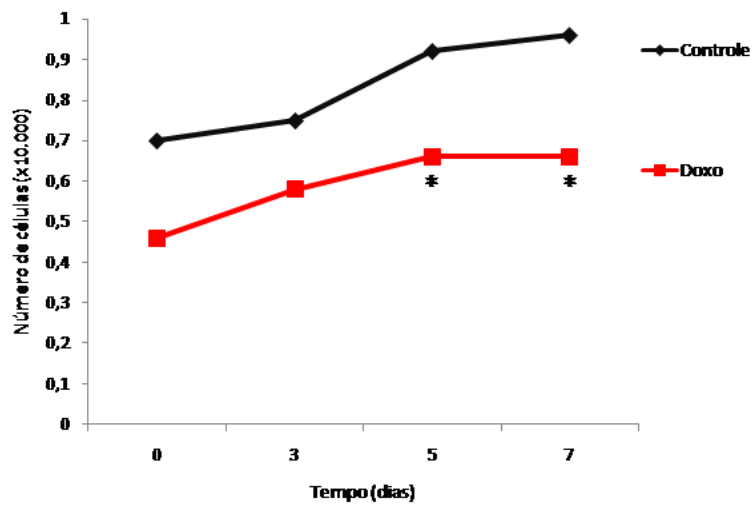


Figura 21: Curva de crescimento mostrando o número de células ao longo do tempo, avaliando a cinética de proliferação das células-tronco mesenquimais extraídas de ratos submetidos a tratamento com doxorubicina (linha inferior) e grupo controle (linha superior) nos dias 3, 5 e 7. $n=3$; $*p<0,05$.

A caracterização das CTM por imunofluorescência indicou que as células de ambos os grupos apresentavam o mesmo padrão e que este era o esperado para CTM indiferenciadas, ou seja, expressão de CD54, CD73 e CD90 e a não expressão do CD45, indicativo de células-tronco da linhagem hematopoiética. Na Figura 22

encontra-se o resultado obtido para células extraídas do grupo doxo, mostrando que as células mantem o padrão esperado, não tendo ocorrido nenhuma alteração decorrente do uso da doxo. As CTM indiferenciadas extraídas do grupo controle apresentaram resultado semelhante.

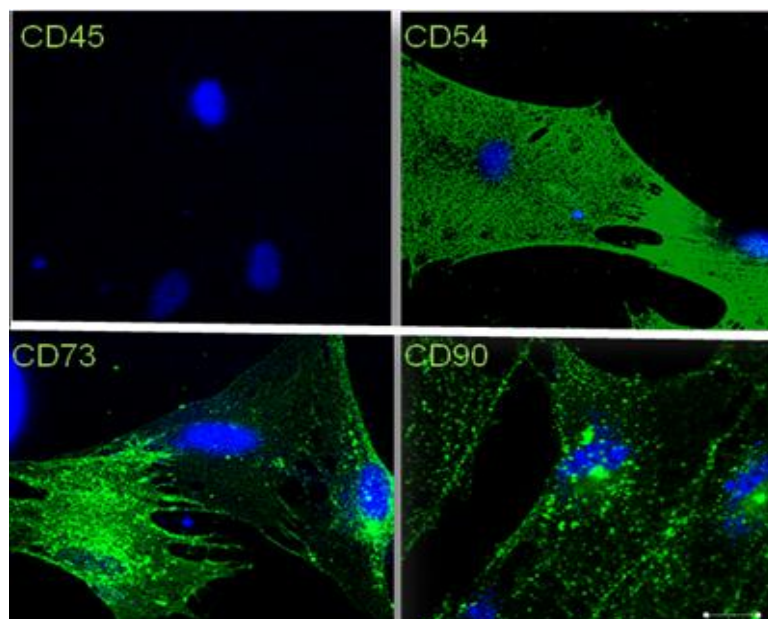


Figura 22: Marcação para as moléculas de superfície CD45, CD54, CD73 e CD90 (coloração verde) em células-tronco mesenquimais indiferenciadas extraídas da medula óssea de ratos Wistar do grupo doxorubicina, indicando manutenção do padrão para esse tipo celular. A coloração em azul marca os núcleos celulares. Imagens obtidas em microscópio confocal.

Após indução à diferenciação cardiomiogênica, as CTM foram avaliadas por imunofluorescência para expressão de α -actinina sarcomérica e por *Western blotting* para expressão de conexina-43 e troponina T cardíaca. Como esperado, não houve marcação de α -actinina sarcomérica nas CTM indiferenciadas, de ambos os grupos. Contudo, esta proteína também não foi detectada em nenhum dos dois grupos, mesmo após indução à diferenciação.

A troponina T cardíaca, como esperado, quase não foi detectada nas CTM indiferenciadas e após indução à diferenciação somente as CTM do grupo controle apresentaram expressão significativa (Figura 23).

A expressão de conexina-43 apresentou diferença entre os grupos controle e doxo para as CTM indiferenciadas, sendo menor nas células do grupo doxo (Figura 23).

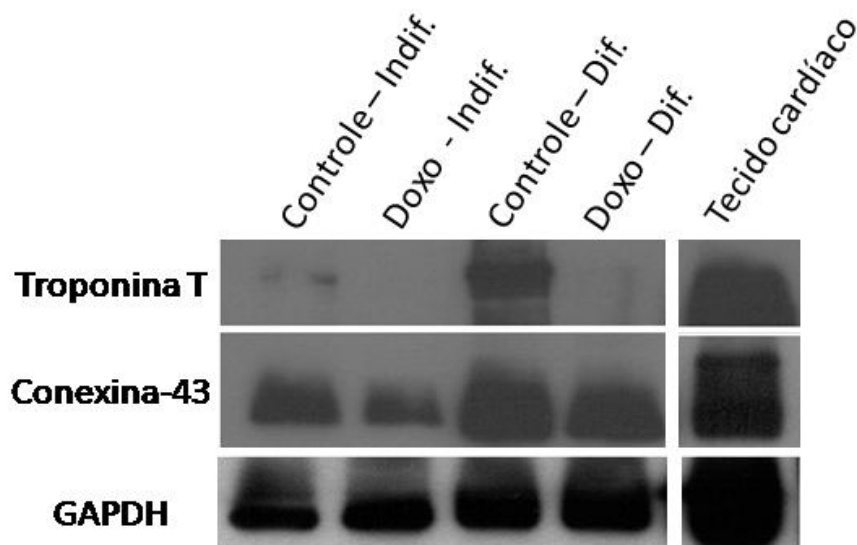


Figura 23: Expressão de troponina T cardíaca e conexina-43 por meio de *Western blotting* realizado em células-tronco extraídas de ratos dos grupos controle e doxorubicina (doxo). As células indiferenciadas de ambos os grupos não expressaram troponina T (canaletas 1 e 2, primeira linha) e as do grupo doxo produziram menor quantidade de conexina-43 (canaletas 1 e 2, segunda linha). As células induzidas à diferenciação apresentaram padrão semelhante para conexina-43, considerando-se ambos os grupos (canaletas 3 e 4, segunda linha). Por outro lado, as células do grupo doxo, mesmo induzidas à diferenciação, não foram capazes de produzir troponina T, diferentemente das células do controle (canaletas 3 e 4, primeira linha). Amostra de tecido cardíaco de rato adulto foi utilizada como controle positivo (quinta canaleta) e o GAPDH, como normalizador. Doxo: doxorubicina; Dif: indução à diferenciação; Indif: indiferenciado.

6. DISCUSSÃO

Os extratos ricos em flavonóides extraídos de *C. sinensis* e *A. chica* foram eficazes na prevenção da morte celular de cardiomiócitos, sem interferir na ação deletéria da doxo sobre células de tumor de mama, nos experimentos *in vitro*. Esse conjunto de resultados é o ideal, pois além de cardioprotetores, os tratamentos não comprometeram a eficácia do quimioterápico frente às células tumorais. Na literatura acerca de diferentes agentes usados como cardioprotetores contra a ação da doxo (Chuah et al., 2007, Balestrieri et al., 2008, Chacko et al., 2010), nem sempre se avalia a interferência desses agentes no mecanismo de ação anti-tumoral da doxo, diferentemente do reportado. Porém, os

mecanismos pelos quais os extratos de planta protegeram os cardiomiócitos e não as células de tumor de mama não foram investigados na presente pesquisa.

A eficácia dos extratos nos cultivos de cardiomiócitos comprova os já reportados efeitos cardioprotetores de flavonóides extraídos de outras fontes naturais (Sato et al., 2001; Chuah et al. 2007; Balestrieri et al., 2008). Em um estudo onde avaliaram isoladamente a epigallocatequina, foi demonstrado significativo efeito cardioprotetor contra a doxo (Li et al., 2010). De maneira semelhante, o extrato de *C. sinensis* aqui utilizado apresenta elevada concentração deste flavonóide (superior a 45%), podendo ser este um dos principais responsáveis pela manutenção da

viabilidade dos cardiomiócitos quando incubados com a doxo. O extrato de *C. sinensis*, devido ao seu alto teor de catequinas e distribuição geográfica mundial, é amplamente utilizado no tratamento ou prevenção de diversas afecções como infarto do miocárdio (Hsieh et al., 2009), obesidade (Basu et al., 2010), glaucoma (Chu et al., 2010), diabetes (Qin et al., 2010) e doença de Alzheimer (Smith et al., 2010). Diferentemente, encontram-se menos relatos sobre o uso terapêutico da *A. chica* talvez, em parte, por apresentar certa limitação geográfica, se comparada à *C. sinensis*. Contudo, a terapia com extratos da *A. chica* vem sendo mais pesquisada, inclusive pelo presente grupo de pesquisa (Ribeiro et al., 2012).

O extrato comercial de *C. sinensis* utilizado apresentava conhecido teor de polifenóis (mínimo de 80%). Os compostos fenólicos podem ser classificados em flavonóides e não flavonóides. Do grupo dos flavonóides fazem parte os flavonóis (catequina, camferol) e antocianinas. No extrato utilizado, a concentração de catequinas totais era elevada (superior a 80%), o que pode justificar a eficiência do extrato em manter viáveis os cardiomiócitos incubados com a doxo. Embora não tenham sido feitas análises quantitativas do extrato de *A. chica*, sabe-se que a extração das folhas em etanol 70% resulta em alto teor de flavonóides (Pinto, 2004 citado por Barbosa et al., 2008).

De acordo com a análise realizada no extrato de *A. chica*, observou-se um pico que provavelmente se refere à massa do canferol mais um próton (H^+) $[M + H]^+$. Para confirmar a atribuição desse pico ao canferol, tem-se como perspectiva realizar fragmentações desse íon e dos demais, pela técnica de massa/massa (EM/EM). Essa técnica permite fazer fragmentações desses íons e, a partir dessas fragmentações características, é possível confirmar a

presença do canferol bem como de outros metabólitos já descritos na literatura que possivelmente estejam presentes no extrato. Em estudo onde avaliaram isoladamente o flavonóide canferol em modelo *in vitro* com cultura de cardiomiócitos de ratos, foi demonstrado significativo efeito protetor contra a doxo (Psotova et al., 2010). Dessa forma, uma provável explicação para o efeito cardioprotetor do extrato de *A. chica* seja a presença do canferol.

Devido ao maior conhecimento sobre a *C. sinensis* foi feita pesquisa da *A. chica*, alternativamente, confrontando os resultados obtidos de ambas as plantas. Apesar de *C. sinensis* ter apresentado resultados estatisticamente superiores à *A. chica*, esta se mostrou significativamente eficaz, sinalizando seu uso terapêutico como agente cardioprotetor e estimulando outras pesquisas para avaliar seu potencial em modelos experimentais *in vivo*. Até o presente momento, não foram encontrados na literatura estudos sobre o uso de extrato rico em flavonóide de *A. chica*, com finalidade cardioprotetora. E, considerando-se os resultados preliminares obtidos nesta pesquisa, seu uso se mostrou promissor.

Deve-se ressaltar a importância da avaliação correta das doses a serem utilizadas com finalidade terapêutica. As plantas podem apresentar substâncias potencialmente perigosas à saúde e por esta razão devem ser utilizadas com cautela, respeitando seus riscos toxicológicos (Ferro, 2006). A toxicidade de plantas medicinais é um sério problema de saúde pública. Os efeitos adversos dos fitomedicamentos, interação com outras drogas e a toxicidade ocorrem comumente. A associação de estudos fitoquímicos e farmacológicos torna-se cada vez mais importante para a definição dos potenciais terapêuticos e tóxicos de extratos vegetais (Ferro, 2006). Diferentemente do efeito benéfico protetor atribuído aos extratos,

quando utilizados nas doses de 12,5; 25 e 50 µg/ml detectou-se ação deletéria dos mesmos em doses elevadas, de 100 e 200 µg/ml. Por esse motivo, essas duas concentrações mais elevadas não foram consideradas nos estudos.

É sabido que as catequinas do chá verde sofrem biotransformação havendo alterações na sua biodisponibilidade e distribuição no organismo (Lambert et al., 2007) o que ressalta a importância de se proceder com os estudos em modelos *in vivo*. Por esse motivo, a fim de avaliar se os efeitos cardioprotetores reportados por *C. sinensis in vitro* se comprovam *in vivo*, foram realizados ensaios utilizando o rato (*R. norvegicus albinus*) como modelo experimental.

Outro importante resultado obtido nos ensaios *in vitro* foi a constatação de que as células de tumor de mama apresentaram maior viabilidade que as CTM, quando incubadas com a doxo. Esse resultado indica toxicidade significativamente maior para CTM que para células de tumor de mama, que são o alvo da ação da doxo. Por esse motivo, antes de se pensar em terapia celular com transplante autólogo de CTM para o reparo de lesão cardíaca tóxica decorrente da doxo, é preciso investigar a biologia das CTM de indivíduos submetidos à quimioterapia com tal medicamento. Uma vez comprovada estarem biologicamente estáveis e normais, o transplante autólogo de CTM pode ser indicado. Por outro lado, caso haja algum prejuízo biológico e/ou funcional dessas células, o transplante autólogo deixa de ser opção nesses pacientes que receberam doxo. Tais hipóteses científicas levaram à execução dos ensaios *ex vivo* reportados nesta pesquisa.

Com relação ao experimento *in vivo*, a toxicidade da doxo foi constatada não somente no sistema cardiovascular, mas

sistemicamente, comprovada pelas mais diversas alterações reportadas nos ratos que receberam o quimioterápico. Uma vez que as condições ambientais foram as mesmas em todos os grupos e que no controle e CS não houve óbitos, os animais ganharam peso e apresentavam aparência saudável, pode-se inferir que os efeitos adversos apresentados pelos animais foram causados pela doxo. Estudos utilizando o mesmo modelo experimental também relataram ocorrência de óbitos entre os animais que receberam doxo (Xiang et al., 2009; Kenk et al., 2010).

A perda de peso com o uso da doxo é demonstrada por outros pesquisadores (Karagoz et al., 2008; Chandran et al., 2009; Hazari et al., 2009; Xiang et al., 2009; Kenk et al., 2010) sendo um achado recorrente quando se faz uso do quimioterápico associado ou não a algum tratamento. De modo semelhante ao observado nesta pesquisa, animais que não receberam doxo ganharam peso ao longo do período experimental e aqueles que receberam doxo, sozinha ou em associação com algum tratamento, tiveram perda significativa de peso. Mesmo associada aos tratamentos com CTM e extrato de *C. sinensis*, a doxo foi capaz de promover perda de peso, indicando certo efeito tóxico, mesmo havendo preservação na função cardíaca nesses dois grupos. Tal fato deve ser considerado na prática clínica durante o monitoramento de pacientes em uso da doxo, pois além de cuidados na preservação da função cardíaca, o paciente deve ser constantemente monitorado, buscando-se qualidade de vida e condição clínica geral satisfatória. Somado ao efeito tóxico da doxo, deve-se ter em mente que o paciente em uso desse medicamento é oncopata e a perda de peso é sinal frequente na síndrome paraneoplásica podendo agravar ainda mais o quadro clínico.

Na presente pesquisa, deve-se salientar que os ratos que receberam doxo apresentaram queda no consumo de ração. Diariamente, pela manhã, avaliava-se a necessidade de fornecer ração e água aos animais. Notava-se que nas gaiolas dos animais dos grupos tratados com doxo sempre havia muita ração sobrando, ao contrário das demais gaiolas (grupos controle e CS), onde era necessário repor a quantidade de alimento. Assim, tornou-se evidente o fato de que esses animais apresentaram queda no consumo, apesar de não ter sido feita a pesagem da ração para avaliação quantitativa do consumo. Os animais que receberam doxo e foram tratados com extrato de planta, contudo, apresentaram perda de peso ainda mais significativa que aqueles que receberam doxo sozinha ou os que foram tratados com CTM. Além disso, os animais que receberam extrato de planta (grupo CS) ganharam menos peso que o controle. Talvez a perda de peso (Doxo+CS) e o menor ganho de peso (CS) desses animais possa ser devido à elevação do metabolismo basal ou incremento no débito urinário decorrentes do uso do chá verde (Basu et al., 2010) apesar de nenhum desses mecanismos terem sido estudados.

Ainda com relação à toxicidade sistêmica, os animais que receberam doxo apresentaram anemia e linfopenia, semelhante a outros relatos na literatura (Hou et al., 2009). Alguns dos animais submetidos à doxo apresentaram também diminuição das proteínas totais com queda da fração gama-globulina, que é composta pelas imunoglobulinas. Sabe-se que diminuição de gama-globulinas ocorre em imunodeficiências de diversas causas (Silva et al., 2008). Dessa forma, atribui-se à toxicidade da doxo a ocorrência desses achados que se complementam linfopenia e gamaglobulinemia.

O perfil eletroforético pode sugerir a ocorrência de processos inflamatórios

agudos e crônicos, disfunções hepáticas, perdas proteicas, síndromes nefróticas e alterações das globulinas que ajudam o entendimento da resposta imunológica (Kaneco et al., 2008). A gama-globulina é uma fração composta por imunoglobulinas, IgA, IgG, IgM, IgE e IgD, porém algumas delas (IgM e IgA) podem se estender para a região de β -globulinas, especialmente quando na resposta imunológica há predomínio de IgM. Essas proteínas são sintetizadas nos tecidos linfóides em resposta a um estímulo antigênico (Kaneco et al., 2008).

Segundo os valores de referência para ratos, mencionados por Kaneco et al. (2008), os valores de glicose, ureia e creatinina de todos os animais estavam normais.

As lesões de miocárdio podem ser identificadas laboratorialmente por meio de dosagens de enzimas de origem muscular, como LDH, CK e principalmente sua isoenzima MB (CK-MB), liberada especificamente pelo músculo cardíaco lesado (Kaneco et al., 2008). Os valores de CK e LDH de todos os grupos estão acima de valores de referência citados por Kaneco et al. (2008). Considerando-se apenas os dados do presente experimento, os animais dos três grupos que receberam doxo, comparados ao controle, apresentaram valores semelhantes de CK e CK-MB, e diminuição de LDH. Esses não eram resultados esperados, uma vez que são reportados aumentos dessas enzimas quando da ocorrência de lesão muscular cardíaca em ensaios avaliando semelhante modelo experimental (Hou et al., 2009). Contudo, sabe-se que elevações de CK e CK-MB são detectadas entre seis e oito horas e 12 horas a 24 horas, respectivamente, após a injúria celular, o que pode justificar o fato de não terem sido encontradas alterações nessas enzimas, uma vez que a coleta de sangue só foi realizada 48 horas após a última doxo, momento da

eutanásia dos animais. Embora tenham sido encontrados resultados conflituosos de bioquímica sérica, a lesão cardíaca decorrente da toxicidade da doxo, bem como a melhora decorrente dos tratamentos com CTM e extrato de *C. sinensis* foram, de fato, comprovadas na presente pesquisa uma vez que foram detectadas por outras técnicas mais específicas, tais como ECG, ecocardiografia em modo-M e *speckle-tracking* e o exame histopatológico.

As alterações microscópicas frequentemente associadas à cardiotoxicidade da doxo são perda de miofibrilas, vacuolização citoplasmática, infiltrado inflamatório e fibrose (Albini et al., 2010). Contudo, relatos de alterações ecocardiográficas, associadas a exames histopatológicos cardíacos normais não são incomuns (Hazari et al., 2009; Oliveira et al., 2013). Porém, em casos graves de intoxicação é de se esperar achados microscópicos como vacuolização citoplasmática e perda de miofibrilas ao exame histopatológico e vacuolização de mitocôndria e danos ao sistema sarcotubular ao exame ultraestrutural por microscopia eletrônica (Xiang et al., 2009). Na presente pesquisa, apenas uma parte do coração era destinada à avaliação histopatológica havendo fragmentos destinados a outros fins, como extração de material genético. Assim sendo, pode-se supor que algumas alterações possam não ter sido observadas.

A cardiopatia decorrente da toxicidade da doxo tende a um comprometimento global da função ventricular, diferentemente do que pode ser observado no infarto do miocárdio onde, na maioria das vezes, só uma área é afetada (Mias et al., 2009). Por esse motivo preferiu-se a administração intravenosa como veículo das CTM, ao invés de aplicação local intramiocárdica como feito por nossa equipe em modelo

experimental de infarto (dados aceitos para publicação).

As alterações eletrocardiográficas observadas nas ondas P, R e S, sugestivas de sobrecarga atrial e ventricular cardíaca, comprovadas pelo ecocardiograma, podem ter sido causadas pelos efeitos cardiotoxícos da doxo, uma vez que foram observadas em animais que receberam o quimioterápico e que apresentaram exames normais antes do início do experimento. Contudo, arritmias cardíacas não foram diagnosticadas no presente estudo, mediante avaliação eletrocardiográfica durante 20 minutos. Hazari et al. (2009), avaliando ratos submetidos a mesma dose de doxo, encontraram arritmias ventriculares, atriais e bloqueios, porém por meio de monitoramento contínuo com equipamento de radiotelemetria, ao longo de todo o período experimental. Da mesma forma, cães tratados com doxo e que apresentaram alterações ecocardiográficas compatíveis com cardiomiopatia dilatada, apresentaram arritmias supraventriculares e ventriculares quando avaliados com Holter durante 24 horas (Pereira Neto et al., 2006). Assim sendo, supõe-se que o período de avaliação eletrocardiográfica explique a diferença entre os resultados encontrados uma vez que as arritmias cardíacas apresentam caráter intermitente, podendo não ser detectadas em avaliações de menor duração. Outro importante fator a ser considerado é que na presente pesquisa os animais foram avaliados sob anestesia, o que pode justificar a ausência de arritmias, ao contrário dos relatos de Pereira Neto et al. (2006) e Hazari et al. (2009) que avaliaram animais acordados.

É sabido que a cardiotoxicidade pela doxo leva a um quadro de cardiomiopatia com diminuição da função ventricular o que pode ser diagnosticado tanto no homem, quanto em pacientes veterinários. Contudo, há resultados conflituosos na literatura de

modelos experimentais de cardiotoxicidade, alguns reportando significativa diminuição da função contrátil do VE, enquanto outros não relatam nenhuma alteração (Karagoz et al., 2008; Xiang et al., 2009; Kenk et al., 2010). Dada a diversidade de resultados, pode-se supor que tais diferenças resultem do tempo decorrido entre o término do uso da doxo e o momento da avaliação dos animais, da via de administração (sendo intravenosa e intraperitoneal as mais reportadas), fracionamento da dose cumulativa (ou seja, o número de injeções e intervalo entre elas) e a pureza do agente utilizado. Esse último parece ter sido o ponto chave entre a presente pesquisa e o experimento piloto, uma vez que a única diferença entre eles foi a procedência do medicamento utilizado. No caso do piloto, utilizou-se medicamento similar, dose cumulativa de 20 mg/kg administrados via I.P., em quatro doses semanais e apenas detectaram-se algumas alterações ecocardiográficas pelo modo *strain* (Oliveira et al., 2013). Na presente pesquisa, onde o medicamento utilizado foi o de referência, foi possível detectar inúmeras alterações, considerando os mais diversos tipos de exames. Diferenças entre resultados também podem ser decorrentes da dose cumulativa total, apesar de que a maioria das pesquisas envolve a utilização de 15 mg/kg ou 20 mg/kg. Além disso, diferentes grupos de pesquisa, usando a mesma dose cumulativa, encontraram resultados bem diversos entre si, sugerindo a interferência de outros fatores além da dose *per si*.

Animais submetidos à dose cumulativa de 15 mg/kg de doxo, avaliados uma e três semanas após término do tratamento, não apresentaram alterações ecocardiográficas, tendo seus parâmetros semelhantes aos do grupo controle (Kenk et al., 2010). Em outra pesquisa, animais também submetidos à dose cumulativa de 15 mg/kg de doxo, avaliados logo após término do tratamento,

apresentaram diminuição significativa apenas nos parâmetros de diâmetro final do VE, débito cardíaco e frequência cardíaca (Xiang et al., 2009). Esses mesmos animais só foram apresentar diferença estatística com relação ao controle, quanto a parâmetros funcionais do VE (F.Ej.) cinco semanas após o término do tratamento com a doxo. Isso pode indicar que a medida de F.Ej. não é indicada para detecção precoce de disfunção ventricular, ou que a disfunção ventricular decorrente da doxo só se dê a longo prazo, à medida que o coração fica exposto ao agente tóxico por maior período de tempo.

Por outro lado, em quadros mais estabelecidos de disfunção ventricular, os parâmetros do modo-M são capazes de detectar alterações. Migrino et al. (2009), que também estudaram a cardiotoxicidade da doxo em ratos, reportaram valores de F. Enc. semelhantes aos encontrados na presente pesquisa, sendo 37,6% no controle (36,9% na presente pesquisa para o mesmo grupo) e 30,2% no grupo doxo (28,8% na presente pesquisa para o mesmo grupo).

A não detecção de disfunção ventricular imediatamente após o término das aplicações de doxo, quando avaliada pelo modo-M, reportada na literatura está em acordo com o observado pelo Laboratório de Toxicologia da UFMG no experimento piloto (Oliveira et al., 2013). Diferentemente de Xiang et al. (2009) e Kenk et al. (2010) que apenas avaliaram os animais com o modo-M, nossa equipe estudou a função ventricular por meio da ecocardiografia de *strain* sendo possível, no mesmo tempo experimental, detectar alterações funcionais precocemente com essa técnica, no experimento piloto.

Kenk et al. (2010) contudo, discutem a possibilidade de se detectar alterações cardiovasculares precoces por meio do estudo de parâmetros neuro-hormonais.

Possibilidades para tal avaliação são a mensuração plasmática de noradrenalina e a avaliação da variabilidade da frequência cardíaca que indica alterações no controle autônomo do coração. Já foi reportado, tanto no homem (Kleiger et al., 2005) quanto no cão (Oliveira et al., 2012) uma diminuição na variabilidade da frequência cardíaca antes da deterioração da função ventricular. Da mesma forma que em outras causas de insuficiência cardíaca, é de se esperar que no caso daquela decorrente da intoxicação por doxo haja o mesmo comportamento, ou seja, alterações neuro-hormonais prévias à disfunção contrátil do VE. Assim sendo, a despeito da avaliação de alterações neuro-hormonais, os achados reportados na literatura, bem como os resultados encontrados por nossa equipe no experimento piloto, podem refletir um quadro precoce de cardiotoxicidade não diagnosticado pela ecocardiografia.

Outro fator a ser considerado na diferença de resultados reportados na literatura quanto à avaliação funcional do VE é a limitação da técnica do modo-M. As medidas funcionais de F.Ej. e F.Enc. consideram apenas um plano de um corte feito no coração. Dessa forma, em casos de lesão localizada ou precoce, a avaliação pode ser conduzida em uma porção do coração que ainda esteja preservada (Sahlen & Winter, 2011). Nesse caso, o resultado seria “falso negativo”, ou seja, constatação de normalidade em um coração já deficiente.

Buscando-se contornar essa importante limitação, foi desenvolvida a ecocardiografia Doppler tecidual, que promove a avaliação global da função cardíaca, não mais apenas segmentada. Essa técnica, contudo, apresenta como grande limitação a dependência da angulação do feixe Doppler com a imagem obtida. Embora o estudo da função cardíaca seja global, os resultados podem ser sub ou

super estimados em função de angulações imprecisas (Sahlen & Winter, 2011).

Nesse contexto, surgiu a ecocardiografia *speckle-tracking* bidimensional, que realiza o estudo global e segmentado da função ventricular e é independente do alinhamento entre o feixe Doppler e a imagem. Tal técnica se baseia no estudo de algoritmos resultantes da deformação, do movimento e do deslocamento realizados pelo tecido cardíaco durante a sístole e a diástole (Motoki et al., 2010).

No experimento piloto (Oliveira et al., 2013) conseguiu-se a detecção da disfunção ventricular somente com a técnica de *speckle-tracking*, sendo que a avaliação com o modo-M mostrou-se normal. Nesse caso, constata-se a limitação da técnica do modo-M, com um diagnóstico “falso negativo”, uma vez que, embora estivesse normal por essa avaliação, a disfunção contrátil existia, tendo sido detectada pelas medidas de *strain*. Por outro lado, na presente pesquisa, foi possível detectar alterações ecocardiográficas no grupo doxo tanto pelo *speckle-tracking*, quanto pelo modo-M, indicando maior grau de comprometimento da função cardíaca.

As medidas de função ventricular, tanto do modo-M quanto do *speckle-tracking*, demonstraram eficácia das terapias com CTM e com flavonóides, uma vez que os resultados dos grupos que receberam esses tratamentos estavam significativamente superiores aos do grupo que só recebeu doxo e ainda mais importante, estavam estatisticamente semelhantes aos do grupo controle. Esses resultados obtidos *in vivo* corroboram e engrandecem os resultados obtidos nos experimentos *in vitro* sobre utilização de extratos ricos em flavonóides obtidos de *C. sinensis*. Além disso, os resultados promissores com o uso das CTM sinalizam a possibilidade de se instituir a

terapia celular para recuperação de injúrias tóxicas do miocárdio.

Considerando-se os grupos doxo+CTM e doxo+CS é possível, ainda, inferir maior efeito cardioprotetor às CTM, considerando-se seus melhores resultados nas avaliações de *strain* longitudinal e de histopatologia.

Apesar de não se conseguir uma diferenciação completa de CTM em cardiomiócitos, como se observa com CTE e iPS, as CTM mostraram-se eficazes na prevenção da cardiotoxicidade, demonstrada pelos resultados ecocardiográficos de preservação da função ventricular. O sucesso da utilização das CTM ganha importância à medida que esse tipo celular é melhor estabelecido e seu uso não acarreta em questões éticas, políticas e religiosas.

É sabido que a lesão cardíaca causada pela doxo envolve a formação de espécies reativas do oxigênio e foi demonstrado que certo grau de estresse oxidativo induz migração de CTM em ensaios *in vitro* podendo ser uma das razões para os resultados encontrados (Li et al., 2009). Dessa forma, as CTM após injeção intravenosa se orientaram para o local da injúria e provavelmente por efeitos parácrinos foram capazes de promover uma melhora no local lesado contribuindo para o restabelecimento de uma adequada função contrátil.

O ensaio de PCR demonstrou a presença das células eGFP injetadas sistemicamente no coração de animais intoxicados com sucesso. Como documentado, mesmo após semanas da injeção das CTM, foi possível demonstrar que estas chegaram ao tecido lesado (coração) e ali permaneceram pelo período de observação. A presença das células-tronco nos tecidos lesados constitui um dos principais e primeiros parâmetros a

serem analisados em pesquisas de terapia celular, e contribui para a confirmação de sua participação nos eventos de melhora clínica, como os observados no presente trabalho. Além disso, a demonstração da presença das CTM no tecido lesado contribui para a discussão e elucidação dos mecanismos pelos quais as células atuam. Uma vez confirmada a presença e permanência das CTM nos órgãos de interesse, a investigação dos mecanismos envolvidos nesta observação clínica se faz pertinente. Este passo, contudo, constitui uma das perspectivas do presente trabalho. Entre os mecanismos já descritos na literatura acerca dos benefícios das CTM na terapia celular, destacam-se: imunomodulação, inibição da apoptose, promoção de vascularização, dentre outros. Alguns destes eventos são considerados parácrinos ou dependentes do contato célula-célula. Apesar de vários desses mecanismos envolvidos com os efeitos benéficos das células-tronco já terem sido elucidados, o estudo da terapia celular em modelos de intoxicação ainda é pouco pesquisado e, portanto, extremamente relevante.

Finalmente, a avaliação da biologia das CTM extraídas de pacientes em uso de doxo alerta para o fato de se repensar o transplante autólogo dessas células. Isso porque foi demonstrado que as CTM extraídas de animais que receberam doxo, embora viáveis e mantendo o padrão de expressão de marcadores de superfície, apresentaram importantes alterações como produção de fosfatase alcalina e diminuída taxa de crescimento. Somado a esses fatores, essas mesmas células, quando induzidas à diferenciação cardiomiogênica apresentaram comprometimento na produção de troponina T cardíaca, e quando indiferenciadas, comprometimento na produção de conexina-43.

Pensando-se na utilização terapêutica para reparo de dano ao miocárdio, não é aconselhável o emprego de células que não apresentem produção adequada de conexina-43, essencial para a adesão célula-célula, nem de troponina T, fundamental para a manutenção estrutural do cardiomiócito.

7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, concluiu-se quanto à cardiotoxicidade pela doxo que:

- extratos ricos em flavonóides obtidos de *A. chica* e *C. sinensis* apresentaram potencial cardioprotetor, sem alterar a atividade antitumoral da doxo em ensaios *in vitro*;

- CTM indiferenciadas e extrato de *C. sinensis* se mostraram eficazes na prevenção da lesão cardíaca tóxica em modelo experimental *in vivo*, uma vez que mantiveram a função ventricular em níveis

semelhantes aos de animais não expostos à doxo;

- as CTM extraídas de ratos em uso de doxo apresentaram alterações biológicas indicando que a doxo apresenta efeito tóxico em CTM, desaconselhando o transplante autólogo das mesmas, como alternativa terapêutica, em indivíduos submetidos à quimioterapia.

8. PERSPECTIVAS

Avaliar os efeitos da utilização de CTE no tratamento da cardiotoxicidade induzida pela doxo, a fim de se verificar se as células pluripotentes, que são capazes de gerar células espontaneamente contráteis, promoverão uma preservação da função ventricular mais eficiente que a observada com o uso de CTM.

Capítulo 2

Atividades desenvolvidas na *UNIVERSITY OF WISCONSIN*

RESUMO

Objetivou-se a diferenciação cardiomiogênica de CTE e a caracterização das células derivadas desse processo a fim de se obter populações celulares ricas em cardiomiócitos para futuras utilizações em ensaios de terapia celular. Primeiro procedeu-se ao treinamento com o cultivo dessas células, identificação morfológica das colônias, aprendizado de cultivos em alimentadores (*feeder*) e sem esses (*feeder free*) e a caracterização fenotípica e padronização da diferenciação cardiogênica, utilizando-se o protocolo que resultasse em maior rendimento de cardiomiócitos espontaneamente contráteis. Em seguida a essa etapa de treinamento, iniciou-se o ensaio experimental. Dados da literatura, que indicam ser o *signal regulatory protein alpha* (SIRPA) um marcador ideal para isolamento de populações de cardiomiócitos derivados de CTE ou células iPS, reportam a existência de uma população (aproximadamente 10%) que não expressa SIRPA. Dessa forma, buscou-se o isolamento e a identificação dessa população celular. Foi utilizada uma linhagem geneticamente modificada da CTE H9. Essa linhagem (cTnT^{eGFP}) contém um construto por meio do qual as células se tornam fluorescentes ao expressarem a proteína troponina T cardíaca (cTnT). Após padronização do protocolo de diferenciação que resultasse em maior quantidade de cardiomiócitos contráteis a partir dessas células transgênicas, procedeu-se à citometria de fluxo para isolamento da população que não expressasse SIRPA. Os resultados encontrados não se assemelharam aos reportados na literatura, havendo maior quantidade de cardiomiócitos negativos para expressão de SIRPA, indicando a necessidade de se repensar nessa proteína como marcador específico a ser empregado para obtenção de população rica em cardiomiócitos, após diferenciação de CTE ou iPS.

Palavras-chave: célula-tronco embrionária, diferenciação cardiogênica, SIRPA

ABSTRACT

The aim was to differentiate embryonic stem cells (ESC) into the cardiomyogenic lineage and characterize the cells derived from this process in order to obtain an enriched cell population that is suitable for future cell therapy applications. Firstly it was allowed to learn the basics on culturing human pluripotent stem cells, either embryonic stem cells (ESC) or induced pluripotent stem cell (iPS) lines, either on mouse embryonic fibroblasts (MEF) or on feeder free conditions. Moreover, cells were characterized by morphology and cell surface specific antigens and different cardiac differentiation protocols were performed. Following this training period the experimental protocol was indeed started. Literature reports that signal regulatory protein alpha (SIRPA) is a specific cell surface marker for isolating cardiomyocytes derived from hPSC. However they also identified a population of cardiomyocytes which do not express SIRPA (around 10%). For this reason, we aimed to isolate and identify this population. For this purpose, the H9 cells (hESC cell line) were engineered resulting in the reporter cell line cTnT^{eGFP}. The reporter cell line becomes fluorescent meanwhile expresses cardiac troponin T (cTnT). After standardization of the more suitable cardiac differentiation protocol (high yield), flow cytometric analysis of SIRPA showed a significant cardiomyocyte-cell population which does not express SIRPA. This data suggest that, although SIRPA may be useful for isolating cardiomyocytes derived from hPSC, it is not a specific cell marker.

Keywords: embryonic stem cell, cardiac differentiation, SIRPA

1. INTRODUÇÃO

Conforme salientado por Kamp e outros pesquisadores, em recente revisão (Mummery et al., 2012), as pesquisas com células-tronco não devem se restringir ao estudo delas como possibilidade terapêutica, uma vez que existem muitos desafios, como produção em larga escala de tipos celulares específicos em condições seguras à saúde da população e com custo acessível.

Mais que isso, as pesquisas com células-tronco devem ser utilizadas em várias áreas das ciências, como a toxicologia e farmacologia (realização de testes de eficácia de medicamentos, por exemplo) e a embriologia, com o estudo de enfermidades específicas através do desenvolvimento de modelos experimentais mais precisos.

Deve-se, ainda, buscar o entendimento dos mecanismos que possibilitam a ocorrência da diferenciação *in vitro*, buscando-se protocolos que proporcionem condições seguras de cultivo, tendo-se em mente que tais células serão posteriormente transplantadas para um organismo vivo. Nesse contexto, tem-se o desenvolvimento de pesquisas onde, por exemplo, busca-se o aprimoramento de ferramentas seguras de reprogramação genética de células somáticas para produção de iPS.

No contexto da medicina regenerativa, considerando a necessidade de se ter grandes quantidades do tipo celular de interesse, Kamp (2011) ressalta que as pesquisas têm focado ou o desenvolvimento de protocolos de diferenciação que resultem em alto rendimento de células especializadas, ou a bioengenharia com a produção de linhagens celulares capazes de sinalizar a diferenciação em tempo real.

É dentro dessa perspectiva que foram realizadas as atividades do Programa de Doutorado no Brasil com Estágio no Exterior (PDEE) promovido pela CAPES.

2. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES

Além do projeto de pesquisa, foram realizadas atividades como participação (ouvinte) nas reuniões semanais do Centro de Pesquisa de Células-Tronco da Universidade de Wisconsin, apresentação de seminários na reunião semanal do grupo de pesquisa e participação (prelecionista) em dois projetos de popularização da produção científica sobre células-tronco, o *Summer Science Camp* e o *Grandparents University*.

Antes de serem iniciadas quaisquer atividades no laboratório, foi realizado treinamento visando aprendizado dos princípios básicos do cultivo de células pluripotentes, tanto as CTE, quanto as iPS, no *WiCell Institute*. Além do cultivo das células indiferenciadas, trabalhou-se com a diferenciação cardiogênica segundo protocolo recentemente desenvolvido pelo próprio grupo de pesquisa (Zhang et al., 2012).

Com relação ao projeto de pesquisa, objetivou-se avaliar a eficácia de cardiomiócitos originados da diferenciação de CTE em preservar a função ventricular de ratos submetidos à intoxicação experimental por doxo. Para tanto, seria necessária a obtenção de grande quantidade de células. Além disso, era de fundamental importância que a população a ser utilizada nos experimentos fosse a mais homogênea possível. Assim, preconizou-se que as células obtidas da diferenciação deveriam ser caracterizadas, a fim de se obter uma população rica em cardiomiócitos.

Com esse propósito escolheu-se a proteína *signal regulatory protein alpha* (SIRPA),

que foi recentemente reportada como um marcador específico para o isolamento de cardiomiócitos derivados de CTE ou células iPS (Dubois et al., 2011), para selecionar as células que seriam utilizadas nos ensaios. Considerando-se, contudo, que a literatura reporta a existência de populações celulares com perfil Nkx_2,5(-)/SIRPA(+), ou seja, células que expressam SIRPA mas que não podem ser consideradas cardiomiócitos por não expressarem Nkx_2,5, optou-se por selecionar células que expressassem, além de SIRPA, outra proteína característica de cardiomiócitos adultos.

No caso do Laboratório, foi produzida uma linhagem celular geneticamente modificada (dados ainda não publicados), a partir da embrionária H9, que contém um gene *reporter* que permite às células a emissão de fluorescência (expressão de GFP em intensidade passível de nítida visualização por microscopia convencional) ao expressarem a proteína troponina T cardíaca (cTnT). Vantagens dessa linhagem (cTnT^{eGFP}) é que se consegue traçar, em tempo real, a diferenciação cardiogênica e que se podem selecionar células vivas, uma vez que a detecção da expressão de cTnT se dá por meio da presença de fluorescência, não havendo a necessidade de se fixar a célula para marcação com anticorpos para realização de citometria de fluxo. Dessa forma, ao se obterem células espontaneamente contráteis em cultura bastaria selecionar aquelas duplamente positivas SIRPA(+)/cTnT(+) em *sorting* e utilizá-las nos ensaios experimentais com animais. Para tanto, haveria a necessidade de se padronizar a diferenciação dessa linhagem celular, uma vez que quando ela foi originada o Laboratório realizava o protocolo de diferenciação por corpo embriode.

Atualmente, dado o desenvolvimento de novos protocolos de diferenciação, inclusive por parte da própria equipe (Lian

et al., 2012; Zhang et al., 2012), com alto rendimento de cardiomiócitos e sem o emprego de SFB, era de interesse do Laboratório que fosse feita a padronização da diferenciação cardiogênica dessa linhagem, utilizando-se um desses métodos e não mais o de corpo embriode que utiliza SFB e apresenta baixo rendimento de cardiomiócitos.

Assim, foi proposto o projeto de pesquisa no qual seriam feitos (1) a diferenciação cardiogênica de uma linhagem celular específica e (2) posterior isolamento e caracterização dos cardiomiócitos, para então, (3) proceder-se à utilização desses em modelo *in vivo* de cardiotoxicidade induzida por doxo. Contudo, o período do estágio de doutorado chegou ao fim antes de se ter conseguido o isolamento de uma população homogênea de cardiomiócitos. Dessa forma, uma vez que o projeto ainda se encontra em fase de execução e nenhum resultado foi publicado, não serão fornecidas informações detalhadas sobre a metodologia, nem resultados paralelos e complementares obtidos por outros pesquisadores. Serão abordados apenas os aspectos referentes às proposições 1 e 2 anteriormente citadas neste mesmo parágrafo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultivo celular

Foram utilizadas CTE geneticamente modificadas, produzidas pela própria equipe de pesquisa (dados não publicados) e que se encontravam congeladas em nitrogênio líquido. Essas células (cTnT^{eGFP}) foram geradas a partir da linhagem H9 (*WiCell Institute*), utilizando-se metodologia com lentivírus. As células cTnT^{eGFP} contêm um construto que as tornam fluorescentes ao expressarem a troponina T cardíaca (cTnT). Para confirmação da inserção do gene humano

da cTnT procedeu-se à realização de PCR do DNA genômico nessas células.

Após descongelamento, as células cTnT^{eGFP} foram plaqueadas em placas de seis poços previamente tratadas com 8,7 µg/cm² de Matrigel® (GFR, BD, Biosciences) e utilizou-se 1µM de inibidor Rock (Y-27632, CalBiochem). As células eram mantidas em meio mTeSR-1® (WiCell Institute) o qual era trocado diariamente. A passagem das células era feita com Versene® (Invitrogen), 1 ml/poço da placa de seis, a cada cinco dias na razão 1:18.

3.2 Caracterização celular

As células cTnT^{eGFP} indiferenciadas foram caracterizadas por imunofluorescência para a expressão de Oct-4 e Nanog. Os anticorpos utilizados foram monoclonal anti-Oct-4 (diluição 1:100, Santa Cruz Biotechnology), policlonal anti-Nanog (diluição 1:100, Cosmo Bio Co Ltda). Os anticorpos secundários foram Alexa Fluor 488 ou 594 (diluição 1:1000, Invitrogen). Os núcleos foram corados com DAPI (diluição 1:1000, Invitrogen).

Resumidamente, as células foram fixadas em paraformaldeído 4% durante 15 min em temperatura ambiente, lavadas com PBS e permeabilizadas em solução 0,1% de Triton X-100 durante 60 min em temperatura ambiente. O bloqueio foi feito com solução de leite desnatado (5%) em 0,2% Triton X-100, durante 2 horas a temperatura ambiente em agitador. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS, incubadas com os anticorpos sendo feitas lavagens com PBS e solução 0,2% de Tween 20 em PBS após cada anticorpo.

3.3 Padronização da diferenciação cardiogênica

Foram testados três diferentes protocolos, sendo dois já publicados (Lian et al., 2012;

Zhang et al., 2012) e um terceiro que se encontra em fase final de desenvolvimento por laboratórios vinculados ao grupo de pesquisa.

3.4 Detecção de fluorescência

Desde o início do protocolo de diferenciação, procedeu-se ao acompanhamento diário da cultura celular por microscopia, tanto em microscópio invertido, quanto em microscópio de fluorescência. O intuito era detectar a fluorescência quando fossem observados cardiomiócitos contráteis, ou seja, a partir da obtenção de células que produzissem a proteína cTnT e, conseqüentemente, expressassem fluorescência.

3.5 Citometria de fluxo

Após 20 dias de indução à diferenciação cardiogênica, as células foram submetidas à citometria de fluxo para avaliação das expressões GFP e SIRPA. Para tanto, utilizou-se o anticorpo PE/Cy7 anti-human CD 172a (SIRPα) (BioLegend®, clone SE5A5, # catálogo 323808) e seu respectivo controle, o PE/Cy7 Isotype Ctrl (BioLegend®, clone MOPC-21, # catálogo 400126).

Resumidamente, as células foram isoladas utilizando-se solução de tripsina/EDTA e soro de galinha (2%) por seis minutos. As células foram lavadas com PBS e incubadas, no escuro, com o anticorpo durante 30 minutos, no gelo. Posteriormente, foram lavadas com uma solução tampão (0,5% BSA; 0,1% NaN₃ em PBS sem Ca/Mg⁺⁺), permanecendo nessa solução para a análise no citômetro.

Previamente aos ensaios com cardiomiócitos, testou-se o anticorpo na concentração empregada por Dubois et al. (2011) (5µl anticorpo/10⁶ células), utilizando-se células sanguíneas

(granulócitos) que são consideradas positivas para a expressão da proteína SIRPA.

Em seguida, foram feitos os ensaios com cardiomiócitos, primeiramente empregando-se a mesma concentração (5µl anticorpo/10⁶ células). Uma vez que os resultados encontrados não foram satisfatórios como aqueles obtidos com o uso de granulócitos (para detalhes, consultar o item 7 “Resultados”), procedeu-se à investigação de uma concentração mais adequada,

testando-se, para tanto, 5µl, 10µl, 15µl e 20µl de anticorpo para 1x10⁶ células.

4. RESULTADOS

As células cTnT^{eGFP} indiferenciadas, como esperado para células pluripotentes, mantiveram a expressão de Oct-4 e Nanog, mesmo tendo sido modificadas geneticamente, conforme representado na Figura 24.

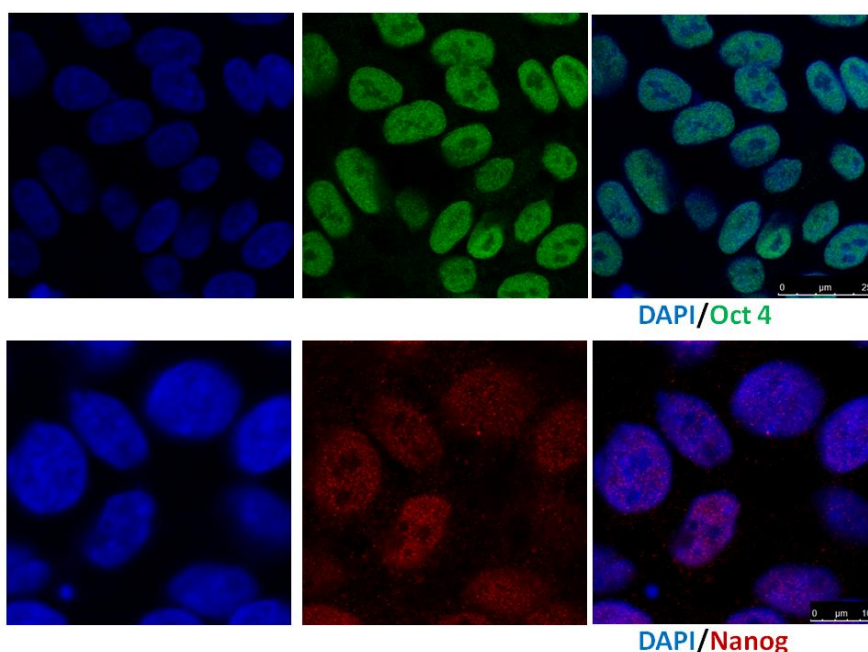


Figura 24: Marcação para Oct-4 (painel superior, coloração verde) e Nanog (painel inferior, coloração vermelha) em células-tronco embrionárias geneticamente modificadas (linhagem cTnT^{eGFP}), indicando manutenção do padrão para esse tipo celular. A coloração em azul marca os núcleos celulares. Imagens obtidas em microscópio confocal.

O protocolo de diferenciação mais eficiente para as células cTnT^{eGFP} foi aquele ainda não publicado, mas que se assemelha a um dos métodos propostos por Lian et al. (2012). Li et al. (2012) propuseram dois métodos, o de pequenas moléculas e o que emprega uma associação de activina A, BMP4 e BIO. Esse último, com pequenas modificações, foi o que apresentou êxito para as células cTnT^{eGFP}.

Entre os dias 10 e 13 foram observadas as primeiras células com contração espontânea. As células eram diariamente monitoradas ao microscópio e a fluorescência detectada era coincidente com as áreas onde havia células com contração espontânea (Figura 25).

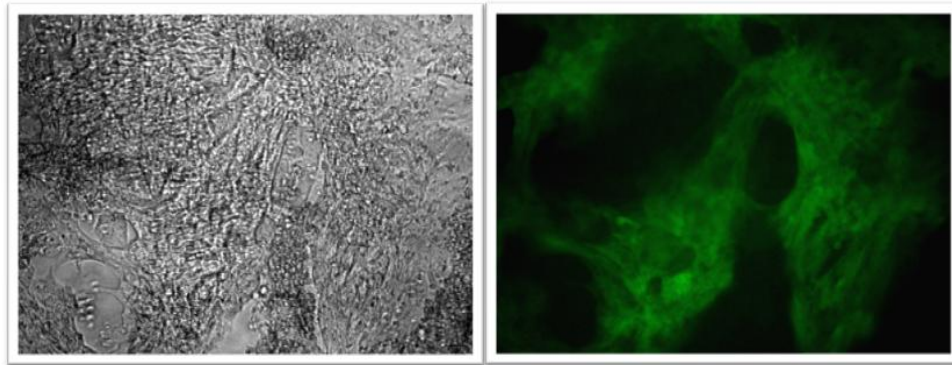


Figura 25: Células-tronco embrionárias geneticamente modificadas (linhagem $cTnT^{eGFP}$) após 15 dias de indução à diferenciação cardiogênica. A linhagem estudada se torna fluorescente ao expressar troponina T cardíaca. Observação de um mesmo campo, em visualização de campo claro por microscópio invertido (à esquerda) e por microscópio de fluorescência (à direita). Imagens obtidas em aumento de 20x.

Quanto aos resultados da citometria de fluxo, o anticorpo anti-SIRPA se mostrou eficaz no isolamento da população de granulócitos (Figura 26). Contudo, ao contrário da clara separação da população celular obtida para as células sanguíneas,

não se conseguiu separação semelhante na avaliação dos cardiomiócitos (Figura 27).

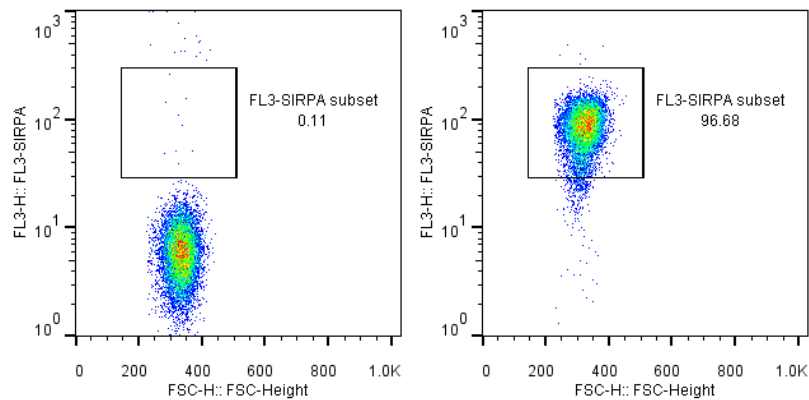


Figura 26: Resultados de citometria de fluxo realizados em células sanguíneas (granulócitos) para avaliação da expressão de SIRPA. Gráfico à esquerda mostra resultado obtido para o controle (anticorpo isotipo, $5\mu\text{l}$ anticorpo/ 10^6 células) e à direita, para SIRPA (anticorpo anti-SIRPA, $5\mu\text{l}$ anticorpo/ 10^6 células).

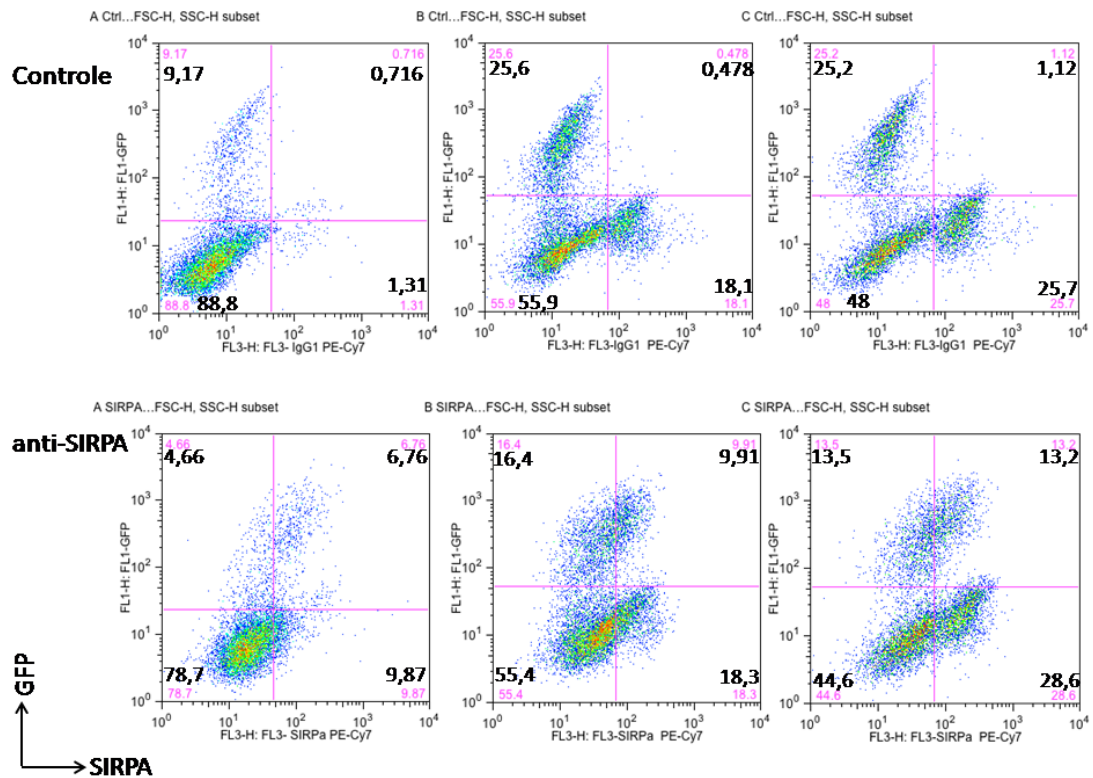


Figura 27: Resultados de três experimentos de citometria de fluxo realizados em células-tronco embrionárias geneticamente modificadas (linhagem $cTnT^{eGFP}$) após 20 dias de diferenciação para avaliação da expressão de SIRPA. Acima, no painel, os resultados para o controle (anticorpo isotipo, $5\mu\text{l}$ anticorpo/ 10^6 células) e abaixo, para o SIRPA (anticorpo anti-SIRPA, $5\mu\text{l}$ anticorpo/ 10^6 células).

Devido a esse resultado, procedeu-se ao estudo da marcação celular com SIRPA em cardiomiócitos, testando-se diferentes

concentrações do anticorpo, percebendo-se que a mais adequada foi a de $15\mu\text{l}$ para 10^6 células (Figura 28).

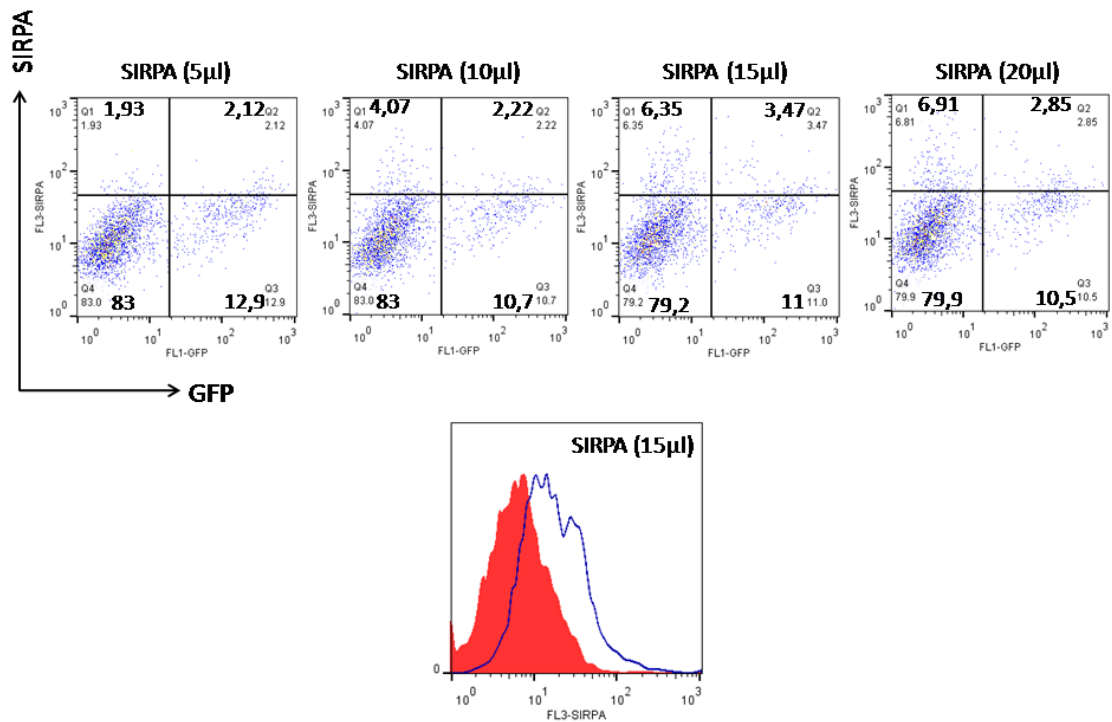


Figura 28: Resultados de citometria de fluxo em células-tronco embrionárias geneticamente modificadas (linhagem $cTnT^{cGFP}$) após 20 dias de diferenciação para avaliação de diferentes concentrações do anticorpo anti-SIRPA.

Foram feitos, então, três novos ensaios independentes, utilizando-se 15µl do anticorpo. Novamente os resultados mostraram inadequada separação entre as populações celulares e foram encontrados, em média, 11,6% de cardiomiócitos que expressam SIRPA (GFP+/SIRPA+), 23,5% de outras células que expressam SIRPA (GFP-/SIRPA+) e 15% de cardiomiócitos que não expressam SIRPA (GFP+/SIRPA-)

(Figura 29). Esses resultados não são semelhantes aos reportados por Dubois et al. (2011). Esses autores utilizaram o Nkx-2,5 para marcação dos cardiomiócitos e detectaram, aos 20 dias de diferenciação, média de 43% de cardiomiócitos que expressam SIRPA e 10% de cardiomiócitos que não expressam SIRPA.

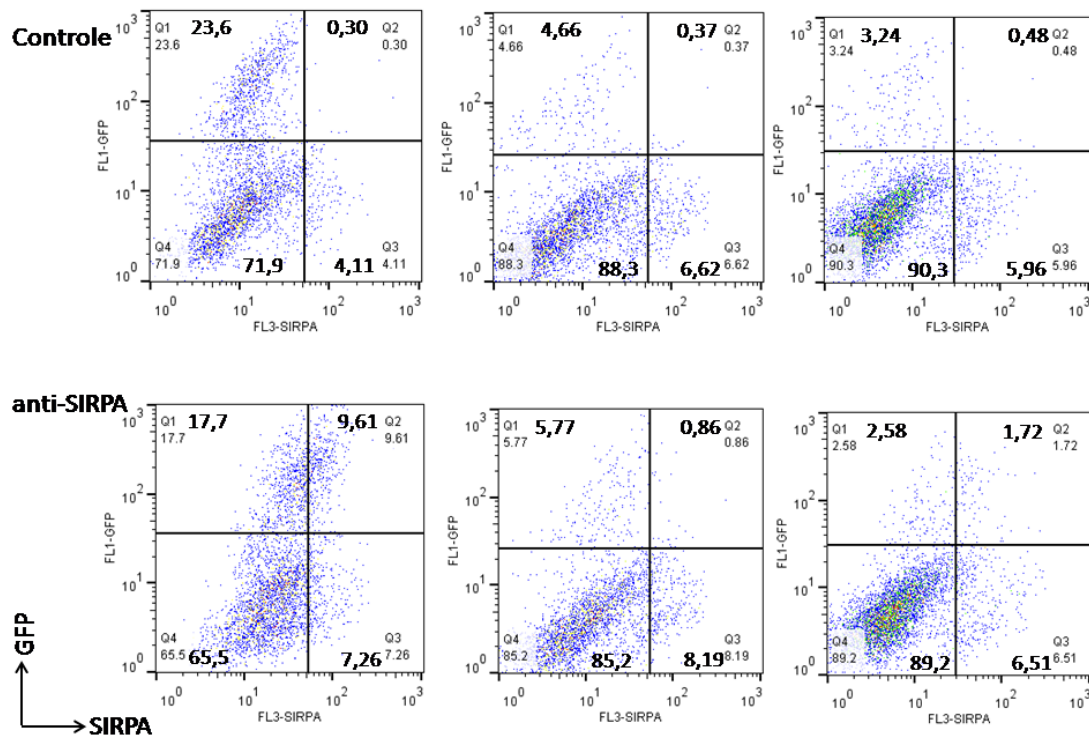


Figura 29: Resultados de três experimentos de citometria de fluxo realizados em células-tronco embrionárias geneticamente modificadas (linhagem cTnT^{ecGFP}) após 20 dias de diferenciação para avaliação da expressão de SIRPA. Acima, no painel, os resultados para o controle (anticorpo isotipo, 5 μ l anticorpo/10⁶ células) e abaixo, para o SIRPA (anticorpo anti-SIRPA, 15 μ l anticorpo/10⁶ células).

A não concordância entre os resultados pode ser justificada pelas diferenças de linhagem celular utilizada, escolha do método de diferenciação e o marcador usado para identificação dos cardiomiócitos. Os dados publicados foram obtidos de células diferenciadas a partir de corpos embriões e selecionadas com base na expressão de Nkx-2,5 que é um marcador precoce da diferenciação cardiogênica, ao contrário da cTnT que é expressa mais tardiamente.

5. CONSIDERAÇÕES

Devido ao término do período de estágio de doutorado, o experimento foi interrompido. Contudo, a equipe de pesquisa tem dado andamento aos estudos, especialmente no

que se refere à padronização da citometria de fluxo para obtenção de uma população celular homogênea e rica em cardiomiócitos.

A proposta após se conseguir clara distinção entre as populações é de se ter conhecimento das características dessas células contráteis (GFP+/SIRPA+; GFP+/SIRPA-) que são originadas da diferenciação cardiogênica de células pluripotentes, antes de serem utilizadas em estudos com fins terapêuticos. Para tanto, um dos ensaios que será realizado envolve o rastreamento dos genes expressos por essas células, por meio de PCR de células isoladas, conforme técnica descrita por Citi et al. (2012).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBINI, A.; PENNESI, G.; DONATELLI, F. et al. Cardiotoxicity of Anticancer Drugs : The Need for Cardio-Oncology and Cardio-Oncological Prevention. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 102, p. 14-25, 2010.

ARIES, A.; PARADIS, P.; LEFEBVRE, C. et al. Essential role of GATA-4 in cell survival and drug-induced cardiotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 101, n. 18, p. 6975-6980, 2004.

BAILO, M.; SONCINI, M.; VERTUA, E. et al. Engraftment Potential of Human Amnion and Chorion Cells Derived from Term Placenta. *Transplantation*, v. 78, n. 10, p. 1439-1448, nov. 2004.

BALESTRIERI, M. L.; FIORITO, C.; CRIMI, E. et al. Effect of red wine antioxidants and minor polyphenolic constituents on endothelial progenitor cells after physical training in mice. *International journal of cardiology*, v. 126, n. 2, p. 295-297, 23 maio. 2008.

BARBOSA, W. L. R.; PINTO, L. N.; QUIGNARD, E. et al. Arrabidaea chica (HBK) Verlot: phytochemical approach, antifungal and trypanocidal activities. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 18, n. 4, p. 544-548, 2008.

BARRETO FILHO, J. B.; OLIVEIRA, M. S. Placental Structure and Biological Aspects of Fetal Membranes Cultured in vitro. In: CECCHERINI-NELLI, L.; MATTEOLI, B. (Eds.). *Biomedical Tissue Culture*. [S.l.] In Tech, 2012. p. 115-132.

BASU, A.; SANCHEZ, K.; LEYVA, M.J. et al. Green tea supplementation affects body weight, lipids, and lipid peroxidation in obese subjects with metabolic syndrome.

Journal of the American College of Nutrition, v. 29, n. 1, p. 31-40, 2010.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews*, v. 56, p. 317-333, 1998.

BUTANY, J.; AHN, E.; LUK, A. Drug-related cardiac pathology. *Journal of clinical pathology*, n. 62, p. 1074-1084, 2009.

CHACKO, S. M.; AGGARWAL, D.; MIGRINO, R. Q. et al. Beneficial effects of green tea: a literature review. *Chinese medicine*, v. 5, p. 1-9, jan. 2010.

CHANDRAN, K.; AGGARWAL, D.; MIGRINO, R. Q. et al. Doxorubicin Inactivates Myocardial Cytochrome c Oxidase in Rats : Cardioprotection by Mito-Q. *Biophysical Journal*, v. 96, p. 1388-1398, 2009.

CHEN, B.; ZHONG, L.; ROUSH, S. F. et al. Disruption of a GATA4/Ankrd1 signaling axis in cardiomyocytes leads to sarcomere disarray: implications for anthracycline cardiomyopathy. *PLoS one*, v. 7, n. 4, p. e35743, jan. 2012.

CHEN, Y.; LIU, W.; LI, W. et al. Autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation improves left ventricular function in a rabbit model of dilated cardiomyopathy. *Experimental and molecular pathology*, v. 88, n. 2, p. 311-315, abr. 2010.

CHU, K. O.; CHAN, K. P.; WANG, C. C. et al. Green Tea Catechins and Their Oxidative Protection in the Rat Eye. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, p. 1523-1534, 2010.

CHUAH, S. C.; MOORE, P. K.; ZHU, Y. Z. S-allylcysteine mediates cardioprotection

- in an acute myocardial infarction rat model via a hydrogen sulfide-mediated pathway. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, v. 293, n. 5, p. H2693-701, nov. 2007.
- CITRI, A.; PANG, Z. P.; SUDHOF, T. C. et al. Comprehensive qPCR profiling of gene expression in single neuronal cells. *Nature protocols*, v. 7, n. 5, p. 829-838, 2011.
- DAVIES, K. J. A.; DOROSHOW, J. H. Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. *The Journal of biological chemistry*, v. 261, p. 3060-3067, 1986.
- DE ANGELIS, A.; PIEGARI, E.; CAPPETTA, D. et al. Anthracycline Cardiomyopathy Is Mediated by Depletion of the Cardiac Stem Cell Pool and Is Rescued by Restoration of Progenitor Cell Function. *Circulation*, v. 121, n. 2, p. 276-292, 2010.
- DE COPPI, P.; BARTSCH, G.; SIDDIQUI, M. M. et al. Isolation of Amniotic Stem Cell Lines with Potential for Therapy. *Nature biotechnology*, v. 25, p. 100-106, 2007.
- DEREGIS, C. J.; MOORE, A. S.; RAND, W. M. et al. Cisplatin and Doxorubicin Toxicosis in Dogs with Osteosarcoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 17, p. 668-673, 2003.
- DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, v. 8, n. 4, p. 315-7, jan. 2006.
- DUBOIS, N. C.; CRAFT, A. M.; SHARMA, P. et al. SIRPA is a specific cell-surface marker for isolating cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. *Nature biotechnology*, v. 29, n. 11, p. 1011-8, nov. 2011.
- ELLIOTT, P. Pathogenesis of cardiotoxicity induced by anthracyclines. *Seminars in oncology*, v. 33, n. supl 8, p. S2-S7, 2006.
- EVANS, M. J.; KAUFMAN, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, v. 292, p. 154-156, 1981.
- FERRO, D. *Fitoterapia conceitos clínicos*. São Paulo: Ateneu, 2006.
- FISCHBACH, G. D.; FISCHBACH, R. L. Stem Cells: Science, Policy, and Ethics. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 114, p. 1364-1370, 2004.
- GARBADE, J.; Dhein, S.; Lipinski, C. et al. Bone marrow-derived stem cells attenuate impaired contractility and enhance capillary density in a rabbit model of Doxorubicin-induced failing hearts. *Journal of cardiac surgery*, v. 24, n. 5, p. 591-599, 2009.
- GOPINATH, S.; VANAMALA, S. K.; GONDI, C. S. et al. Human umbilical cord blood derived stem cells repair doxorubicin-induced pathological cardiac hypertrophy in mice. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 395, n. 3, p. 367-372, 7 maio. 2010.
- HAMMOUDI, T. M., RIVET, C. A., KEMP, M. L. et al. Three-Dimensional In Vitro Tri-Culture Platform to Investigate Effects of Crosstalk Between Mesenchymal. *Tissue engineering: Part A*, v. 18, p. 1686-1697, 2012.
- HAZARI, M. S.; HAYKAL-COATES, N.; WINSETT, D. W. et al. Continuous electrocardiogram reveals differences in the

short-term cardiotoxic response of Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats to doxorubicin. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, v. 110, n. 1, p. 224-34, jul. 2009.

HOU, X.-W.; JIANG, Y.; WANG, L.F. et al. Protective role of granulocyte colony-stimulating factor against adriamycin induced cardiac, renal and hepatic toxicities. *Toxicology letters*, v. 187, n. 1, p. 40-4, maio. 2009.

HSIEH, S.; TSAI, D. C.; CHEN, J. Y. et al. Green tea extract protects rats against myocardial infarction associated with left anterior descending coronary artery ligation. *European journal of physiology*, v. 458, p. 631-642, 2009.

IKADA, Y. Challenges in Tissue Engineering. *Journal of The Royal Society Interface*, v. 3, p. 589-601, 2006.

KAMP, T. J. Recognizing heart cells in a crowd. *Nature methods*, v. 8, n. 12, p. 1013-6, dez. 2011.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. *Clinical Biochemistry of domestic animals*. 5. ed. San Diego: Academic Press, 2008. p. 896

KARAGOZ, B.; SULEYMANOGLU, S.; UZUN, G. et al. Hyperbaric oxygen therapy does not potentiate doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, v. 102, n. 3, p. 287-92, mar. 2008.

KENK, M.; THACKERAY, J. T.; THORN, S. L. et al. Alterations of pre- and postsynaptic noradrenergic signaling in a rat model of adriamycin-induced cardiotoxicity. *Journal of Nuclear Cardiology*, v. 17, n. 2, p. 254-263, 2010.

KLEIGER, R. E.; STEIN, P. K.; BIGGER, J. T. Heart rate variability: measurement and clinical utility. *Annals of noninvasive electrocardiology: the official journal of the International Society for Holter and Noninvasive Electrocardiology, Inc*, v. 10, n. 1, p. 88-101, jan. 2005.

KUMAR, S. N.; KONOREV, EUGENE A.; AGGARWAL, D. et al. Analysis of proteome changes in doxorubicin-treated adult rat cardiomyocyte. *Journal of proteomics*, v. 74, n. 5, p. 683-697, 1 maio. 2011.

LAMBERT, J. D.; SANG, S.; YANG, C. S. Biotransformation of Green Tea Polyphenols and the Biological Activities of Those Metabolites. *Molecular pharmaceutics*, v. 4, n. 6, p. 819-825, 2007.

LEITE, J. P.; OLIVEIRA, A.; LOMBARDI, J. et al. Trypanocidal activity of triterpenes from Arrabidaea triplinervia and derivatives. *Biological & pharmaceutical bulletin*, v. 29, n. 11, p. 2307-9, nov. 2006.

LI, S.; DENG, Y.; FENG, J. et al. Oxidative preconditioning promotes bone marrow mesenchymal stem cells migration and prevents apoptosis. *Cell Biology International*, v. 33, p. 411-418, 2009.

LI, W.; NIE, S.; XIE, M. et al. A major Green tea component, (-)-Epigallocatechin-3-gallate, ameliorates doxorubicin-mediated cardiotoxicity in cardiomyocytes of neonatal rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, p. 8977-8982, 2010.

LIAN, X. et al. PNAS Plus: Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, p. 1-10, 29 maio (on line first), 2012.

- MCLAREN, A. Ethical and social considerations of stem cell research. *Nature*, v. 414, p. 129-131, 2001.
- MIAS, C.; LAIREZ, O.; TROUCHE, E. et al. Mesenchymal Stem Cells Promote Matrix Metalloproteinase Secretion by Cardiac Fibroblasts and Reduce Cardiac Ventricular Fibrosis After Myocardial Infarction. *Stem cells*, v. 27, p. 2734-2743, 2009.
- MOORE, A. S.; DERNELL, W. S.; OGILVIE, G. K. et al. Doxorubicin and BAY 12-9566 for the Treatment of Osteosarcoma in Dogs: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 21, p. 783-790, 2007.
- MOTOKI, H.; NAKATANI, S.; ABE, H. et al. Heterogeneous contraction of the left ventricle demonstrated by 2-dimensional strain imaging. *Journal of Echocardiography*, v. 8, p. 33-39, 2010.
- MUMMERY, C. L.; ZHANG, J.; NG, E.S. et al. Differentiation of Human Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells to Cardiomyocytes A Methods Overview. *Circulation Research*, v. 112, p. 344-358, 2012.
- OLIVEIRA, M. S.; MELO, M. B.; CARVALHO, J. L. et al. Doxorubicin Cardiotoxicity and Cardiac Function Improvement After Stem Cell Therapy Diagnosed by Strain Echocardiography. *Journal of Cancer Science and Therapy*, v. 5, n. 2, p. 52-57, 2013.
- OLIVEIRA, M. S.; MUZZI, R. A. L.; ARAÚJO, R. B. et al. Heart rate variability parameters of myxomatous mitral valve disease in dogs with and without heart failure obtained using 24-hour Holter electrocardiography. *The Veterinary record*, v. 170, n. 24, p. 622, 16 jun. 2012.
- OLIVETTI, G.; ABBI, R.; QUAINI, F. et al. Apoptosis in the failing human heart. *The New England journal of medicine*, v. 336, n. 16, p. 1131-1141, 17 abr. 1997.
- OTT, H. C., MATTHIESEN, T.S.; GOH, S.K. et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nature Medicine*, v. 14, n. 2, p. 213-221, 2008.
- PARK, A.; NAGASE, H.; LIU, L. et al. Mechanism of anthracycline-mediated down-regulation of GATA4 in the heart. *Cardiovascular Research*, v. 2, p. 1-8, 2010.
- PEREIRA NETO, G. B.; ANDRADE, J. N. B.; SOUSA, M. G. et al. Holter electrocardiography in dogs showing doxorubicin-induced dilated cardiomyopathy. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 58, n. 6, p. 1037-1042, 2006.
- PESSOA, E. C.; RODRIGUES, J. R. P.; MICHELIN, O. et al. Avaliação da resposta à quimioterapia primária em amostra de mulheres brasileiras com tumores de mama localmente avançados. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 29, n. 1, p. 18-26, 2007.
- PLANAT-BÉNARD, V.; MENARD, C.; ANDRÉ, M. et al. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circulation research*, v. 94, n. 2, p. 223-229, 6 fev. 2004.
- POIZAT, C.; SARTORELLI, V.; CHUNG, G. et al. Proteasome-mediated degradation of the coactivator p300 impairs cardiac transcription. *Molecular and cellular biology*, v. 20, n. 23, p. 8643-8654, dez. 2000.

PSOTOVA, J.; CHLOPCIKOVA, S.; MIKETOVA, P. et al. Chemoprotective effect of plant phenolics against anthracycline-induced toxicity on rat cardiomyocytes. Part III. Apigenin, baicalein, kaempferol, luteolin and quercetin. *Phytotherapy Research*, v. 18, p. 516-521, 2004.

QIN, B.; POLANSKY, M. M.; HARRY, D. et al. Green tea polyphenols improve cardiac muscle mRNA and protein levels of signal pathways related to insulin and lipid metabolism and inflammation in insulinresistant rats. *Molecular Nutrition & Food Research*, v. 54, p. S14-S23, 2010.

RIBEIRO, A. F. C.; TELLES, T. C.; FERRAZ, V. P. et al. Effect of *Arrabidaea chica* extracts on the Ehrlich solid tumor development. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 22, n. 2, p. 364-373, 2012.

RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature protocols*, v. 1, n. 3, p. 1458-61, jan. 2006.

SAHLEN, A.; WINTER, R. How should we measure global and regional left ventricular systolic function? *Journal of Echocardiography*, v. 9, p. 41-50, 2011.

SAMPAIO, I. B. M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 3a. ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2007. p. 264

SATO, M.; BAGCHI, D.; TOSAKI, A. et al. Grape seed proanthocyanidin reduces cardiomyocyte apoptosis by inhibiting ischemia / reperfusion-induced activation of jnk-1 and c-jun. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 31, n. 6, p. 729-737, 2001.

SAWYER, D. B.; ZUPPINGER, C.; MILLER, T. A. et al. Modulation of anthracycline-induced myofibrillar disarray in rat ventricular myocytes by neuregulin-1beta and anti-erbB2: potential mechanism for trastuzumab-induced cardiotoxicity. *Circulation*, v. 105, n. 13, p. 1551-1554, 2002.

SHI, Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Molecular cell*, v. 9, n. 3, p. 459-470, mar. 2002.

SILVA, E. M.; SOUZA, J. N. S.; ROGEZ, H. et al. Antioxidant activities and polyphenol contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chemistry*, v. 101, p. 1012-1018, 2007.

SILVA, R. O. P.; LOPES, A. D. F.; FARIA, R. M. D. Eletroforese de proteínas séricas: interpretação e correlação clínica. Seric proteins electrophoresis: clinical interpretation and. *Revista Médica de Minas Gerais*, v. 18, n. 2, p. 116-122, 2008.

SMITH, A.; GIUNTA, B.; BICKFORD, P. C. et al. Nanolipidic particles improve the bioavailability and alpha-secretase inducing ability of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) for the treatment of Alzheimer's disease. *International journal of pharmaceuticals*, v. 389, n. 1-2, p. 207-12, 15 abr. 2010.

SOBRATTEE, M. A.; NEERGHEEN, V. .; LUXIMON-RAMMA, A. et al. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutation research*, v. 579, p. 200-213, 11 nov. 2005.

SORENMO, K.; SAMLUK, M.; CLIFFORD, C. et al. Clinical and Pharmacokinetic Characteristics of Intracavitary Administration of Pegylated Liposomal Encapsulated Doxorubicin in Dogs with Splenic Hemangiosarcoma.

- Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 21, p. 1347-1354, 2007.
- SOUČEK, P.; KONDROVÁ, E.; HEŘMÁNEK, J. et al. New model system for testing effects of flavonoids on doxorubicin-related formation of hydroxyl radicals. *Anti-Cancer Drugs*, v. 22, n. 2, p. 176-184, fev. 2011.
- SPALLAROSSA, P.; GARIBALDI, S.; ALTIERI, P. et al. Carvedilol prevents doxorubicin-induced free radical release and apoptosis in cardiomyocytes in vitro. *Journal of molecular and cellular cardiology*, v. 37, n. 4, p. 837-46, out. 2004.
- TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, v. 126, n. 4, p. 663-676, ago. 2006.
- TAKEMURA, O. S.; IINUMA, M.; TOSA, H. et al. A flavone from leaves of *arrabidaea chica* f. *cuprea*. *Phytochemistry*, v. 38, n. 5, p. 1299-1300, 1995.
- THOMPSON, J. A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S. S. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, v. 282, p. 1145-1147, 1998.
- TOMA, J. G.; AKHAVAN, M.; FERNANDES, K. J. L. et al. Isolation of Multipotent Adult Stem Cells from the Dermis of Mammalian Skin. *Nature Cell Biology*, v. 3, p. 778-784, 2001.
- URBONAVICIŪTE, A.; JAKSTAS, V.; KORNYSOVA, O. et al. Capillary electrophoretic analysis of flavonoids in single-styled hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) ethanolic extracts. *Journal of chromatography. A*, v. 1112, n. 1-2, p. 339-344, 21 abr. 2006.
- WESTPHAL, F. L.; LIMA, L. C. DE; GUIMARÃES, R. A. et al. Avaliação das alterações pleuropulmonares após a injeção de óleo de resina de copaíba, extrato aquoso de cajú e polivinilpirrolidona iodado (pvpi) na pleura e parênquima pulmonar de ratos. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, v. 34, n. 3, p. 170-176, 2007.
- XIANG, P.; YAN, H.; KAREN, D. et al. Dexrazoxane protects against doxorubicin-induced cardiomyopathy: upregulation of Akt and Erk phosphorylation in a rat model. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, v. 63, p. 343-349, 2009.
- ZHANG, J.; KLOS, M.; WILSON, G. F. et al. Extracellular Matrix Promotes Highly Efficient Cardiac Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells: The Matrix Sandwich Method. *Circulation Research*, 21. ago (on line first), 2012.
- ZORN, B.; GARCIA-PINERES, A.J.; CASTRO, V. et al. 3-Desoxyanthocyanidins from *Arrabidaea chica*. *Phytochemistry*, v. 56, p. 831-835, 2001.
- ZUK, P. A.; ZHU, M.; MIZUNO, H. et al. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. *Tissue Engineering*, v. 7, p. 211-228, 2001.
- ZUK, P. A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P. et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular biology of the cell*, v. 13, n. 12, p. 4279-95, dez. 2002.