

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

**HÁ PROLIFERAÇÃO DE CARDIOMIÓCITOS NO
INFARTO?**

FERNANDO ANTÔNIO NEVES

**RECIFE
2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

**HÁ PROLIFERAÇÃO DE CARDIOMIÓCITOS NO
INFARTO?**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa
De Pós Graduação em Patologia da Universidade
Federal de Pernambuco

Orientador: Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

Coorientador: Prof. Dr. Luciano Montenegro

FERNANDO ANTÔNIO NEVES

**RECIFE
2010**

Neves, Fernando Antônio

Há proliferação de cardiomiócitos no infarto? /

Fernando Antônio Neves. – Recife: O Autor, 2010.

67 folhas: il., fig., graf.; 30 cm

Orientador: Nicodemos Teles de Pontes Filho

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal
de Pernambuco. CCS. Patologia, 2010.

Inclui bibliografia e apêndices.

1. Índice mitótico. 2. Antígeno Ki67. 3.
Infarto do miocárdio. 4. Cardioplastia. 5. Miocárdio. I.
Nicodemos Teles de Pontes Filho. II. Título.

616.123 7

UFPE
CDD (22.ed.) CCS2011-033

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

R E I T O R

Prof. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE- REITOR

Prof. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

D I R E T O R DO CENTRO DE CIÊNCIA DA SAÚDE

Prof. José Thadeu Pinheiro

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

Prof. Adriana Maria da Silva Telles

COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

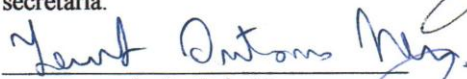
Prof. Hilton Justino da Silva

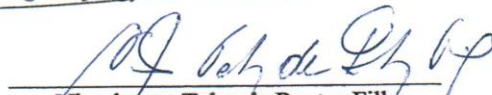
Ata de sessão da 15ª (décima quinta) defesa de dissertação de mestrado de 2010 (dois mil e dez) do Programa de Pós-Graduação em Patologia.

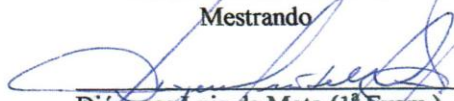
Área de concentração: **PATOLOGIA**

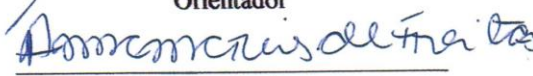
Mestrando: **FERNANDO ANTONIO NEVES**

Às onze horas do dia primeiro de setembro de dois mil e dez, na sala de reunião deste Programa de Pós-Graduação em Patologia, teve lugar a defesa de dissertação do mestrando **Fernando Antonio Neves**, com dissertação intitulada: **"DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE MITÓTICO NO INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO RECENTE"**. O aluno, que já completou todos os créditos da grade curricular deste curso de mestrado, teve como orientador o Dr. Nicodemus Teles de Pontes Filho, Prof. Titular do Depto. de Patologia – CCS/UFPE e Coordenador deste Programa (CPF: 053.307.774-53). Como banca examinadora do trabalho, designada pelo colegiado do curso e aprovada pelas Câmaras de Pesquisa e Pós-Graduação, teve-se a seguinte: **Titulares:** Dra. Maria do Carmo Carvalho de Abreu e Lima, Profa. Associada do Depto. de Patologia – CCS/UFPE (CPF: 295.000.874-72); Dr. Mário Ribeiro de Melo-Júnior, Prof. Adjo. do Depto. de Patologia – CCS/UFPE (CPF: 895.421.504-15) e Dr. Diógenes Luis da Mota, Prof. Adjo. do Depto. de Histologia e Embriologia – CCB/UFPE (CPF: 166.728.874-15). Foram convidados os seguintes professores como **Suplentes:** Dra. Paloma Lys de Medeiros, Profa. Adja. do Depto. de Histologia e Embriologia – CCB/UFPE e Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão, Prof. Adjo. do Depto. de Bioquímica – CCB/UFPE (CPF: 694.660.254-49). O Prof. Dr. Nicodemus Teles de Pontes Filho, abriu a sessão e em seguida convidou a Profa. Dra. Maria do Carmo Carvalho de Abreu e Lima para presidir a banca examinadora. A Professora em pauta convidou o mestrando **Fernando Antônio Neves** para apresentar sua dissertação, informando-o que teria 30 (trinta) minutos para apresentar o seu trabalho e cada examinador teria 15 (quinze) minutos para questionar, tendo o mestrando o mesmo tempo para defender. Após a apresentação do trabalho, foi realizada a arguição por cada um dos seus examinadores com as respectivas respostas pelo mestrando. Para concluir, a comissão examinadora se reuniu sigilosamente e julgou o candidato **"APROVADO"**, devendo o mesmo fazer as devidas correções sugeridas pela banca, em um prazo máximo de 90 (noventa) dias a serem contados a partir da presente data, na edição final da dissertação. Nada mais havendo a tratar foi encerrada a sessão da qual para constar, lavrei a presente ata que depois de lida e aprovada, será assinada por mim e a quem de direito. Recife, 1º de setembro de 2010. Sonia Maria Lopes de Carvalho, secretária.


Fernando Antônio Neves
Mestrando


Nicodemus Teles de Pontes Filho
Orientador

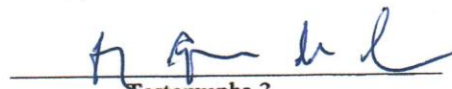

Diógenes Luiz da Mota (1ª Exam.)


Testemunha 1


Mário Ribeiro de Melo-Júnior (2ª Exam.)


Testemunha 2


Maria do Carmo C. de Abreu e Lima (3ª Exam.)


Testemunha 3

Confere com o original
Em 19/09/11


*À Providência Divina que,
apesar das minhas limitações,
tem me ajudado
com os recursos e pessoas necessárias
para que eu chegasse até aqui*

AGRADECIMENTOS

A Dra. Maria do Carmo e ao IMUNOPAT – Laboratório de Imunopatologia, sem a ajuda dos quais, a imunomarcção com Ki-67 e, conseqüentemente esse trabalho não teria sido realizado.

A Sydclay Araújo que me tem ajudado de forma desinteressada, gratuita e contínua, em todas as etapas do trabalho, doando-me o tempo e a atenção necessários, sem medir esforços.

A Jorge Germano da Silva que, desde o início, me ajudou com a coleta do material, utilizando muito de suas poucas horas livres na elaboração deste trabalho.

Aos técnicos do SVO por terem facilitado a coleta do material

A Dra. Sandra, chefe do SVO, que facilitou meu acesso ao SVO e ao fichário, com imensa boa-vontade e empatia

A colega de mestrado Mariana, com quem sempre pude contar para tirar minhas dúvidas e que pacientemente tem me ajudado na formatação da dissertação

Ao colega Thiago, que me auxiliou generosamente na formatação dos slides

A todos os colegas de mestrado que me têm me dado suporte, carinho e atenção nos momentos mais difíceis que passei ao longo do mestrado

A Dr. Hilton Justino por me ajudar pacientemente na formatação desta dissertação

A Dr. Nicodemos pela paciência e gentileza

A Dr. Roberto por ter me auxiliado com o exame das lâminas

A toda equipe do mestrado de patologia com quem tenho aprendido muito ao longo desses dois anos e meio de convivência

A Dr. Diógenes Luis da Mota, que gentilmente aceitou participar da banca

Ao meu pai, Marcos Augusto Wanderley, sem o qual não teria me formado em medicina e, conseqüentemente, terminado esse mestrado.

À minha esposa Annamaria de Freitas Lima e Silva, meu braço direito em tudo, principalmente na ajuda aos trâmites dessa dissertação.

Á Providência Divina que, através das “coincidências sincrônicas” e das pessoas acima citadas facilitou a realização desse mestrado.

*As pessoas que passam em nossas vidas passam sozinhas pois cada pessoa é única e
nenhuma substitui a outra*

*As pessoas que passam em nossas vidas passam sozinhas mas não vão sós, nem nos
deixam sós*

Levam um pouco de nós mesmos, deixam um pouco de si mesmas

Há as que deixam muito, mas não há as que não levam nada

*Essa é a maior responsabilidade de nossas vidas e a certeza absoluta que duas almas
jamais se encontram por acaso*

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO:

No século passado predominava o dogma de que cardiomiócitos eram incapazes de se dividir havendo, no infarto agudo do miocárdio, apenas proliferação de tecido fibroso na área lesada, processo conhecido como remodelação. Estudos feitos a partir de 1998 têm levantado a hipótese de que há proliferação de cardiomiócitos no infarto agudo do miocárdio embora numa taxa reduzida. Nosso trabalho objetiva determinar esse índice de proliferação comparando-o com o desses estudos.

Métodos As amostras da borda de tecido infartado foram obtidos de 22 pacientes no Serviço de Verificação de Óbito (SVO) da Universidade Federal de Pernambuco. As amostras foram coradas com hematoxilina e eosina e classificadas em infarto agudo ou crônico. 22 amostras com infarto foram marcadas com o antígeno nuclear Ki-67, que está associado com a divisão celular. Objetivava-se, então, determinar o índice mitótico (razão do número de núcleos que entraram em mitose para os que não sofreram mitose) comparando-o segundo gênero e faixa etária. Realizou-se também a análise morfométrica da área e perímetro de cardiomiócitos da área enfartada comparando-a com a área normal.

Resultados: Não detectamos evidências de proliferação de cardiomiócitos na amostras coradas com Ki 67. Houve um aumento estatisticamente significativo da área e do perímetro de cardiomiócitos da área infartada em relação à área normal.

Conclusões: A metodologia com hematoxilina-eosina e o marcador Ki 67 não foi suficientemente precisa para a determinação do índice mitótico. Futuros trabalhos com maiores recursos metodológicos talvez venham a reproduzir os índices mitóticos já estudados em outros países.

Descritores: índice mitótico; Antígeno Ki67; infarto do miocárdio; cardiomioplastia; miocárdio

SUMMARY:

In the last century dominated the dogma that cardiomyocytes were unable to divide and there, in acute myocardial infarction, only proliferation of fibrous tissue in the damaged area, a process known as remodeling. Studies since 1998 have raised the hypothesis that there is proliferation of cardiomyocytes in acute myocardial infarction while a reduced rate. Our work aims to determine the proliferation index by comparing it with these studies.

Methods Samples from the edge of infarcted tissue were obtained from 22 patients at Serviço de Verificação de Óbito (SVO) da Universidade Federal de Pernambuco. The samples were stained with hematoxylin and eosin and classified as acute or chronic. 22 samples with infarction were stained with the nuclear antigen Ki-67, which is associated with cell division. Aimed to then determine the mitotic index (ratio of number of nuclei that entered into mitosis for those who did not undergo mitosis) comparing it to gender and age. Was also carried out morphometric analysis of cardiomyocyte area and perimeter of the infarcted area compared with the normal area.

Results: We did not detect evidence of cardiomyocyte proliferation in samples stained with Ki 67. There was a statistically significant increase of area and perimeter of cardiomyocytes of the infarcted area compared to normal area.

Conclusions: The method with hematoxylin-eosin and marker Ki 67 was not sufficiently precise for determining the mitotic index. Future studies with higher methodological resources maybe they will play the mitotic indexes already studied in other countries.

Keywords: mitotic index, Ki67 antigen; myocardial infarction; cardiomyoplasty infarction

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Amostra de tecido com infarto agudo em coração humano (HE, 100X) **39**

FIGURA 2 - Amostra de tecido com infarto crônico em coração humano (HE, 100X)**39**

FIGURA 3 - Amostra de tecido com infarto crônico em coração humano com células marcadas aleatoriamente para determinação da área e perímetro. (HE, 100X) **40**

FIGURA 4 - Área normal de amostra de tecido com infarto crônico em coração humano com células marcadas aleatoriamente para determinação da área e perímetro. (HE, 100X) **40**

FIGURA 5 - Controle com linfonodos com carcinoma metastático (Ki67, 400X) **41**

FIGURA 6 - Cardiomiócitos sem evidência de mitose (Ki 67, 400X) **41**

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Relação entre sexo, idade e tipo de infarto das amostras colhidas e selecionadas em corações humanos adultos 35

TABELA 2 – Relação entre sexo, idade e tipo de infarto das amostras colhidas e selecionadas em corações humanos adultos 36

TABELA 3 - Comparação entre a média da área e do perímetro de áreas infartadas com áreas normais. 38

LISTA DOS GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – Relação entre o sexo masculino e feminino das amostras selecionadas como infarto em coração humanos adultos **36**

GRÁFICO 2 - Relação entre os tipos histológicos de infarto das amostras colhidas em corações humanos adultos **37**

GRÁFICO 3 – Relação entre as faixas-etárias das amostras colhidas em corações humanos adultos **37**

GRÁFICO 4 – Relação entre gênero e faixa etária das amostras colhidas em corações humanos adultos **38**

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
3 MÉTODOS	23
3.1 Área de estudo	23
3.2 População de estudo	23
3.3 delineamento da pesquisa	23
3.4 Seleção da amostra	23
3.5 Definição de variáveis	23
3.6 Método de coleta	23
3.7 Método imunohistoquímico	23
3.8 Análise morfométrica	26
3.8 Análise dos dados	26
3.9 Considerações éticas	26
4 RESULTADOS	27
4.1 ARTIGO ORIGINAL	27
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
6 REFERÊNCIAS	60
APÊNDICE	66

1 APRESENTAÇÃO

1.1 Caracterização do problema

Segundo dados do Ministério da Saúde, as doenças cardiovasculares constituem a causa mais comum de óbitos em todas as regiões do Brasil, respondendo por 38,8% das mortes na faixa etária entre 50 e 64 anos e 47,1% acima desta idade. Em 2004 foram registrados 285.543 óbitos por doenças do aparelho cardiovascular.

O número totais de óbitos por doença isquêmica do coração, no Brasil, em 2004, foi 86.791 (com taxa de mortalidade específica de 47,80 por 1000 mil habitantes) correspondendo à segunda maior causa de morte por doenças cardiovasculares em 2004, sendo superada apenas pelas doenças cerebrovasculares. apesar dos avanços no campo terapêutico e à medida que a população mundial atinge um maior nível de longevidade a morbi-mortalidade dessas doenças tende a aumentar.

O coração é formado por células cardíacas, como cardiomiócitos, mastócitos, células endoteliais e musculares lisas. Cardiomiócitos representam apenas 1/3 do total das células cardíacas, contudo compõem 70-80% do conteúdo cardíaco (MAGALHÃES et al., 2008). Os cardiomiócitos são células altamente diferenciadas e logo após os primeiros anos de vida param de se multiplicar, fazendo com que o crescimento do coração seja consequência da hipertrofia e não da hiperplasia celular (SCORSIN; GUARITA-SOUZA, 2001).

As modificações nas composições desses compartimentos refletem no processo de remodelação miocárdica que está intimamente associado com a disfunção cardíaca. Essa remodelação ocorre em resposta a estímulos desencadeados por agentes mecânicos ou humorais sobre o tecido cardíaco (WEBER, 2000).

O infarto agudo do miocárdio é, atualmente, uma das mais importantes causas de remodelação cardíaca, e contribui, significativamente, para a dilatação ventricular, fibrose miocárdica, disfunção ventricular e desenvolvimento de insuficiência cardíaca congestiva. A remodelação pós-infarto é um fenômeno que se inicia logo após a oclusão coronariana. Em torno de 72h após o evento agudo, a remodelação envolve o coração como um todo. Nesse período, é evidente a dilatação ventricular, modificação na geometria e hipertrofia da musculatura remanescente. A incapacidade do coração em normalizar o estresse de parede resulta na dilatação progressiva e deterioração da função contrátil. (SUTTON, 2000)

O paradigma de que existem determinados órgãos e tecidos onde as células têm alto grau de diferenciação e, conseqüentemente, potenciação nula, ou seja, não podem se replicar, vem paulatinamente sendo quebrado (FERNANDES, 2007)

Até recentemente o coração era considerado um órgão plenamente diferenciado, incapaz de se regenerar após injúria grave. Contudo, Olivetti(1987), relatou a presença de hiperplasia de células miocárdicas em ratos adultos com hipertrofia cardíaca direita. Kajstura (2008), num trabalho em humanos, relatou que em corações normais existem 14 miócitos por milhão que estão em mitose. Segundo o autor em situações de doença isquêmica cardíaca terminal ou cardiomiopatia dilatada há um aumento de cerca de dez vezes desse índice (152 miócitos por milhão e 131 miócitos por milhão respectivamente).

Infelizmente, na maioria dos casos, o reparo endógeno proporcionado pela proliferação dessas células é insuficiente para substituir os cardiomiócitos lesados e o processo de remodelação com fibroblastos ocorre, tornando a área lesada desprovida de função. Contudo, estudos sobre uso de células tronco cardíaca estão sendo realizados (OYAMA et al, 2004) (PINTO et al, 2006) abrindo novas esperanças na terapêutica do infarto agudo do miocárdio.

Devido à carência na literatura de trabalhos sobre a taxa de proliferação de cardiomiócitos, espera-se, através deste estudo quantificá-la e, assim, acrescentar dados sobre as células tronco cardíacas e sua atuação em situações de injúria cardíaca.

Acreditamos, portanto, existir replicação de cardiomiócitos após infarto agudo do miocárdio, podendo, essa replicação ser quantificada.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Infarto agudo do miocárdio

O infarto agudo do miocárdio (IAM) é definido como um foco de necrose resultante de baixa perfusão tecidual, com sinais e sintomas conseqüentes da morte celular cardíaca. A principal causa é a oclusão das artérias coronarianas por placas ateroscleróticas. (ZORNOFF, 2009)

2.2 Classificação histológica do infarto:

O infarto classifica-se, quanto ao quadro histológico (VASCONCELOS, 2000) em:

Agudo: Predomina fenômenos vasculares - exsudativos (hiperemia ativa patológica, edema, e infiltrado de PMN, principalmente Neutrófilos.).

Subagudo: Caracteriza-se por fenômenos tanto vasculares - exsudativos quanto proliferativos, ocorrendo hiperemia, edema, proliferação fibroblástica e angioblástica, com infiltrado de PMN - principalmente Eosinófilos, e também de MN - Linfócitos, Plasmócitos e Macrófagos

Crônico: Predomina fenômenos proliferativos (Proliferação fibroblástica e angioblástica, e infiltrado de células Mononucleares, principalmente de Linfócitos, Plasmócitos e Macrófagos.).

2.3 Remodelação

O termo remodelação, remodelamento ou remodelagem, foi usado, pela primeira vez em relação à isquemia miocárdica, em 1982, por Hockman e Buckey, em discussão sobre a substituição do tecido necrótico infartado por tecido cicatricial. (HOCKMAN, 1982) Em 1985, Janice Pfeffer foi a primeira pesquisadora a utilizar o termo remodelação no contexto atual. No modelo de infarto experimental em ratos, remodelação foi usada para caracterizar o aumento da cavidade ventricular esquerda (PFEFFER, 1985). Nos anos seguintes, a palavra foi utilizada, esporadicamente, em artigos sobre alterações morfológicas após o infarto agudo do miocárdio (IAM). Em 1990, Pfeffer e Braunwald publicaram revisão sobre a remodelação após o IAM, e a expressão foi cunhada para caracterizar alterações morfológicas após o infarto, caracteristicamente o aumento da cavidade ventricular. Nesse artigo, os autores enfatizavam que o processo de remodelação resultava em disfunção ventricular³. Nos anos seguintes, o termo remodelação foi amplamente aplicado, abrangendo grande variedade de

situações clínicas. Em 2000, ocorreu o fórum internacional que definiu a remodelação como variações moleculares, celulares e intersticiais cardíacas, que vão se manifestar clinicamente por alterações no tamanho, massa, geometria e função do coração, em resposta a determinada agressão (COHN, 2000) (FRANCIS, 2001)

Simultaneamente à necrose das miofibrilas, há desintegração do colágeno interfibrilar. A perda desse tecido de sustentação torna a região mais propensa a distensão e, conseqüentemente, mais suscetível a deformações. Assim, pode ocorrer deslizamento de áreas musculares necróticas, com realinhamento dos miócitos na parede infartada. Como conseqüência, há afilamento da região atingida e dilatação da cavidade. Essa dilatação ventricular aguda, caracterizada por adelgaçamento e distensão da parede infartada, é denominada expansão do infarto (MATSUBARA, 1995)

A remodelação ventricular é evento relativamente comum, pós-IAM. A relevância da remodelação está associada ao fato de que, além de resultar em maior prevalência de ruptura cardíaca, arritmias e formação de aneurismas, esse processo pode modular o aparecimento e a progressão da disfunção ventricular, da insuficiência cardíaca e de morte após o infarto. Outro fato a ser considerado é que esse processo não ocorre de forma homogênea nos pacientes com IAM. Dessa forma, pacientes com remodelação já diagnosticada, ou com alto risco para desenvolvê-la, devem ser tratados de forma agressiva, com a intenção de prevenir, atenuar ou mesmo reverter esse processo. (ZORNOFF, 2009)

2.4 Células-tronco do miocárdio

Células multipotentes, capazes de proliferação e formação de clones foram Identificadas no tecido miocárdico (ANVERSA et al, 2002). Também foi relatada a presença de uma homeostase no tecido cardíaco entre a apoptose e a regeneração celular (GINARD, 2003)

2.5 Células-tronco extracardíacas

Em corações transplantados para pacientes do sexo masculino a partir de doadores do sexo feminino, foram identificados cardiomiócitos marcados com cromossomo Y, sugerindo a presença de células progenitoras extra- cardíacas nos receptores. Os autores constatararam que a frequência de quimerismo varia dependendo do tipo de célula envolvida: células endoteliais (24,3%), células de Schwann (11,2%), células musculares lisas (3,4%) cardiomiócitos (0,04%). A provável origem dessas células é, segundo esses pesquisadores, a medula óssea (MINAMI et al, 2005).

Mouquet et al (2005), corroboraram a hipótese da medula óssea como fonte de células progenitoras extra-cardíacas. Esses autores relataram a migração de células da medula óssea para a área enfartada em ratos. Para isso realizaram a indução de aplasia medular em ratos por meio de irradiação e, ulteriormente, o transplante de medula óssea com células marcadas (produtoras de proteína fluorescente verde) que migraram para a área lesada.

2.6 Índice mitótico

Denomina-se índice mitótico a relação entre os núcleos dos cardiomiócitos que estão em mitose com os núcleos que não se multiplicaram (BELTRAMI, 2001). Nesse estudo, amostras foram retiradas de áreas próximas e distantes do infarto obtidas a partir de 13 doentes que haviam morrido de 4 a 12 dias após o infarto. Os miócitos que haviam iniciado o ciclo celular na preparação para a divisão celular foram medidos pela marcação do antígeno nuclear Ki-67, o qual está associado com a divisão celular. O índice mitótico foi calculado. O marcador Ki-67 foi detectado em 4% dos núcleos dos cardiomiócitos nas regiões adjacentes aos infartos e em 1% nas regiões afastadas dos infartos. A reentrada de miócitos no ciclo celular mitótico resultou em índices de 0,08% e 0,03%, respectivamente, nas zonas adjacentes e afastadas dos infartos.

2.7 Marcador Ki-67

A proteína Ki-67, conhecida também como antígeno identificado pelo anticorpo monoclonal Ki-67 ou MKI67, é um marcador celular para a proliferação. Durante interfase, o antígeno Ki-67 pode exclusivamente ser detectado dentro do núcleo da célula. A proteína Ki-67 está presente durante todas as fases ativas do ciclo da célula (G1, S, G2, e mitosis), mas é ausente na fase G0. O Ki-67 é um marcador excelente para determinar a fração do crescimento de uma população celular. A fração positiva de Ki-67 em células tumorais é correlacionada frequentemente com o curso clínico do câncer. Os exemplos melhor-estudados neste contexto são carcinomas do próstata e mama.

A proteína Ki-67 foi definida originalmente pelo protótipo monoclonal antibody Ki-67 [1], que foi gerado através da imunização de núcleos do Lymphoma de Hodgkin. O nome é derivado da cidade da origem (Kiel) onde foi realizada a pesquisa.

O MIB-1 é usado geralmente como anticorpo monoclonal para detectar o antígeno Ki-67. Uma de suas vantagens preliminares sobre o anticorpo Ki-67 original (e a razão porque suplantou essencialmente o anticorpo original para o uso clínico) é que pode ser usado em seções parafina fixadas com formalina, após a recuperação do antígeno mediada pelo calor.

2.8 Cardiomioplastia celular:

Assim, a partir desses estudos, uma nova terapia, a cardiomioplastia celular, vem se associando às formas convencionais de terapia para o infarto agudo do miocárdio como cirurgia de revascularização miocárdica, angioplastia, terapia medicamentosa e transplante cardíaco (RAJNOCH, 2001).

A cardiomioplastia celular é definida como o implante de células *in situ* com a finalidade de induzir o crescimento de novas fibras musculares e a promoção da angiogênese no miocárdio lesado (CHACHQUES, 2003). Novas possibilidades se abrem, assim através da cardiomioplastia, para o tratamento do infarto agudo do miocárdio e esse estudo poderá acrescentar no melhor entendimento da cardiomioplastia espontânea e suas aplicações clínicas.

Segundo Oyama (2004) alguns tipos celulares tem sido estudados para possível uso na regeneração miocárdica

2.8.1 Cardiomiócitos

Embora a maior parte dos estudos clínicos relatados até à data têm utilizado medula óssea ou de derivados de células do músculo esquelético, uma série de outras células estão a ser investigadas no laboratório experimental. Entre estas, destacamos as células cardíacas estaminais que já foram encontradas em corações humanos (ANVERSA, 2003). Essas células podem dar origem a novos cardiomiócitos em pacientes com aorta estenose de aorta e miocardiopatia isquêmica. São também particularmente úteis na reconstituição do miocárdio por já fazerem parte do órgão e, portanto, possuírem um índice de rejeição praticamente nulo. (DAWN, 2005)

Estudando-se pacientes com estenose aórtica verificou-se que o aumento da massa cardíaca devia-se não só à hipertrofia mas também à hiperplasia celular. Os autores encontraram taxas de mitose quatro a quinze vezes superiores aos dos trabalhos anteriores (ANVERSA 2003), (BELTRAMI, 2001). A explicação provável seria o aumento da hiperplasia em condições de sobrecarga cardíaca. O dado mais significativo desse trabalho foi, segundo os pesquisadores, a presença de células progenitoras primitivas cardíacas, pois não foram encontradas células estaminais com nenhum marcador que as classificassem como originárias de algum tecido extra-cardíaco (URBANEK, 2003)

Contudo, existem algumas dificuldades para a terapia celular utilizando-se cardiomiócitos adultos: 1. baixo potencial proliferativo *in vivo* e *in vitro* (BELTRAMI et al, 2001) 2. maior necessidade de aporte sanguíneo para essas células após o transplante (TAYLOR, 2004) 3. Dificuldade das células-tronco cardíacas migrarem para a área lesada

2.8.2 Células-Tronco Embrionárias

Kehat et al (2001) demonstrou *in vitro* que essas células podem se diferenciar em cardiomiócitos. Na área lesada pelo infarto, em camundongos, melhoram a função ventricular reduzindo, assim, a extensão do dano.(MIN JY et al, 2003)

A incompatibilidade com os antígenos leucocitários humanos, o HLA, constitui uma das limitações para o uso dessas células. Quando essas células são indiferenciadas, não há problemas com rejeição por não haver um sistema HLA completamente formado. Quando, contudo se transformam em células adultas o sistema HLA nelas presentes, poderá tornar-se um indutor de resposta alo-imune, havendo, portanto a necessidade de tratamento imunossupressor se houver transplante. (KEHAT, 2001)

As questões éticas envolvendo o uso de células embrionárias, bem como o seu provável potencial neoplásico, também constituem importantes fatores limitantes.

. Estas células devido a sua pluripotencialidade associam-se a um elevado potencial oncogênico e arritmogênico, (CIBELLI, 2002). Por tudo isso, até o presente momento, desconhece-se dados fidedignos envolvendo o uso de células embrionárias no tratamento de pacientes com IAM. (FRANCA, 2007)

2.8.3.Células tronco mesenquimais da medula óssea

A relativa facilidade na obtenção e manuseio das CTs mesenquimais da medula óssea, permite que essas células sejam utilizadas em transplantes autólogos, eliminando assim, os riscos relacionados a imunorrejeição (CHEN, 2004).

Atualmente, as células da medula óssea adulta já estão sendo utilizadas experimentalmente e clinicamente para o tratamento da isquemia crítica dos membros inferiores e para a recuperação do tecido cardíaco lesado. (FILHO, 2006)

Perin et al (2004), por exemplo, utilizou células tronco da medula óssea em pacientes com miocardiopatia isquêmica grave e sem condições de cirurgia de revascularização ou angioplastia.

Existem, contudo, alguns problemas envolvendo células mesenquimais da medula óssea. Segundo Lee (2004) há o risco dessas células migrarem para áreas fora do coração. Outro problema é que mesmo inseridas nas lesões elas podem se diferenciar em fibroblastos e não em cardiomiócitos (TERADA, 2002) . Cabe lembrar, contudo, que a necessidade de cultura para obtenção de número adequado de células, bem como as características morfológicas desta célula, podem ser um fator limitante à sua administração intracoronariana. Em estudo pré-clínico, (VULLIET, 2004) demonstrou-se a presença de oclusão da

microcirculação após a infusão de células mesenquimais, associando o tamanho das células ao risco de obstrução de fluxo.

O primeiro relato de caso do uso de Células transplantadas de Medula Óssea (CTMO) foi realizado na Alemanha pelo Dr Bodo Strauer 5 em agosto de 2001, que realizou a injeção de CTMO por via coronariana em um paciente após o IAM com segurança.

O grupo do Hospital Pró-Cardíaco, conduziu um estudo com implante trans-endocárdico por cateter de CTMO em pacientes com grave cardiopatia isquêmica sem possibilidade de revascularização miocárdica convencional. Quatorze pacientes foram submetidos à terapia celular. Os transplantes de células foram realizados com o uso dos cateteres NOGA e os procedimentos foram realizados sem complicações maiores, sendo que todos os pacientes receberam altas hospitalares em 48 horas. Em até 1 ano de acompanhamento houve significativa melhora dos sintomas.

Células mononucleares de medula óssea no tratamento de pacientes com infarto agudo foram utilizadas por dois grupos de pesquisa na Alemanha e um em Hong-Kong.

No Brasil, dentro do projeto do Instituto do Milênio de Bioengenharia Tecidual, se utilizou estas mesmas células no tratamento de pacientes com insuficiência cardíaca pós-isquêmica e, mais recentemente, em pacientes com cardiopatia chagásica crônica. Em todos os estudos clínicos realizados até o momento, o transplante das células ocorreu sem intercorrências que pudessem ser relacionadas ao procedimento.

Atualmente o EMRTCC 17 (Estudo Multicêntrico Randomizado de Terapia Celular em Cardiopatias) é de grande importância, pois é o maior estudo randomizado e multicêntrico em andamento. (Portal saúde – 2008)

Esse estudo que está sendo realizado no Brasil é patrocinado pelo Ministério da Saúde desde julho de 2005. Será analisada a eficácia de células-tronco autólogas no tratamento de quatro doenças cardíacas: infarto agudo do miocárdio, isquemia crônica, cardiomiopatia dilatada e doença chagásica.

O projeto analisa a eficácia da terapia em 1,2 mil pacientes. Os pesquisadores acreditam que ainda demorará dois anos até a conclusão. Os resultados foram divulgados num prazo máximo de mais três anos. Os hospitais e institutos responsáveis estão abaixo listados.

Cardiopatia Dilatada - Instituto Nacional de Cardiologia Laranjeiras

Cardiopatia Chagásica - Hospital Santa Isabel

Cardiopatia Isquêmica Crônica - Instituto do Coração INCOR/USP

Cardiopatia Isquêmica Aguda - Instituto de BIOFÍSICA - IBCCF – UFRJ/PROCEP

O Instituto de Biofísica da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) em parceria com o Centro de Ensino e Pesquisa do Hospital Pró-Cardíaco foi então qualificado para ser o Centro-Âncora do braço Cardiopatia Isquêmica Aguda deste estudo

O Instituto de Cardiologia está acompanhando dois pacientes. O estudo está em fase inicial e ainda não tem resultados preliminares. O Hospital de Clínicas será a próxima instituição a iniciar esses testes no Estado.

Em pesquisa independente, no Hospital São Lucas, quatro pacientes receberam a nova terapia e apresentaram melhoras significativas, sendo que um deles surpreendeu os médicos. Até o final do ano, a pesquisa testará mais 16 pacientes.

Os resultados obtidos em todos os estudos clínicos já publicados demonstram ter havido uma melhora significativa tanto nos parâmetros hemodinâmicos quanto na perfusão cardíaca nos pacientes que receberam os transplantes de células mononucleares de medula óssea.

2.8.4 Células satélites da musculatura estriada

Chiu (2001) injetou células musculares satélites (mioblastos) em corações enfartados de cães e verificou que essas células se diferenciavam em células musculares cardíacas, regenerando a área lesada.

Assim, as células mais usadas em experimentos clínicos são as células satélite da musculatura estriada e as células mesenquimais da medula óssea (FILHO, 2006)

Em trabalho pioneiro, Menasche (2001) e colaboradores realizam o transplante de células satélite de músculo esquelético para o coração de um paciente idoso com insuficiência cardíaca refratária, na França.

Em alguns pacientes, transplantados com células satélite de músculo esquelético pelo grupo francês, foram detectadas arritmias graves, que são uma consequência previsível do fato das células transplantadas não formarem junções de tipo “gap” com os cardiomiócitos. As células de medula óssea, no entanto, formam junções de tipo “gap” quando transplantadas para o coração e em nenhum dos pacientes transplantados pelos vários grupos houve, até o momento, qualquer relato da ocorrência de arritmias decorrentes do transplante celular.

2.8.5 Células tronco do cordão umbilical

Uma possibilidade para o futuro é o uso de células tronco do cordão umbilical para a cardiomioplastia. Essas células têm a mesma plasticidade das células tronco embrionárias e mesenquimais da medula óssea e não causam imunorrejeição. Além disso, a coleta de células

a partir do cordão umbilical vem tendo uma ampla vantagem sobre os outros tipos de células já estudadas na cardiomioplastia: evita a invasibilidade existente na coleta de células da medula óssea e não estimula questões éticas como aquelas envolvendo a pesquisa de células-tronco embrionárias (HIRATA et al, 2005)

Dessa forma, a cardiomioplastia, vem se consolidando como mais uma importante terapia para o infarto agudo do miocárdio e o índice de proliferação de cardiomiócitos, pelo baixo nível de imunorrejeição, como uma das possibilidades dentro dessa terapêutica.

3 MÉTODOS

3.1 Área de Estudo

As amostras foram coletadas no Serviço de Verificação de Óbito (SVO) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e analisados no Departamento de Patologia da UFPE.

3.2 População de Estudo

Foram estudados 22 fragmentos cardíacos de cadáveres com diagnóstico de causa morte de infarto.

3.3 Delineamento da Pesquisa

Estudo descritivo, observacional, transversal e quantitativo.

3.4 Seleção da Amostra

Foram selecionadas 22 amostras de corações enfartados de cadáveres de ambos os sexos na proporção de 1 amostra para cada coração de cadáver submetido ao Serviço de Verificação de Óbito de Pernambuco. Essas amostras foram coradas com HE e marcadas por imunohistoquímica conforme protocolos abaixo descritos.

3.5 Método de Coleta

3.5.1 Horário da Coleta e local: O horário da coleta foi das 8:00 às 12:00 hs e de 14:00 às 16:00hs no Serviço de Verificação de óbito da UFPE

3.5.2 Coleta e análise das amostras: Foram feitos cortes transversais do coração e retirados fragmentos da área enfartada adjacente (acompanhados de fragmentos da área sã imediatamente adjacente de até 1 cm) de cerca de 1 cm de espessura e diâmetro horizontal e vertical dependendo da morfologia da área enfartada, variando entre 3 a 4 centímetros.

Foram colhidas amostras de tecido miocárdico de cadáveres de 19 homens e 03 mulheres. A coleta ocorreu após no mínimo 6 horas após o óbito. Essas amostras foram embrocadas em parafina e coradas com hematoxilina e eosina. Foi feita a classificação histológica (figuras 01 e 02) com a ajuda do médico patologista do serviço.

Os fragmentos foram encaminhados para o processamento histológico no laboratório de histotecnologia do SVO. As amostras foram colocadas em fixadores por 24h para ulterior inclusão em blocos de parafina.

Foram analisadas as características morfológicas do tecido enfartado classificando-o em infarto agudo ou crônico segundo os seguintes critérios (VASCONCELOS, 2000):

Agudo: Predomina fenômenos vasculares - exsudativos (hiperemia ativa patológica, edema, e infiltrado de PMN, principalmente Neutrófilos.).

Crônico: Predomina fenômenos proliferativos (Proliferação fibroblástica e angioblástica, e infiltrado de células Mononucleares, principalmente de Linfócitos, Plasmócitos e Macrófagos.).

Todas as lâminas foram coradas com o marcador Ki 67.

Os cardiomiócitos corados com Ki67 foram comparados com um controle de linfonodo com carcinoma metastático cujos núcleos em proliferação se coraram em castanho.

3.6 Método imunohistoquímico

As reações imunohistoquímicas foram realizadas Laboratório de imunopatologia – IMUNOPAT. Utilizou-se o método peroxidase-antiperoxidase (PAP) com o marcador Ki-67. Os cortes histológicos foram desparafinizados inicialmente em estufa , depois imersos em dois banhos de xilol sendo o primeiro de 30 minutos dentro de estufa e o segundo de 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida foram reidratados em cadeia decrescente de etanol (100%, 90% e 70%) e imersos por 10 minutos em solução de hidróxido de amônio a 10% em etanol a 95% para remoção de pigmentos formólicos e lavados em cinco banhos de água destilada. O bloqueio da atividade de ligação à avidina endógena foi realizado de acordo com o proposto por Miller et al. (1999).

Foi realizada a recuperação antigênica, técnica de recuperação de antígenos com a finalidade de expor os epitopos teciduais para as reações imuno-histoquímicas. O marcador de proliferação celular utilizado foi o antígeno primário Ki-67. As lâminas foram imersas em citrato de sódio (10mM) pH 6.0 e aquecidas em panela de pressão durante 15 segundos. As lâminas foram imersas nas soluções e incubadas em câmara úmida por 20 minutos com controle de pressão e temperatura. Após a recuperação, essas lâminas foram mantidas por 20 minutos em temperatura ambiente para resfriar, sendo lavadas em cinco banhos de água destilada.

Para a inibição da peroxidase endógena os cortes foram submetidos a dois banhos de 15 minutos em solução de peróxido de hidrogênio 10% para o EGFR e Ki-67 e dois banhos de 10 minutos em solução de peróxido de hidrogênio 10% em metanol para o p27, sendo todos seguidos de lavagem em 5 banhos de água destilada. Todas as incubações descritas a seguir foram precedidas de três banhos de solução tampão TRIS-HCl pH = 7,4 (Hidroximetil-aminometano- ácido clorídrico) de cinco minutos cada..

Os cortes foram então incubados com o antígeno primário Ki – 67 (Dako, Carpinteria, CA, EUA), Após a incubação, os cortes foram submetidos a três banhos de solução tampão TRIS-HCL, pH 7,4. Em seguida foi realizada a incubação com anticorpo secundário, pertencente ao Kit LSAB+ Peroxidase (LSAB® System, Streptavidin-HRP, Dako Corporation, Carpinteria, CA, EUA, código K0675), à temperatura ambiente em câmara úmida por 30 minutos e lavagem em três banhos em solução tampão TRIS-HCL, pH 7,4. As lâminas foram então incubadas em complexo terciário também pertencente ao Kit LSAB+ Peroxidase (LSAB® System, Streptavidin-HRP, Dako Corporation, Carpinteria, CA, EUA, código K0675), à temperatura ambiente em câmara úmida por 30 minutos, sendo lavadas em três banhos em solução tampão TRIS-HCL, pH 7,4. Seguiram-se 5 banhos de água destilada.

A revelação da reação foi executada com a solução cromógena contendo 25mg de 3,3' diaminobenzidina (DAB - Sigma Chemical, St. Louis, EUA, código D5637) diluídos em 100 ml de tampão TRIS-HCL pH 7,4, acrescido de 1,20 ml de peróxido de hidrogênio 10 volumes por 5 minutos.

Foi utilizado como controle áreas de tecido de linfonodo. Os casos foram considerados positivos quando se identificava cor castanha no núcleo das células estudadas.

3.7 Análise morfométrica

Foi realizada a análise morfométrica dos cardiomiócitos, com objetiva de 100X, em áreas de infarto e em área normal, comparando-se o perímetro e a área dos mesmos em cada uma das 22 amostras selecionadas. O critério de separação entre área infartada e normal foram as características histológicas como a presença de fibras de colágeno e as alterações celulares necróticas do infarto e a escolha das células foi feita de forma aleatória. As células foram fotografadas e medidas pelo programa motic image plus 2.0 com câmera digital acoplada. Tabelas, gráficos e fotos foram anexados a este trabalho.

3.8 Análise dos Dados

Os dados foram apresentados em tabelas e/ou gráfico com suas respectivas frequências absolutas e relativas. Foram utilizados os Softwares SPSS 13.0 para Windows e o Excel 2003. Para comparação entre as variáveis quantitativas (2 grupos), foi utilizado o teste Student (distribuição normal). O teste de Normalidade de Kolmogorov-Smirnov foi usado para variáveis quantitativas. Todos os testes foram aplicados com 95% de confiança.

3.9 Considerações éticas

A coleta do material só foi iniciada após esse trabalho ser apresentado e aprovado pela Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Pernambuco. Foi também feito um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A) a ser assinado pelos familiares ou responsáveis pelos cadáveres.

4 RESULTADOS

ARTIGO ORIGINAL:

HÁ PROLIFERAÇÃO DE CARDIOMIÓCITOS NO INFARTO?

Autores: Fernando Antônio Neves

Nicodemos Pontes Telles

Luciano Montenegro

Resumo

Introdução: Até o final do século passado existia o paradigma de que cardiomiócitos eram células terminais, ou seja, não se diferenciavam. Em 2001, verificou-se que, apesar da remodelação, havia uma proliferação de cardiomiócitos com baixos índices mitóticos. Nosso estudo visa corroborar esses achados. **Metodologia:** Foram colhidas amostras de tecido miocárdico de cadáveres do Serviço de Verificação de Óbito de 22 homens e 07 mulheres. Essas amostras foram coradas com hematoxilina e eosina. Somente as amostras classificadas como infarto foram coradas com o marcador Ki 67. O caso controle foi uma amostra de linfonodo, corado com o marcador de proliferação nuclear Ki67. Foi realizada também a análise morfométrica dos cardiomiócitos, com objetiva de 10X, em áreas de infarto e em área normal, comparando-se o perímetro e a área dos mesmos. **Resultados:** Nos 22 casos selecionados não foi observado nenhum núcleo de cardiomiócito marcado com Ki-67 evidenciando uma provável ausência de mitose. Em relação à análise morfométrica, o aumento do perímetro e área dos cardiomiócitos em área infartada, em relação à área normal, foi estatisticamente significativa. **Conclusão:** Acreditamos que a metodologia empregada, coloração com hematoxilina e eosina e marcação com Ki-67, não é suficientemente precisa para a detecção da proliferação de cardiomiócitos, requerendo-se futuros trabalhos com maiores recursos metodológicos.

Palavras-chave: infarto; índice mitótico; cardiomiócitos, cardiomioplastia

Summary

Introduction: By the end of last century there was the paradigm that cardiomyocyte cells were terminal, ie not different. In 2001, it was found that despite the renovations, there was a proliferation of cardiomyocytes with low mitotic indexes. Our study aims to confirm these findings. **Methods:** We collected samples of the myocardial tissue from cadavers Death Verification Service of 22 men and 07 women. These samples were stained with hematoxylin and eosin. Only samples classified as myocardial infarction were stained with the marker Ki 67. The case was a control sample of lymph node stained with the nuclear proliferation marker Ki67. Was also performed morphometric analysis of cardiomyocytes with 10X objective in infarct area and normal area, comparing perimeter and area of the same. **Results:** In 22 selected cases did not observe any nucleus of cardiomyocytes labeled with Ki-67 indicating a probable absence of mitosis. Regarding the morphometric analysis, the increase in perimeter and area of cardiomyocytes in the infarcted area in relation to its normal, was statistically significant. **Conclusion:** We believe that the methodology employed, staining with hematoxylin and eosin and staining with Ki-67, is not precise enough to detect the proliferation of cardiomyocytes, requiring further work with larger methodological resources. **Keywords:** infarction; mitotic index; cardiomyocytes cardiomyoplasty

Introdução

A definição de que o coração é um órgão terminalmente diferenciado e incapaz de originar novos cardiomiócitos após sua perda foi aceito durante longo período pela comunidade médica e científica. De acordo com esta teoria, a fibra miocárdica poderia desenvolver hipertrofia fisiológica ou patológica, mas não se replicar, sendo, portanto, o coração constituído de células pós-mitóticas, sem capacidade regenerativa (ZAK, 1974).

Após o infarto agudo do miocárdio, a área comprometida é substituída por tecido fibroso num processo denominado remodelação. Dessa forma, o tecido substituído permanece afuncional comprometendo a dinâmica do órgão (FILHO, 2006)

Dependendo do tempo de evolução e das características macroscópicas e microscópicas, o infarto miocárdico pode ser classificado em agudo, subagudo e crônico. Infartos agudos ocorrem de seis horas a sete dias após a isquemia e caracterizam-se macroscopicamente por áreas esbranquiçadas e secas, delimitadas por um halo avermelhado (zona de demarcação), localizadas principalmente no subendocardio. Na microscopia há uma hipereosinofilia de miofibras, perda das estriações e separação destas por edema, além de infiltrado inflamatório constituído por neutrófilos e macrófagos. Infartos subagudos são observados de quatro a quatorze dias após o estímulo patológico, e as áreas necróticas, na microscopia, são delimitadas por tecido de granulação. Infartos além de duas semanas são considerados crônicos e caracterizados por tecido de granulação maduro, além de fibrose (DRIEHUYS et al., 1998).

Recentemente, surgiram evidências contra a teoria dos cardiomiócitos serem totalmente diferenciados, sugerindo que uma pequena população de miócitos seria capaz de reingressar ao ciclo celular e replicar-se. Beltrami e colaboradores (2001) comprovaram a presença de miócitos em mitose nos segmentos peri-infarto e em segmentos distantes, em um índice mitótico de 0,08% e 0,03%, respectivamente. A presença de uma população de células primitivas distribuídas pelo tecido miocárdio, capazes de proliferação quando expostas aos estímulos específicos, foi tratada como um possível mecanismo de regeneração miocárdica.

Vale ressaltar que as doenças cardiovasculares, de acordo com os dados do Ministério da Saúde, representam a principal causa de óbitos em todas as regiões do Brasil, respondendo por 38,8% das mortes na faixa etária entre 50 e 64 anos e 47,1% acima desta idade(1). Em 2004 foram registrados 285.543 óbitos por doenças do aparelho cardiovascular.

O número totais de óbitos por doença isquêmica do coração, no Brasil, em 2004, foi 86.791 (com taxa de mortalidade específica de 47,80 por 1000 mil habitantes) correspondendo à segunda maior causa de morte por doenças cardiovasculares em 2004,

sendo superada apenas pelas doenças cerebrovasculares. apesar dos avanços no campo terapêutico e à medida que a população mundial atinge um maior nível de longevidade a morbi-mortalidade dessas doenças tende a aumentar Nosso estudo objetiva, portanto, trazer alguma contribuição para os avanços na cardiomioplastia, através da determinação do índice mitótico no infarto.

Material e método

Foram selecionadas amostras colhidas de tecido miocárdico de cadáveres do Serviço de Verificação de Óbito de 19 homens e 03 mulheres. Essas amostras foram processadas com parafina e coradas com hematoxilina e eosina. Foi feita a classificação histológica (figuras 01 e 02) com a ajuda do médico patologista do serviço. Somente as amostras classificadas como infarto foram coradas com o marcador Ki 67. O controle usado para o marcador foi uma lâmina de linfonodo, cujos núcleos dos linfócitos em mitose coraram-se em castanho (figura 03). Os fragmentos foram encaminhados para o processamento histológico no laboratório de histotecnologia do SVO. As amostras foram colocadas em fixadores por 24h para ulterior inclusão em blocos de parafina.

Foram analisadas as características morfológicas do tecido enfartado classificando-o em infarto agudo ou crônico segundo os seguintes critérios (VASCONCELOS, 2000):

Agudo: Predomina fenômenos vasculares - exsudativos (hiperemia ativa patológica, edema, e infiltrado de PMN, principalmente Neutrófilos.).

Crônico: Predomina fenômenos proliferativos (Proliferação fibroblástica e angioblástica, e infiltrado de células Mononucleares, principalmente de Linfócitos, Plasmócitos e Macrófagos.).

Todas as lâminas foram coradas com o marcador Ki 67.

Os cardiomiócitos corados com Ki67 foram comparados com um controle de linfonodo com carcinoma metastático cujos núcleos em proliferação se coraram em castanho.

Método imunohistoquímico

As reações imunohistoquímicas foram realizadas Laboratório de imunopatologia – IMUNOPAT. Utilizou-se o método peroxidase-antiperoxidase (PAP) com o marcador Ki-67. Os cortes histológicos foram desparafinizados inicialmente em estufa , depois imersos em dois banhos de xilol sendo o primeiro de 30 minutos dentro de estufa e o segundo de 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida foram reidratados em cadeia decrescente de etanol (100%, 90% e 70%) e imersos por 10 minutos em solução de hidróxido de amônio a 10% em etanol a 95% para remoção de pigmentos formólicos e lavados em cinco banhos de água destilada. O bloqueio da atividade de ligação à avidina endógena foi realizado de acordo com o proposto por Miller et al. (1999).

Foi realizada a recuperação antigênica, técnica de recuperação de antígenos com a finalidade de expor os epitopos teciduais para as reações imuno-histoquímicas. O marcador de

proliferação celular utilizado foi o antígeno primário Ki-67. As lâminas foram imersas em citrato de sódio (10mM) pH 6.0 e aquecidas em panela de pressão durante 15 segundos. As lâminas foram imersas nas soluções e incubadas em câmara úmida por 20 minutos com controle de pressão e temperatura. Após a recuperação, essas lâminas foram mantidas por 20 minutos em temperatura ambiente para resfriar, sendo lavadas em cinco banhos de água destilada.

Para a inibição da peroxidase endógena os cortes foram submetidos a dois banhos de 15 minutos em solução de peróxido de hidrogênio 10% para o EGFR e Ki-67 e dois banhos de 10 minutos em solução de peróxido de hidrogênio 10% em metanol para o p27, sendo todos seguidos de lavagem em 5 banhos de água destilada. Todas as incubações descritas a seguir foram precedidas de três banhos de solução tampão TRIS-HCl pH = 7,4 (Hidroxi-metil-aminometano- ácido clorídrico) de cinco minutos cada..

Os cortes foram então incubados com o antígeno primário Ki – 67 (Dako, Carpinteria, CA, EUA), Após a incubação, os cortes foram submetidos a três banhos de solução tampão TRIS-HCL, pH 7,4. Em seguida foi realizada a incubação com anticorpo secundário, pertencente ao Kit LSAB+ Peroxidase (LSAB® System, Streptavidin-HRP, Dako Corporation, Carpinteria, CA, EUA, código K0675), à temperatura ambiente em câmara úmida por 30 minutos e lavagem em três banhos em solução tampão TRIS-HCL, pH 7,4. As lâminas foram então incubadas em complexo terciário também pertencente ao Kit LSAB+ Peroxidase (LSAB® System, Streptavidin-HRP, Dako Corporation, Carpinteria, CA, EUA, código K0675), à temperatura ambiente em câmara úmida por 30 minutos, sendo lavadas em três banhos em solução tampão TRIS-HCL, pH 7,4. Seguiram-se 5 banhos de água destilada.

A revelação da reação foi executada com a solução cromógena contendo 25mg de 3,3' diaminobenzidina (DAB - Sigma Chemical, St. Louis, EUA, código D5637) diluídos em 100 ml de tampão TRIS-HCL pH 7.4, acrescido de 1,20 ml de peróxido de hidrogênio 10 volumes por 5 minutos.

Foi utilizado como controle áreas de tecido de linfonodo. Os casos foram considerados positivos quando se identificava cor castanha no núcleo das células estudadas.

Análise morfolométrica

Foi realizada a análise morfolométrica dos cardiomiócitos, com objetiva de 100X, em áreas de infarto e em área normal, comparando-se o perímetro e a área dos mesmos em cada uma das 22 amostras selecionadas. O critério de separação entre área infartada e normal foram

as características histológicas como a presença de fibras de colágeno e as alterações celulares necróticas do infarto e a escolha das células foi feita de forma aleatória. As células foram fotografadas e medidas pelo programa motic image plus 2.0 com câmera digital acoplada. Tabelas, gráficos e fotos foram anexados a este trabalho.

Análise dos Dados

Os dados foram apresentados em tabelas e/ou gráfico com suas respectivas frequências absolutas e relativas. Foram utilizados os Softwares SPSS 13.0 para Windows e o Excel 2003. Para comparação entre as variáveis quantitativas (2 grupos), foi utilizado o teste Student (distribuição normal). O teste de Normalidade de Kolmogorov-Smirnov foi usado para variáveis quantitativas. Todos os testes foram aplicados com 95% de confiança.

Considerações éticas

A coleta do material só foi iniciada após esse trabalho ser apresentado e aprovado pela Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Pernambuco. Foi também feito um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A) a ser assinado pelos familiares ou responsáveis pelos cadáveres.

Resultados

Das 22 lâminas coradas com HE observamos que 21 eram de infarto crônico (figura 01), 1 de infarto agudo (figura 02). As 7 amostras de não infarto foram descartadas. (tabela 02)

A grande maioria dos casos (20 casos) ocorreram em pacientes com idade maior ou igual a 50 anos e apenas 2 casos ocorreram em pacientes com idade inferior a 50 anos. (tabela 05 e gráfico 03)

Nos 22 casos colhidos não foi observado nenhum núcleo de cardiomiócito marcado com Ki-67 evidenciando uma provável ausência de proliferação de cardiomiócitos. (figura 06). Os resultados foram relacionados segundo o gênero (tabela03), faixa etária (tabela 04) e diagnóstico (tabela 03,05 e 05) e comparados entre si.

Realizamos, então, a análise morfométrica do perímetro e área dos cardiomiócitos em áreas infartadas e normais de cada amostra (figuras 03 e 04) e os dados foram colocados em tabelas (06 e 07) e gráficos (04 e 05). Verificou-se que o aumento da área e do perímetro dos cardiomiócitos na área infartada, em comparação com a área normal foi estatisticamente significante.

Tabela 01: Relação das amostras colhidas em corações humanos adultos segundo número da lâmina, sexo, idade e tipo histológico do infarto

<i>Pact</i>	<i>Sexo</i>	<i>Idade</i>	Tipo histológico de infarto
1778-09	M	50	crônico
1082-09	M	95	crônico
0917-09	M	53	crônico
1679-09	M	78	crônico
0873-09	M	81	crônico
1780-09	F	56	crônico
1965-09	F	48	crônico
0544-09	M	60	crônico
0709-09	F	78	crônico
0606-09	M	59	crônico
0599-09	M	58	crônico
5066-09	M	56	crônico
6067-09	M	63	crônico
6321-09	M	49	agudo
6351-09	M	70	crônico
6354-09	M	60	crônico
6235-09	M	82	crônico
6673-09	M	50	crônico
6674-09	M	62	crônico
6569-09	M	59	crônico
6820-09	M	79	crônico
6813-09	M	44	crônico

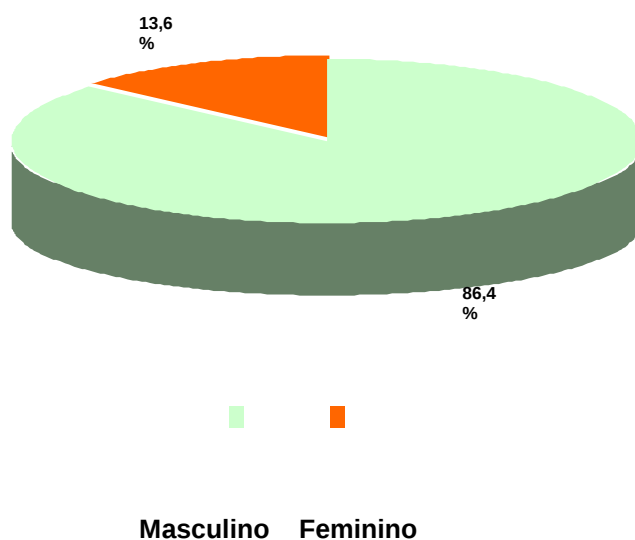
M – masculino

F- feminino

Tabela 02: Relação entre sexo, idade e tipo de infarto das amostras colhidas e selecionadas em corações humanos adultos

Variáveis	N	%
Sexo		
Masculino	19	86,4
Feminino	3	13,6
Idade (Anos)		
< 50	3	13,6
> ou = 50 - 60	8	36,4
≥ 60	11	50,0
Tipo de Infarto		
Infarto crônico	21	95,5
Infarto agudo	1	4,5

Gráfico 1: Relação entre o sexo masculino e feminino das amostras selecionadas como infarto em coração humanos adultos



No gráfico acima observa-se um nítido predomínio do sexo masculino em relação ao feminino nas amostras coletadas

Gráfico 2: Relação entre os tipos histológicos de infarto das amostras colhidas em corações humanos adultos

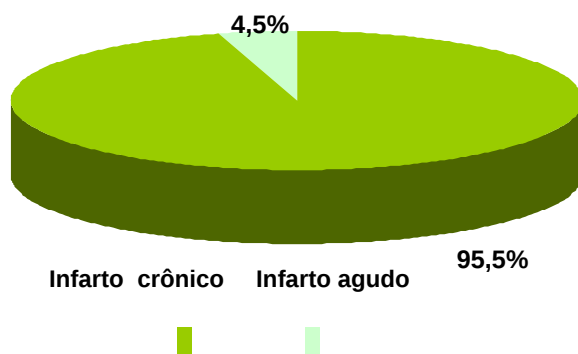
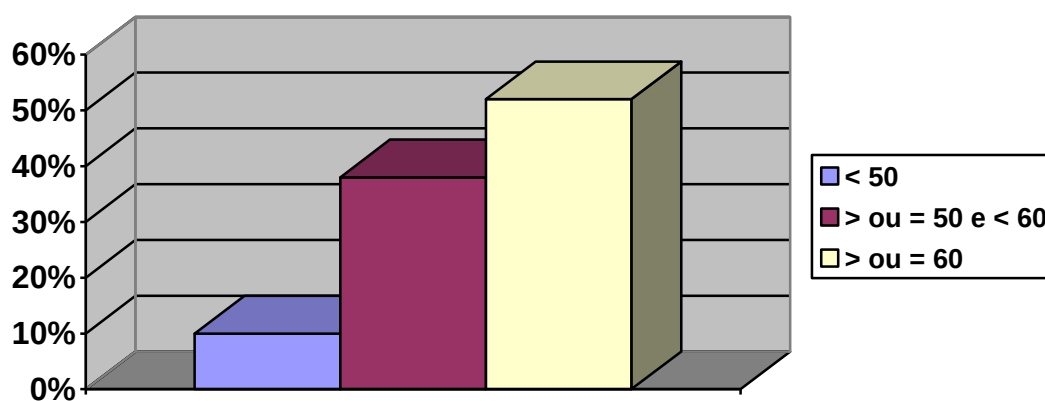
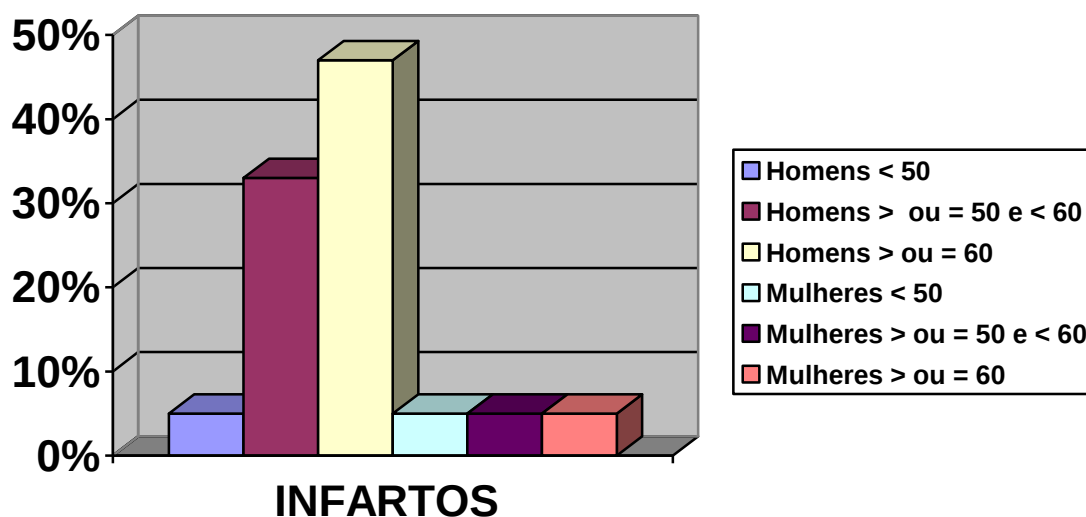


Gráfico 3: Relação entre as faixas-etárias das amostras colhidas em corações humanos adultos



No gráfico acima verificamos predomínio das faixas-etárias mais elevadas nas amostras coletadas com 52% da faixa-etária maior que 60 e 38% entre 50 e 60.

Gráfico 4 - Relação entre gênero e faixa etária das amostras colhidas em corações humanos adultos



No gráfico acima verificamos que, a maioria das amostras coletadas foram de homens com mais de 60 anos (47%)

Tabela 3: comparação entre a média da área e do perímetro de áreas infartadas com áreas normais.

Variáveis	Infarto						p-valor *
	Sim			Não			
	Média	±	DP	Média	±	DP	
Área	11988,9	±	3282,049	6652,5	±	3682,208	< 0,001
Perímetro	518,6	±	92,838	379,9	±	108,784	< 0,001

(*) Teste de t Student

Houve diferença estatisticamente significativa na área e no perímetro da área infartada quando comparada a área normal

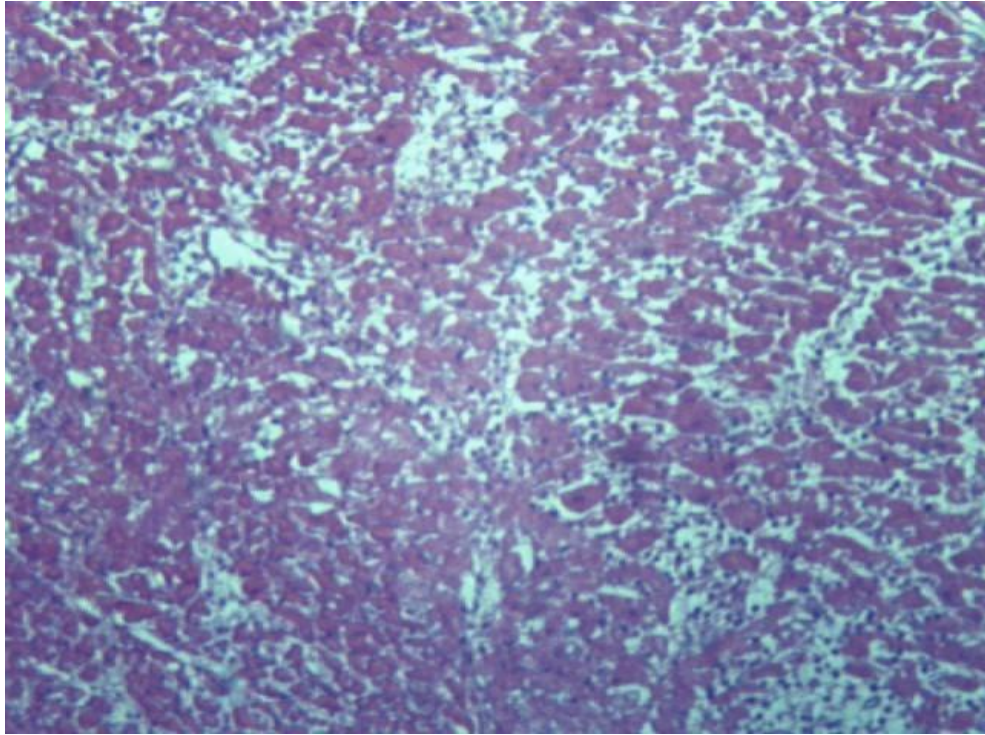


Figura 01: amostra de infarto agudo em coração humano (HE, 100X)

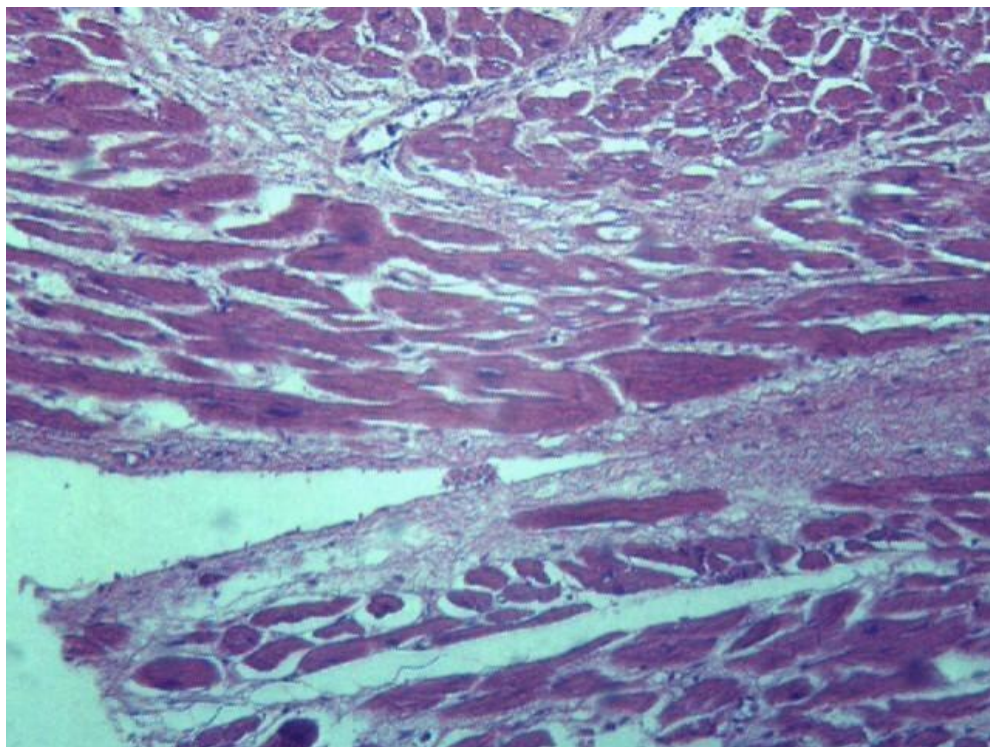


Figura 2: amostra de tecido com infarto crônico corado (HE, 100X)

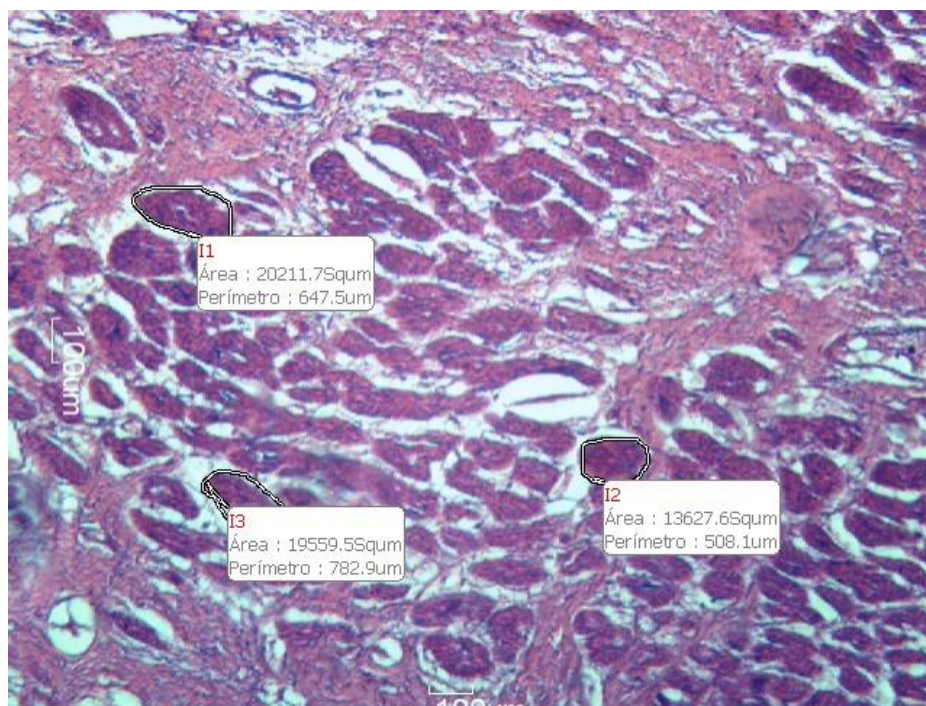


Figura 03: amostra de infarto crônico em coração humano com células marcadas aleatoriamente para determinação da área e perímetro (HE, 100X)

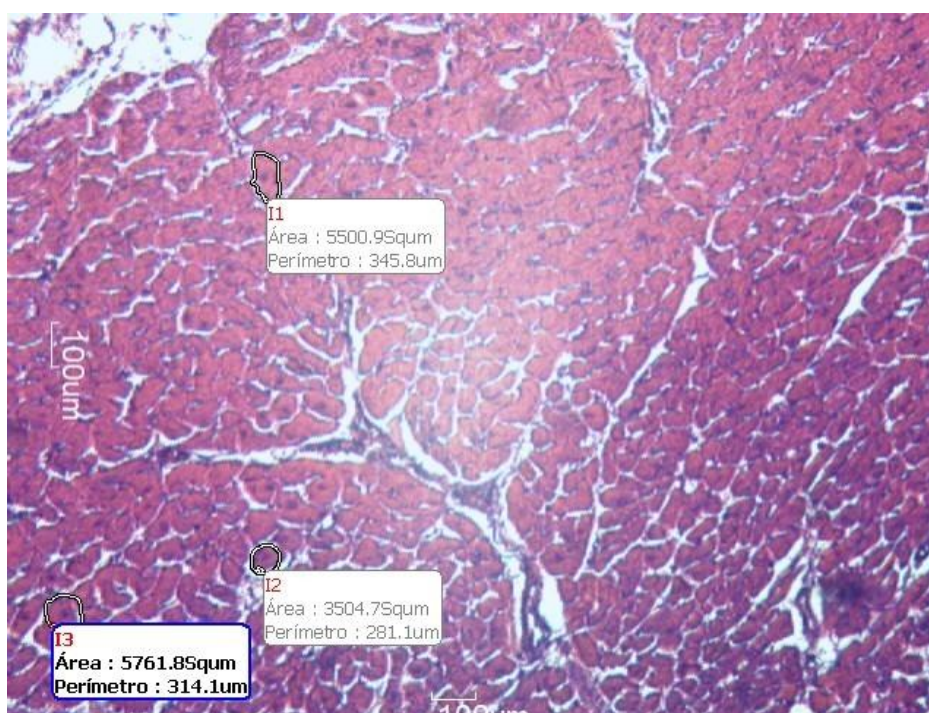


Figura 04: área normal de amostra de tecido com infarto em coração humano com células marcadas aleatoriamente para determinação de área e perímetro (HE, 100X)

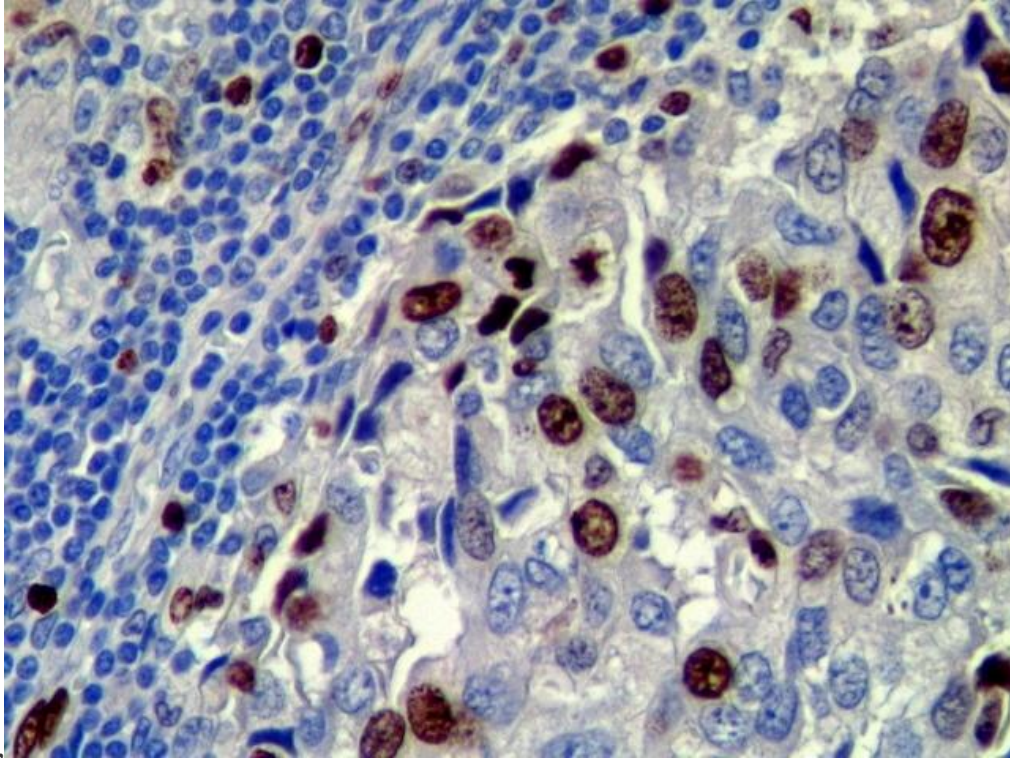


Figura 05: controle do exame imunohistoquímico com linfonodos de carcinomas metastáticos (Ki67, 400X)

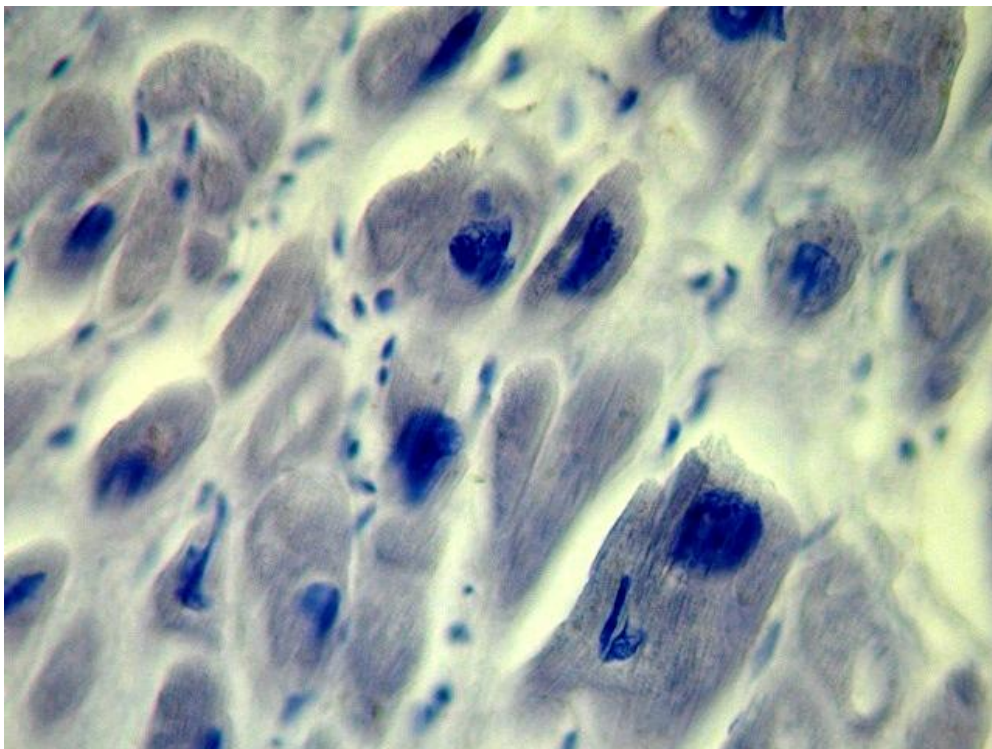


Figura 06: Cardiomiócitos sem evidência de mitose (Ki 67, 400X)

Discussão

Homeostase do coração: apoptose versus regeneração

A homeostase cardíaca é regulada pelo equilíbrio entre a apoptose e a formação de novas células através de células tronco cardíacas existentes nos átrios e no ápice, mas também presentes em todo o miocárdio ventricular. A geração de cardiomiócitos, células musculares lisas vasculares e endoteliais equivalente a perda é esperada ocorrer em todo o coração para preservar o seu equilíbrio, antes que os efeitos do envelhecimento tornem-se aparentes. (CHIMENTI, 2003)

No coração humano normal, há cerca de 5×10^9 células parenquimáticas no ventrículo esquerdo incluindo o septo interventricular, e aproximadamente 3×10^6 miócitos terminalmente diferenciados são gerados por dia mediante o crescimento de células tronco-cardíacas. (URBANEK, 2005) (QUAINI, 2003). Este grau de formação dos miócitos garante que toda a população de células do coração seja substituída aproximadamente a cada 4,5 anos. Assim, as células do parênquima não podem viver, como geralmente se acreditava no milênio passado, desde o nascimento do organismo, ou seja, cerca de 80 anos. Dessa forma, o coração humano substitui totalmente a população de miócitos cerca de 18 vezes durante o curso da vida, independentemente da presença ou não de doenças cardíacas.

Existe um equilíbrio notável entre a formação e perda dos miócitos. No coração humano adulto normal a morte celular por apoptose ou necrose representa a perda de cerca 3×10^6 cardiomiócitos por dia, um valor essencialmente idêntico ao dos cardiomiócitos regenerados. A taxa de morte celular é calculada a partir da medição de apoptose e necrose de miócitos (GUERRA, 1999) (OLIVETTI, 1997). Se o coração fosse, de fato, pós - mitótico e os miócitos mortos não fossem constantemente substituídos, o órgão inteiro desapareceria em cerca de 4,5 anos. Estas estimativas conservadoras projetam uma imagem muito diferente do coração humano, em nítido contraste com a afirmação de que este órgão tem uma fraca capacidade de regenerar miócitos, inadequada para uma significativa reconstituição do miocárdio, (NADAL-GINARD, 1989)

Vale salientar que as células-tronco cardíacas também contribuem para a formação de vasos coronários e substituição das células endoteliais e células musculares lisas na parede vascular. As células progenitoras endoteliais circulantes também são uma poderosa fonte de vasculogênese (URBICH, 2004). De que maneira as células-tronco cardíacas interagem com

células progenitoras endoteliais na homeostase e no crescimento de vasos coronarianos, ainda é uma questão sem resposta.

Em resumo, o coração do adulto não é estático, mas um órgão muito dinâmico, cuja homeostase é governada por um compartimento de células-tronco cardíacas multipotentes, que continuamente repovoam o miocárdio, substituindo as células do parênquima vascular e células musculares lisas e células endoteliais que morrem por apoptose ou necrose.

Proliferação de cardiomiócitos no infarto agudo do miocárdio

O coração adulto está bem equipado para sustentar a homeostase do órgão, o que preserva de forma eficiente a integridade do tecido durante o turnover celular fisiológico. Mais complexa é a questão de saber se o coração tem a capacidade intrínseca de gerar grandes quantidades de miócitos após o infarto do miocárdio.

A definição de infarto do miocárdio tem sido citada como um argumento incontestável contra a regeneração dos cardiomiócitos. Embora esta lógica esteja profundamente enraizada na comunidade clínica e científica, fica aquém, por diversas razões. O resultado do infarto é essencialmente idêntico em todos os órgãos do organismo, independentemente se as células parenquimatosas e não parenquimatosas são capazes ou não de entrar no ciclo celular e dividirem-se. Assim, a oclusão de uma artéria principal condutora ou seus ramos gera grande perda de tecido na pele, rim, intestino, cérebro, fígado e órgãos reprodutivos, de uma forma idêntica ao que ocorre no coração. (MORI, 2001) (FRANCQUE, 2004) (LEONG, 2005)

Contudo, a presença de células-tronco residentes no coração não impede a evolução inevitável do infarto com formação de cicatriz. (FINATO, 1994) Este resultado geral da lesão isquêmica é ditada por dois fatores cruciais: (1) As células-tronco no infarto morrem, assim como todas as outras células privadas de fornecimento de oxigênio, e (2) células-tronco residentes não podem migrar a partir do tecido viável para a área danificada, crescer e diferenciar-se para substituir as linhagens de células mortas. (ANVERSA, 2006)

Nos seres humanos, a formação de cardiomiócitos dentro do tecido não lesado é drasticamente potencializada na insuficiência cardíaca aguda e crônica. Pacientes que morrem logo após o infarto nos dão uma boa indicação do potencial de regeneração máxima do coração humano. Um ventrículo infartado com aproximadamente 190 g de miocárdio viável e índice mitótico aproximado de 500/10⁶ pode criar cerca de 2.20x10⁸ miócitos por dia. (BELTRAMI, 2001) Esse valor é aproximadamente 70 vezes superior à taxa de rotatividade de base. Se esta magnitude de crescimento do miócito se mantivesse, um infarto de 40%, que reflete uma perda de aproximadamente 2x10⁹ miócitos seria reparado em 10 dias. Em fase

final de cardiomiopatia pós-infarto, há uma redução de cerca de 70% do índice mitótico caindo para um valor de aproximadamente 140/106. Entretanto, a massa muscular ventricular viável é o aumentada para aproximadamente 260 g. Esses fatores levam à geração de aproximadamente 3.4×10^7 miócitos por dia, o que é cerca de 11 vezes superior ao volume fisiológico. (KAJSTURA, 1998)

Portanto, o coração humano severamente descompensado possui uma reserva de crescimento relevante, que é, no entanto, restrita à região não-infartada. Além disso, a morte em curso no miocárdio sobrevivente compreende cerca de 1.80×10^8 de cardiomiócitos após o infarto e aproximadamente 108 cardiomiócitos em fase final do pós-infarto. (GUERRA, 1999) Com base nestas observações, a regeneração é modestamente superior a morte dos cardiomiócitos após o infarto, mas a substituição dos mesmos é acentuadamente menor a longo prazo. Assim, a morte do cardiomiócito interfere significativamente com a recuperação da estrutura e função após um infarto agudo e resulta em perda de miocárdio na doença cardíaca isquêmica de longa duração. O agravamento tempo-dependente da anatomia cardíaca e hemodinâmica só pode ser prevenido e revertido se o tecido morto é restaurado com novo miocárdio funcionalmente competente. Na sua ausência, ocorre hipertrofia do cardiomiócito e esse aumento celular deprime a função ventricular.

Análise morfométrica:

Em meados do século passado, foi criado conceito de peso crítico, acima do qual o aumento adicional de massa é devido à hiperplasia das células do músculo. De acordo com essa teoria, o aumento do número de cardiomiócitos seria uma consequência da divisão amitótica dos núcleos das células e da divisão longitudinal das fibras musculares. (LINZBACH, 1950).

Estudos recentes têm correlacionado hipertrofia com hiperplasia. Em 1993, Grajek e colaboradores, estudaram cento e três pacientes, com idade entre 26 a 80 anos. Os corações foram, como em nosso estudo, necropsiados e os resultados avaliados *post-mortem*. O primeiro grupo foi composto por 20 corações, pesando entre 330 e 770 g, obtidos de pacientes com hipertensão sistêmica. O segundo grupo de 38 corações, pesando 318-820 g, foi obtido de pacientes que apresentaram doença isquêmica do coração. O terceiro grupo consistia em 24 corações (443-1315 g de peso), e foi adquirido a partir de pacientes com doença valvular. O quarto grupo consistiu de sete corações, pesando 486-747 g, obtido de pacientes com cardiomiopatia congestiva. O grupo controle consistiu de 17 corações normais (260-400 g de peso). Os pacientes deste grupo não apresentaram nenhuma história de doença cardíaca e o

exame post-mortem revelou que eles eram livres de anormalidade anatômica das válvulas, miocárdio ou artérias coronárias.

Verificou-se, então, a presença de hipertrofia sem hiperplasia em ventrículos esquerdos com massas de até 250g; hipertrofia com sinais de hiperplasia em ventrículos com peso entre 250g e 350g e hiperplasia quando o coração atinge uma massa superior a 350g. Isso indica que, independentemente da etiologia, uma vez que a massa crítica cardíaca tem sido atingida, a hiperplasia se torna o único caminho para novas o crescimento do coração.

Usando técnicas morfométricas, outros autores (ASTORRI, 1992; ADLER, 1971; VLIEGEN, 1988) chegaram a resultados semelhantes, também sugerindo a presença de hiperplasia em corações humanos adultos. Contudo, alguns autores, não confirmam a hipótese da hiperplasia dos cardiomiócitos. (WEARN, 1941; MOORE1980; HOSHINO, 1983)

A provável explicação para que ocorra hiperplasia na pressão ou sobrecarga de volume é que a pressão ou estiramento das fibras miocárdicas, parece ativar as células do miocárdio a sintetizarem ácidos nucléicos, proteínas e miosinas (ASTORRI, 1971; JANZ, 1980)

Assim, com base nesses estudos tentamos estabelecer uma correlação entre a área e o perímetro de cardiomiócitos nas áreas adjacentes ao infarto e nas áreas normais. Os cardiomiócitos das áreas infartadas, apresentaram áreas e perímetros maiores, muito embora não tenhamos detectado nenhuma mitose.

Influência da faixa etária e do gênero na hiperplasia dos cardiomiócitos:

Bergmann e colaboradores, em 2010, realizaram um importante trabalho sobre a correlação entre faixa-etária e hiperplasia de cardiomiócitos. O carbono-14 (^{14}C) de testes da bomba nuclear foi medido em DNA genômico de células do miocárdio, o que permite datar o nascimento retrospectivamente. As concentrações de ^{14}C na atmosfera permaneceram relativamente estáveis até a Guerra Fria, quando os testes da bomba nuclear aérea causaram um forte aumento. Embora as detonações tenham sido realizadas em um número limitado de locais, os montantes elevados de ^{14}C na atmosfera rapidamente nivelaram-se em todo o mundo. Após a proibição dos testes nucleares em 1963, as concentrações de ^{14}C caíram exponencialmente, não por causa do decaimento radioativo (meia-vida de 5.730 anos), mas pela difusão da atmosfera.

O Recém-criado ^{14}C atmosférico reage com o oxigênio para formar $^{14}\text{CO}_2$, que é incorporado pelas plantas através da fotossíntese. Os seres humanos adquirem então, a partir das plantas que comem e dos animais herbívoros, o carbono 14, cuja concentração intracelular passa a refletir a concentração de ^{14}C na atmosfera. Como o DNA é estável, depois que uma

célula passou por sua última divisão celular, a concentração de ^{14}C no DNA serve como um marcador para datar quando essa célula nasceu.

Assim, o carbono 14, nesse estudo, foi usado para, em cardiomiócitos, determinar a extensão da síntese de DNA pós-natal no coração humano. O DNA foi, então, extraído e concentrações de carbono 14 foram medidas por espectrometria de massa de acelerador. As datas de nascimento celular puderam ser inferidas através da determinação do momento em que a concentração de ^{14}C da amostra correspondia à concentração atmosférica. As concentrações de ^{14}C de todos os indivíduos nascidos em torno ou depois dos testes de bomba nuclear corresponderam às concentrações atmosféricas de vários anos após o nascimento dos sujeitos, indicando a síntese de DNA substancial pós-natal.

Ao analisar os indivíduos nascidos em diferentes épocas antes de 1955, é possível estabelecer a idade até à qual ocorre a síntese de DNA, ou se continua para além dessa idade. Em todos os casos estudados, nascidos até 22 anos antes do início dos testes da bomba nuclear, as concentrações de ^{14}C foram elevados em comparação aos níveis de antes dos testes de bomba nuclear. Assim, o DNA das células do miocárdio é sintetizado muitos anos após o nascimento, indicando que as células do coração humano se renovam na vida adulta.

Nesse estudo, portanto, verificou-se que os cardiomiócitos são renovados em uma taxa de 1% ao ano na idade de 25 e 0,45% na idade de 75. Com essa taxa de turnover, a maioria dos cardiomiócitos nunca vai ser trocadas durante um período de vida normal. Na idade de 50 anos, 55% dos cardiomiócitos permanecem desde o tempo em torno do nascimento e 45% foram gerados mais tarde.

Em nosso trabalho, a faixa etária dos paciente cujas amostras foram colhidas é bastante elevada e, conseqüentemente, a taxa de renovação é pequena e o número de cardiomiócitos presentes desde o nascimento menor, o que corrobora com os achados encontrados: houve um aumento da área e do perímetro dos cardiomiócitos mas não detectamos proliferação dos mesmos.

Quanto ao gênero, vale salientar que a perda de cardiomiócitos, caracteristicamente, ocorre em homens, enquanto que o número dos mesmos não é proporcionalmente reduzido em mulheres com idade comparável. (ANVERSA, 2002). Este defeito do crescimento telomérico que resulta em envelhecimento e morte celular, ocorre nas mulheres quase uma década mais tarde do que nos homens. Isso corrobora, em parte, os resultados de gênero e faixa etária em nosso estudo já que a maioria das amostras colhidas e selecionadas é de homens idosos, ou seja, com um maior grau de envelhecimento celular e, conseqüentemente, menor taxa de mitose.

Controvérsias sobre a proliferação de cardiomiócitos:

Com os avanços na tecnologia de rastreamento de linhagem, um estudo genético recente demonstrou que as células-tronco ou precursoras não contribuem significativamente para a formação de cardiomiócitos durante o envelhecimento normal até 1 ano no camundongo (WASH, 2010). Esse estudo, portanto, fornece fortes evidências de que cardiomiócitos em ratos se retiram do ciclo celular, logo após o nascimento e, portanto, não proliferam em condições normais. Para investigar a capacidade proliferativa dos cardiomiócitos, Walsh et al. realizou a purificação dos cardiomiócitos pela utilização de Troponina T, marcador altamente específico para cardiomiócitos.. Os autores, em seguida, extraíram os núcleos de células classificadas para medir o conteúdo de DNA, a fim de medir com precisão síntese de DNA dos cardiomiócitos, considerando a natureza binuclear de cardiomiócitos. A imunomarcagem com captação de BrdU ou Ki-67 mostrou três grupos de células: 1. cardiomiócitos embrionários com 12-23% de imunomarcagem; 2. cardiomiócitos no período neonatal com 1 a 8% de imunomarcagem 3. Cardiomiócitos adultos com resultados não detectáveis por 14 dias .

Esses resultados demonstraram um bloqueio completo da entrada do ciclo celular de G1 e fase S, indicando a retirada permanente dos cardiomiócitos adultos do ciclo celular. Houve também um desacoplamento importante da cariocinese e da citocinese com binucleação de até 98% entre o quinto dia e o oitavo dia pós-natal.

Entre os pontos fortes deste estudo são: 1. O uso de vários métodos para a detecção de ciclo celular, tais como imunohistoquímica envolvendo BrdU captação e anticorpos Ki-67; 2. A utilização da citometria de fluxo para uma melhor quantificação 3. A utilização de núcleos de cardiomiócitos isolados para a quantificação exata, uma vez que o percentual de alta cardiomiócitos de rato adulto são binucleados; 4. A utilização de células-cTnT positiva como um marcador cardíaco, que seleciona os cardiomiócitos diferenciados e elimina ou precursor de células-tronco que podem não expressar cTnT. Embora este estudo apóie a retirada definitiva dos cardiomiócitos pós-natais a partir do ciclo celular, o próximo passo seria investigar se este fenômeno é alterado em condições patológicas utilizando os mesmos métodos empregados no estudo atual.

Em contrapartida, Bergmann et al (2010), como citado acima, relataram que os cardiomiócitos são renovados com uma diminuição gradual de 1% anualmente, com diminuição progressiva até 0,45% na faixa etária de 75 . Assim, nesse trabalho, verificou-se que, na idade de 50 anos, 55% dos cardiomiócitos permanecem desde o tempo em torno do nascimento e 45% foram gerados mais tarde.

Outros estudos, já detalhados nessa dissertação, relataram a proliferação de cardiomiócitos em corações lesados (BELTRAMI, 2001) (ANVERSA, 2003). Vale salientar, contudo que, em estudos recentes (KIKUCHI, 2010) (JOPLING, 2010) feitos com peixes-zebra, verificou-se replicação de cardiomiócitos adultos em áreas seccionadas do coração de até 20%. Isso corrobora a possibilidade de potencial proliferação de cardiomiócitos em humanos, estando essas células, segundo os autores, em estado de “hibernação”, mas prontas para replicarem em casos de lesão cardíaca ou segundo estímulos químicos específicos. Assim, segundo essa teoria, espera-se encontrar quais desses estímulos poderiam induzir cardiomiócitos humanos a se comportarem de forma semelhante aos cardiomiócitos de peixes zebra.

Nossos resultados, fazendo parte desse espectro de trabalhos que traçam a polêmica sobre proliferação ou não de cardiomiócitos adultos em corações humanos mostraram evidências de que não houve replicação de cardiomiócitos em adultos, mesmo em corações infartados.

Variações metodológicas e do índice mitótico:

Na determinação do índice mitótico em pacientes com corações comprometidos por miocardiopatia dilatada e doença isquêmica (KAJSTURA, 1998), as amostras foram fixadas em formalina e embebidas em parafina, para em seguida serem coradas com iodeto de propídio e anticorpo actina alfa-sarcômero para visualização de DNA e estruturas miofibrilares. Cromossomos foram representados pela cor verde atribuída a fluorescência do iodeto de propídio e estruturas miofibrilares foram reconhecidos pela cor vermelha atribuído à fluorescência do anticorpo actina α -sarcoméricas.

Dos 27 pacientes submetidos a transplante cardíaco, 12 foram por isquemia e 15 por cardiomiopatia dilatada idiopática. O primeiro grupo incluiu 11 homens e uma mulher, com idade média de 52 ± 9 anos, e o segundo, 11 homens e quatro mulheres, com idade média de 55 ± 11 anos. Nove corações controle, sete homens e duas mulheres, com idade média de 48 ± 15 anos, foram coletadas na autópsia no prazo de 15 horas após a morte, a morte ocorreu por causas outras que não a doença cardiovascular.

No ventrículo esquerdo normal, uma média de 14 por milhão de cardiomiócitos foram submetidos a mitose, mas um índice muito maior de mitose foi medido nos corações patológicos. Na cardiomiopatia isquêmica, 152 milhões foram miócitos por divisão, e na cardiomiopatia dilatada, 131 milhões foram por miócitos em mitose. A pequena diferença

entre os dois grupos de pacientes com insuficiência cardíaca não foi significativa, gerando um valor médio de 140 proliferando miócitos por milhões de células. Em comparação com miocárdio, insuficiência cardíaca, foi caracterizada por um aumento de 10 vezes no número de dividir miócitos ($P < 0,0001$). Não houve diferença entre homens e mulheres neste estudo. (KAJSTURA, 1998)

Vale salientar que, nossa metodologia, em relação ao trabalho relatado acima, foi mais simples, pois, embora haja um n semelhante (22 corações), foi feita apenas a coloração por hematoxilina-eosina e a marcação por Ki-67. Não incluímos, pois, o anticorpo actina alfa-sarcômero nem a coloração por iodeto propídio. Trabalhamos, por uma questão de logística, unicamente com necropsia de corações infartados e, em nosso estudo não incluímos corações transplantados. Acreditamos que, essas diferenças metodológicas influenciaram nas divergências da determinação do índice mitótico entre o nosso estudo e o relatado acima.

No índice mitótico determinado no trabalho sobre corações infartados e proliferação de cardiomiócitos (BELTRAMI, 2001), os cortes histológicos foram corados com iodeto de propídio e anticorpos para actina α -sarcômero. Para a identificação dos fusos mitóticos, as amostras foram expostas a um anticorpo monoclonal antitubulina. Fluoresceína IgG conjugada com isotiocianato anti-camundongo foi utilizado como anticorpo secundário. Para a detecção do Ki-67, as amostras foram expostas durante uma hora a 37 ° C a um anticorpo monoclonal contra a Ki-67 (clone MIB-1, Diagnóstico Biosystems), diluído 1:40 em tampão fosfato saline. fluoresceína IgG conjugada com isotiocianato anti-camundongo foi novamente utilizado como anticorpo secundário. Posteriormente, as amostras foram processadas para microscopia confocal, e examinadas com um microscópio confocal (MRC-1000, Bio-Rad). O índice mitótico encontrado nesse estudo foi de 0,08% em áreas adjacentes ao infarto e 0,03% em áreas distantes.

O reconhecimento dos células tronco-cardíacas e suas progênes é tecnicamente complexo em ratos (BRADFUTE, 2003) (PFISTER, 2005), cães (LINKE, 2005), e coração humano (URBANEK, 2005). Estas categorias de células podem ser identificadas de forma isolada, em preparações de células cardíacas ou nas secções de miocárdio atrial e ventricular. Em todos os casos, isso é feito através da utilização de diversas misturas de anticorpos diretamente marcados com fluorocromos para evitar reações cruzadas inespecíficas (LINKE, 2005) (URBANEK, 2005). Além disso, microscopia confocal é necessária para atingir o nível de resolução apropriado. (KAJSTURA, 2005) Contrariamente à crença comum, a microscopia confocal é o único método que permite a medição quantitativa da frequência e distribuição das classes de CSC no miocárdio. (LERI, 2005). A análise de fluorescência de

classificação é extremamente eficiente na separação de células em categorias específicas de acordo com a expressão de um ou mais epitopos de superfície, (FERRERO, 1985) (ASKURA, 2002) mas a distinção entre as células de linhagem negativa e cometida exige a análise de proteínas nucleares e citoplasmáticas. Tudo isso só pode ser obtido pela fixação das células para torná-las permeáveis à detecção de componentes intracelulares (HARVEY, 1996) Problemas similares existem com imunomarcção. Com qualquer protocolo, a viabilidade celular é perdida, impossibilitando um estudo mais aprofundado.

Devido a exigüidade de recursos tecnológicos e financeiros, não utilizamos microscopia confocal nem anticorpos marcados com fluorocromos ou anticorpos anti-tubulina. Utilizamos uma metodologia mais simples com coloração por hematoxilina e eosina e coloração pelo Ki-67. verificamos que, provavelmente, essa metodologia não seja adequada para a determinação do índice mitótico de cardiomiócitos. Isso talvez explique porque proliferação de cardiomiócitos não foi verificada na maioria dos estudos do século passado. Futuros trabalhos que incluam os anticorpos citados acima e a microscopia confocal venham, talvez, a determinar índices mitóticos semelhantes aos trabalhos supracitados.

Proliferação de cardiomiócitos versus remodelação

Nos últimos anos, várias hipóteses foram levantadas para esclarecer os resultados da divisão de miócitos no coração normal e doente. Elas variam desde a existência de uma pequena classe de miócitos que se diferenciam e, posteriormente, proliferam a um subconjunto de células que mantêm a possibilidade de reentrar no ciclo celular e se multiplicar. (ANVERSA, 2006) Alternativamente, as células progenitoras da medula óssea podem migrar para o miocárdio, onde depois de transdiferenciação, levam à formação de uma progênie do cardiomiócito. No entanto, a busca pela origem da divisão de miócitos ainda não estava clara até que um compartimento de células-tronco residentes foi reconhecido no coração adulto (BEARZI, 2007). Essa informação mudou a interpretação da regeneração de cardiomiócitos e incrementou a compreensão acerca dos processos regulatórios envolvidos na homeostase cardíaca e reparo dos tecidos. Dados de um estudo pós-mortem feito em corações de pacientes que se trataram com timidina, produto radissensível que funcionou como marcador de proliferação de cardiomiócitos, indicam que um grande número de cardiomiócitos é formado a cada ano. (KAJSMURA, 2010)

As células-tronco residentes são limitados em sua capacidade de reconstituir o miocárdio necrótico, (URBANEK, 2005) e este fenômeno foi interpretado como prova da

incapacidade do coração para formar grandes quantidades de cardiomiócitos. (PARMACEK, 2009). Assim, a reserva de crescimento do coração não consegue restaurar a integridade estrutural do miocárdio após o infarto e a cura é associada com a formação de cicatrizes. Uma possível explicação para esta contradição (ROTA, 2005) é que células-tronco estão presentes em todo o infarto, mas morrem rapidamente por apoptose, seguindo o destino de miócitos. A regeneração dos miócitos é, pois, restrita à parte viável do coração..(BELTRAMI, 2001)

Um fenômeno semelhante ocorre em órgãos de auto-renovação, incluindo a pele, fígado, intestino e medula óssea. Em todos os casos, a oclusão de uma artéria leva à formação de cicatrizes que imita a enfermidade cardíaca. (LOPEZ, 1980) Isso ocorre, por exemplo na poliarterite nodosa onde microinfartos desenvolvem-se no intestino e na pele. Da mesma forma, na anemia falciforme, microinfartos aparecem na medula óssea e as células-tronco residentes não logram reparar os danos locais. (DANG, 2005) O compartimento de células progenitoras pode ser devidamente equipado para modular a homeostase do tecido, mas não respondem eficazmente a isquemia ou ao envelhecimento dos órgãos e tecidos. (SHARPLESS, 2007)

Em nosso estudo, como a maioria dos pacientes eram acima de 60 anos, o envelhecimento pode ter sido um fator importante para o predomínio da remodelação, com multiplicação de fibroblastos e não de cardiomiócitos. O processo isquêmico com provável apoptose de células tronco cardíacas também contribuiu para esse processo.

Perspectivas futuras:

A hipertrofia dos cardiomiócitos é devido à baixa quantidade de ativadores do ciclo celular que torna o coração incapaz de superar o bloqueio imposto por inibidores do ciclo celular. Cardiomiócitos podem ser estimulados para a divisão celular por aumento da expressão de ativadores como ciclina D2, a qual também inibe a hipertrofia dos mesmos. (BUSK, 2005). Outras estratégias bem sucedidas na estimulação de cardiomiócitos têm sido desenvolvidas no coração de ratos (URBANEK, 2005) e coração de cães (LINKE, 2005). A ativação local do fator de crescimento (insulina-like) de células-tronco-cardíacas do miocárdio pode curar ratos com infartos grandes, a longo prazo, levando a reconstituição da parede infartada do ventrículo esquerdo.(URBANEK, 2005)

Experiências com ratos transgênicos mostraram que a expressão de ciclina tipo selvagem desregulado D1 provoca um aumento no número de cardiomiócitos e síntese de DNA dos cardiomiócitos no coração adulto. (SOONPAA, 1997) (TAMAMORI, 2003)

Assim, uma série de substâncias ativadoras da proliferação de cardiomiócitos tem sido estudada e a possibilidade de regeneração miocárdica após o infarto agudo do miocárdio, ao invés da remodelação, vem se tornando maior a cada dia.

Conclusão

Apesar de não verificarmos evidências de proliferação de cardiomiócitos nas amostras colhidas de pacientes infartados, encontramos um aumento estatisticamente significante da área e do perímetro dos cardiomiócitos em área infartada comparando-se com a área normal.

Verificamos, contudo, que, conforme a metodologia que utilizamos, ou seja, a coloração com hematoxilina e eosina e a marcação com Ki-67, não encontramos evidências de proliferação de cardiomiócitos e, conseqüentemente, não foi possível determinar o índice mitótico. Vale salientar que as etapas da metodologia foram feitas criteriosamente, de forma organizada e por profissionais e laboratórios qualificados e as lâminas revisadas pelo patologista do serviço sendo, portanto, reduzida a possibilidade de erro metodológico. A ausência de determinação do índice mitótico deveu-se, assim, provavelmente à metodologia em si e não a erros metodológicos.

Fatores como faixa etária elevada das amostras selecionadas bem como o próprio processo isquêmico também provavelmente contribuíram para o predomínio da remodelação em relação à proliferação de cardiomiócitos. Vale salientar que, pelo fato das leis brasileiras só permitirem que o corpo seja mandado ao SVO com no mínimo 6 horas após o óbito, possa ter havido um certo grau de hemólise dificultando os resultados. Acreditamos que estudos futuros venham a elucidar as controvérsias que existem sobre a proliferação de cardiomiócitos e a determinação do índice de proliferação dos mesmos.

Referências

1. WEBER, K. T. Targeting pathological remodeling: Concepts of cardioprotection and reparation. *Circulation*, v. 102, p.1342-1345, 2000.
2. SCORSIN, M.; GUARITA-SOUZA, L. C. O transplante celular no tratamento da insuficiência cardíaca. *Rev Bras Cir Cardiovasc.*, v.16, n.3. p. 183-186, 2001.
3. ZAK, R. Development and proliferative capacity of cardiac Zazycki e Gomes 97
Revista Saúde e Pesquisa, v. 2, n. 1, p. 91-97, jan./abr. 2009 - ISSN 1983-1870
muscle cells. *Circ Res.*, v. 35, p. 17-26, 1974.
4. MAGALHÃES, F. C. et al. Hipertrofia cardíaca induzida pelo treinamento físico: eventos moleculares e celulares que modificam o fenótipo. *Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte*, v. 7, n. 1, p. 189-193, 2008.
5. DRIEHUYS, S.;VANwINKLE,T.J.; SAMMARCO, C.D.; DROBATZ, K.J. Myocardial infarction in dogs and cats: 37 cases (1985-1994). *Journal of American Veterinary Medical Association*, Schaumburg, v. 213, n. 10, p. 1444-1448, 1998.
6. BELTRAMI, A.P; URBANEK, K; KAJSTURA, J; YAN, S.M; FINATO, N;BUSSANI, R. **Evidence that human cardiac myocytes divide after infarction.***N Engl J Med*, 2001; 344: 1750-1757.
7. KAJSTURA, J; LERI, A; FINATO, N; DI LORETO, C; BELTRAMI, C.A; ANVERSA, P. **Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans.** *ProcNatl Acad Sci USA*, 1998; 95: 8801-8805.
8. ANVERSA, P; LERI, A; KAJSTURA, J; NADAL-GINARD, B. **Myocyte growth and cardiac repair.** *J Mol Cell Cardiol*, 2002; 34: 91-105
9. BELTRAMI, A.P; BARLUCHI, L; TORELLA, D; BAKER, M; CHIMENTI, S; KASAHARAH. **Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration.** *Cell*, 2003; 114: 763-776

10. 1. Brasil. Ministério da Saúde. DATASUS. **Indicadores de mortalidade [online].** Brasília; 2004. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2004/matriz.htm#mort>
11. MINISTÉRIO DA SAÚDE **Sistema de informações de mortalidade (SIM)** Disponível em <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2006/c08.def> acessado em 06/06/2008.
12. ANVERSA P, KAJSTURA J, LERI A, BOLLI R. **Life and death of cardiac stem cells: a paradigm shift in cardiac biology.** *Circulation*. 2006; 113: 1451–1463.
13. BEARZI C, ROTA M, HOSODA T, TILLMANN J, NASCIMBENE A, DE ANGELIS A, YASUZAWA-AMANO S, TROFIMOVA I, SIGGINS RW, CASCAPERA S, BELTRAMI AP, ZIAS E, QUAINI F, URBANEK K, MICHLER RE, BOLLI R, KAJSTURA J, LERI A, ANVERSA P. **Human cardiac stem cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104: 14068–14073 begin_of_the_skype_highlighting 14068–14073 end_of_the_skype_highlighting.
14. URBANEK K, TORELLA D, SHEIKH F, DE ANGELIS A, NURZYNSKA D, SILVESTRI F, BELTRAMI CA, BUSSANI R, BELTRAMI AP, QUAINI F, BOLLI R, LERI A, KAJSTURA J, ANVERSA P. **Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 12: 8692–8697
15. SHARPLESS NE, DEPINHO RA. **How stem cells age and why this makes us grow old.** *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8: 703–713.
16. PARMACEK MS, EPSTEIN JA. **Cardiomyocyte renewal.** *N Engl J Med*. 2009; 361: 86–88.
17. URBANEK K, ROTA M, CASCAPERA S, BEARZI C, NASCIMBENE A, DE ANGELIS A, HOSODA T, CHIMENTI S, BAKER M, LIMANA F, NURZYNSKA D, TORELLA D, ROTATORI F, RASTALDO R, MUSSO E, QUAINI F, LERI A, KAJSTURA J, ANVERSA P. **Cardiac stem cells possess growth factor-receptor systems that after activation regenerate the infarcted myocardium, improving ventricular function and long-term survival.** *Circ Res*. 2005; 97: 663–673.
18. LOPEZ LR, SCHOCKET AL, STANFORD RE, CLAMAN HN, KOHLER PF. **Gastrointestinal involvement in leukocytoclastic vasculitis and polyarteritis nodosa.** *J Rheumatol*. 1980; 7: 677–684.
19. DANG NC, JOHNSON C, ESLAMI-FARSANI M, HAYWOOD LJ. **Bone marrow embolism in sickle cell disease: a review.** *Am J Hematol*. 2005; 79: 61–67.
20. KAJSTURA, JAN; URBANEK, KONRAD; PERL, SHIRA; HOSODA, TORU; ZHENG, HANQIAO; OGOREK, BARBARA; FERREIRA-MARTINS, JOAO; GOICHBERG, POLINA; RONDON-CLAVO, CARLOS; SANADA, FUMIHIRO; D'AMARIO, DOMENICO; ROTA, MARCELLO; DEL MONTE, FEDERICA; ORLIC, DONALD;

- TISDALE, JOHN; LERI, ANNAROSA; ANVERSA, PIERO **Cardiomyogenesis in the Adult Human Heart**. *Clinical/Translational Research Circulation Research*. 107(2):305-315, July 23, 2010.
- 21.. OH H, BRADFUTE SB, GALLARDO TD, NAKAMURA T, GAUSSIN V, MISHINA Y, POCIUS J, MICHAEL LH, BEHRINGER RR, GARRY DJ, ENTMAN NL, SCHNEIDER MD. **Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction**. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100: 12313–12318
22. PFISTER O, MOUQUET F, JAIN M, SUMMER R, HELMES M, FINE A, COLUCCI WS, LIAO R. **CD31- but not CD31+ cardiac side population cells exhibit functional cardiomyogenic differentiation**. *Circ Res*. 2005; 97: 52–61.
23. LINKE A, MULLER P, NURZYNSKA D, CASARSA C, TORELLA D, NASCIMBENE A, CASTALDO C, CASCAPERA S, BOHM M, QUAINI F, URBANEK K, LERI A, HINTZE TH, KAJSTURA J, ANVERSA P. **Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function**. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102: 8966–8971.
24. LERI A, KAJSTURA J, ANVERSA P. **Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration**. *Physiol Rev*. 2005; 85: 1373–1416.
25. URBANEK K, QUAINI F, TASCA G, TORELLA D, CASTALDO C, NADALGINARD B, LERI A, KAJSTURA J, QUAINI E, ANVERSA P. **Intense myocyte formation from cardiac stem cells in human cardiac hypertrophy**. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100: 10440–10445.
- 26.. KAJSTURA J, ROTA M, WHANG B, CASCAPERA S, HOSODA T, BEARZI C, NURZYNSKA D, KASAHARA H, ZIAS E, BONAFE M, NADALGINARD B, TORELLA D, NASCIMBENE A, QUAINI F, URBANEK K, LERI A, ANVERSA P. **Bone marrow cells differentiate in cardiac cell lineages after infarction independently of cell fusion**. *Circ Res*. 2005; 96: 127–137.
27. FERRERO D, GABBIANELLI M. PESCHLE C, LANGE B, ROVERA G. **Surface phenotypes of human hemopoietic progenitor cells defined by monoclonal antibodies**. *Blood*. 1985; 66: 496–502.
28. ASKURA A, SEALE P, GIRGIS-GABARDO A, RUDNICKI MA. **Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle**. *J Cell Biol*. 2002; 159: 123–134.

29. HARVEY KA, SIDDIQUI RA, JANSEN J, AKARD LP, THOMPSON JM, CUI Y, CHANG Q, ENGLISH D. **Growth factor induction of cytosolic protein tyrosine kinase activity in human haemopoietic progenitor cells isolated by flow cytometry.** Br J Haematol. 1996; 93: 515–526.
30. NADAL-GINARD B, MAHDAVI V. **Molecular basis of cardiac performance.** J Clin Invest. 1989; 84: 1693–1700.
31. CHIEN KR. **Stem cells: lost in translation.** Nature. 2004; 428: 607–608.
32. CHIMENTI C, KAJSTURA J, TORELLA D, URBANEK K, HELENIAC H, COLUSSI C, DI MEGLIO F, NADAL-GINARD B, FRUSTACI A, LERI A, MASERI A, ANVERSA P. **Senescence and death of primitive cells and myocytes lead to premature cardiac aging and heart failure.** Circ Res. 2003; 93: 604–613.
33. GUERRA S, LERI A, WANG X, FINATO N, DI LORETO C, BELTRAMI CA, KAJSTURA J, ANVERSA P. **Myocyte death in the failing human heart is gender dependent.** Circ Res. 1999; 85: 856–866.
34. OLIVETTI G, ABBI R, QUAINI F, KAJSTURA J, CHENG W, NITAHARA JA, QUAINI E, DILORETO C, BELTRAMI CA, KRAJEWSKI S, REED JC, ANVERSA P. **Apoptosis in the failing human heart.** N Engl J Med. 1997; 336: 1131–1141.
35. URBICH C, DIMMELER S. **Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology.** Circ Res. 2004; 95: 343–353.
36. MORI A, HASHINO S, KOBAYASHI S, TANAKA J, YAMAMOTO Y, ASAKA M, IMAMURA M. **Avascular necrosis in the femoral head secondary to bone marrow infarction in a patient with graft-versus-host disease after unrelated bone marrow transplantation.** Ann Hematol. 2001; 80: 238–242
37. FRANQUE S, CONDAT B, ASSELAH T, VILGRAIN V, DURAND F, MOREAU R, VALLA D. **Multifactorial aetiology of hepatic infarction: a case report with literature review.** Eur J Gastroenterol Hepatol. 2004; 16: 411–415.

38. LEONG FT, FREEMAN LJ. **Acute renal infarction.** J R Soc Med. 2005; 98: 121–122.
39. BELTRAMI CA, FINATO N, ROCCO M, FERUGLIO GA, PURICELLI C, CIGOLA E, QUAINI F, SONNENBLICK EH, OLIVETTI G, ANVERSA P. **Structural basis of end-stage failure in ischemic cardiomyopathy in humans.** Circulation. 1994; 89: 151–163
40. ANVERSA P, OLIVETTI G. CELLULAR BASIS OF PHYSIOLOGICAL AND PATHOLOGICAL MYOCARDIAL GROWTH. IN: PAGE E, FOZZARD HA, SOLARO RJ, EDS. **Handbook of Physiology, Section 2: The Cardiovascular System: The Heart, Volume 1.** New York, NY: Oxford University Press; 2002: 75–144.
41. SOONPAA MH, KOH GY, PAJAK L, JING S, WANG H, FRANKLIN MT, KIM KK, FIELD LJ. **Cyclin D1 overexpression promotes cardiomyocyte DNA synthesis and multinucleation in transgenic mice.** J Clin Invest. 1997; 99: 2644–2654.
42. MIMI TAMAMORI-ADACHI, HIROSHI ITO, PIYAMAS SUMREJKANACHANAKIJ, SUSUMU ADACHI, MICHIAKI HIROE, MASATO SHIMIZU, JUNYA KAWAUCHI, MAKOTO SUNAMORI, FUMIAKI MARUMO, SHIGETAKA KITAJIMA, MASA-AKI IKEDA **Critical Role of Cyclin D1 Nuclear Import in Cardiomyocyte Proliferation** Circulation Research. 2003;92:e12-e19 published online before print December 2, 2002
43. BUSK PK, HINRICHSSEN R, BARTKOVA J, HANSEN AH, CHRISTOFFERSEN TE, BARTEK J, HAUNS S. **Cyclin D2 induces proliferation of cardiac myocytes and represses hypertrophy.**Exp Cell Res. 2005 Mar 10;304(1):149-61. Epub 2004 Dec 10.
44. LINKE A, MULLER P, NURZYNSKA D, CASARSA C, TORELLA D, NASCIMBENE A, CASTALDO C, CASCAPERA S, BOHM M, QUAINI F, URBANEK K, LERI A, HINTZE TH, KAJSTURA J, ANVERSA P. **Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2005; 102: 8966–8971
45. SOONPAA MH, FIELD LJ. **Survey of studies examining mammalian cardiomyocyte DNA synthesis.** Circ Res. 1998; 83: 15–26.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Há, atualmente, uma importante polêmica sobre a existência ou não de proliferação de cardiomiócitos adultos em corações humanos e nosso estudo mostrou evidências de que não houve replicação de cardiomiócitos em adultos, mesmo em corações infartados.

O envelhecimento pode ter sido um fator importante para o predomínio da remodelação, com multiplicação de fibroblastos e não de cardiomiócitos, já que a maioria dos pacientes por nós estudados possuíam mais de 60 anos..

A apoptose de células tronco cardíacas devido ao processo isquêmico também pode ter contribuído para a ausência de mitose de cardiomiócitos em nossos resultados..

Segundo verificamos, a metodologia com coloração por hematoxilina e eosina e coloração pelo Ki-67, provavelmente não seria adequada para a determinação do índice mitótico de cardiomiócitos. Isso talvez explique porque a proliferação de cardiomiócitos não foi verificada na maioria dos estudos do milênio passado. Futuros trabalhos que incluam outros recursos técnicos e metodológicos venham, talvez, a reproduzir os índices mitóticos já estudados em outros países.

Apesar de infartos do miocárdio não se regenerarem espontaneamente, os mecanismos endógenos de reparo do coração podem ser manipulados e explorados para alcançar este objetivo. Assim, no início deste terceiro milênio, uma série de estudos vem nos elucidar como estimular as células-tronco residentes no coração e/ou inibir o processo de remodelação no infarto agudo do miocárdio trazendo, assim, novas esperanças na terapia celular nesta enfermidade.

6 REFERÊNCIAS

1. BELTRAMI, A.P; URBANEK, K; KAJUSTURA, J; YAN, S.M; FINATO, N;BUSSANI, R. **Evidence that human cardiac myocytes divide after infarction.**N Engl J Med, 2001; 344: 1750-1757.
2. KAJUSTURA, J; LERI, A; FINATO, N; DI LORETO, C; BELTRAMI, C.A; ANVERSA, P. **Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans.** ProcNatl Acad Sci USA, 1998; 95: 8801-8805.
3. ANVERSA, P; LERI, A; KAJSTURA, J; NADAL-GINARD, B. **Myocyte growth and cardiac repair.** J Mol Cell Cardiol, 2002; 34: 91-105
- 4 BELTRAMI, A.P; BARLUCHI, L; TORELLA, D; BAKER, M; CHIMENTI, S; KASAHARAH. **Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration.** Cell, 2003; 114: 763-776
5. OYAMA, R; KAWASAKI S; BERTELLI, E; PAVARINO, C; ABBUD, M; FILHO, B; DOMINGO, M; BERTOLLO, E; M. GOLONI, M. **Cardiomioplastia celular** Arq Ciênc Saúde 2004 out-dez;11(4):266-71
6. YUN, CHAO; YAN, IRENE. Divisão de trabalho entre as células. Diferenciação in JUNQUEIRA, LUIZ C; CARNEIRO, JOSÉ **Biologia Celular e Molecular** 8a Ed. Rio de Janeiro - RJ. Ed: Guanabara Koogan 2005 cap 11 pag 218-228;
7. FERNANDES, M, R; PERIN; EMERSON, C. **Regeneração cardíaca. Coração: um órgão pós-mitótico?** Rev Bras Cardiol Invas 2007; 15 (1): 61 – 69
8. URBANEK, K; TORELLA, D; SHEIKH, F; DE ANGELIS, A. **Miocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure** Proc Natl Acad Sci U S A ; 102 (24): 8692-7, 2005 Jun 14,

9. ANVERSA, P; KAJSTURA, J. **Ventricular Myocytes Are Not Terminally differentiated in the Adult Mammalian Heart** . American Heart Association 1998; 83:1-14

10. KEHAT, I; KENYANGIN-KARSENTI, D; SNIR, M; SEGEV, H; AMIT, M;GEPSTEIN ,A. **Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes**. J Clin Invest, 2001; 108: 407-14.

11. MIN, J.Y; YANG, Y; SULLIVAN, M.F; KE, Q; CONVERSO, K.L;CHEN, Y; E **Long term improvement of cardiac function in rats after infarction by transplantation of embrionic ítem cells**. J Thorac Cardiovasc Surg, 2003; 125: 361-9.

12. TAYLOR, D.A. **Cell-based myocardial repair: How should we proceed?** Int J Cardiol, 2004; 95 (suppl 1): S-8-12.

13. CHACHQUE, J.C; ACAR, C; HERREROS, J; TRAININI, J.C; PROSPER, F; D'ATTELIS, N. **Cellular cardiomyoplasty: clinical application**. Ann Thorac Surg, 2004; 77: 1121-30.

14. MOUQUET, F, PFISTER O, JAIN, M, OIKONOEROPOULOS, A, NGOY, S, SUMMER, R. **Restoration of cardiac progenitor cells after myocardial infarction by self-proliferation and selective homing of bone marrow-derived stem cells**. Circ Res 2005;97:1090-2.

15. PERIN, EC, DOHMANN, H.F; BOROJEVIC, R; SILVA, S.A; SOUSA, A.L; MESQUITA, C.T. **Transendocardial, autologous bonemarrow cell transplantation for severe, chronic ischemicheart failure**. Circulation 2003;107:2294-302.

16. PERIN, E.C; DOHMANN, H.F; BOROJEVIC, R; SILVA, S.A; SOUSA, A.L; SILVA, G.V. **Improved exercise capacity and ischemia 6 and 12 months after transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic cardiomyopathy**. Circulation 2004;110(11 Suppl 1):II213-8.

17. CHEN, S.L; FANG, W.W; YE, F; LIU, Y.H; OIAN, J; SHAN, SJ ET AL. **Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction.** Am J Cardiol 2004;94:92-5.

18. TERADA, N; HAMAZAKI, T; OKA, M; HOKI, M, MASTALERZ, DM; NAKANO, Y ET AL. **Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion.** Nature, 2002; 416: 542-5.

19. LEE MS, LILL M, MAKKAR RR. **Stem cell transplantation in myocardial infarction.** Rev Cardiovasc Med, 2004; 5: 82-98.

20. RAJNOCH, C; CHACHQUES, J.C; BERREBI, A; BRUNEVAL, P; BENOIT, M.O; CARPENTER, A. **Cellular therapy reverses myocardial dysfunction.** J Thorac Cardiovasc Surg, 2001; 121: 871-8.

21. KEHAT, I; KENYANGIN-KARSENTI, D; SNIR, M; SEGEV, H; AMIT,; GEPSTEIN A, ET AL. **Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes.** J Clin Invest, 2001; 108: 407-14.

22. HIRATA, Y; SATA, M; MOTOMURA, N; TAKANASHI, M; SUEMATSU, Y; ONO, M ET AL. **Human umbilical cord blood cells improve cardiac function after myocardial infarction.** Biochem Biophys Res Comm, 2005; 327: 609-14.

23. FILHO, R. G; **Cardiomioplastia Celular : Momento atual.** Revista da SOCERJ - Mar/Abr 2006 109

24. MINAMI, E; LAFLAMME, M. A; SAFFITZ, J.E; MURRAY, C.E; **Extracardiac progenitor cells repopulate most major cell types in the transplanted human heart.** Circulation 2005; 112: 2951 – 8

25. DAWN, B; BOLLI, R; **Cardiac progenitor cells: the revolution continues.** Circ Res 2005; 97: 1080-2
26. GINARD, B.N; KAJSTURA J; ANVERSA P; LERI, A; **A matter of life and death: cardiac myocyte apoptosis and regeneration** J. Clin. Invest. 111 (10): 1457-1459 (2003)
27. KAO, RL; CHIU, R.C; **Cellular cardiomyoplasty: myocardial repair with cell implantation.** New York: Landes Bioscience and Chapman & Hall Publisheres; 1997 p. 1 – 194
28. CHIU, R.C; **Terapeutic cardiac angiogenesis and myogenesis: the promises and challenges on a new frontier.** J Thorac Cardiovasc Surg 2001; 122:851-2
29. SUTTON, M.G.S; SHARPE, N; **Left ventricular remodeling after myocardial infarction - pathophysiology and therapy.** Circulation 2000; 101: 2981-8.
30. OLIVETTI, G;RICCI, R;ANVERSA, P; **Hyperplasia of myocyte nuclei in long-term cardiac hyperplasy in rats.** J.Clin. Invest 1987; 80: 1818-1821
31. URBANEK, K; QUAINI, F; TASCA, G ; TORELLA, D; CASTALDO, C;NADALGINARD, B; LERI, A; KAJSTURA, J; QUAINI, E; ANVERSA, P; **Intense myocyte formation from cardiac stem cells in human cardiac hypertrophy** PNAS 2003; vol. 100,no. 18, pag 10440-10445
32. MINISTÉRIO DA SAÚDE **Sistema de informações de mortalidade (SIM)** Disponível em <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2006/c08.def> acessado em 06/06/2008.
33. 16. Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, et al. **Myoblast transplantation for heart failure.** Lancet. 2001; Vol357, pag: 279-280.
34. 17. PORTAL SAÚDE. Células-tronco: Brasil realiza maior estudo do mundo com 1.200 pacientes. 2005. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/noticias_detalhe.cfm?co_seq_noticia=13034> Acesso em: 20 out 2008.

35. 5. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kosterling M, Hernandez A, Sorg RV, et al. **Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans.** *Circulation*. 2002;106(15):1913-8.
36. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A. **Intracoronary infusion of bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: a randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter trial (REPAIR-AMI).** *Circulation*. 2005;112:3362.
37. . Janssens S, Dubois C, Bogaert J, Theunissen K, Deroose C, Desmet W, et al. **Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial.** *Lancet*. 2006;367(9505):113-21.
38. Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, Steffens J, Lippolt P, Fichtner S, et al. **Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (Bone marrOw transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial.** *Circulation*. 2006;113(10):1272-94.
39. Chen SL, Fang WW, Ye F, Liu YH, Qian J, Shan SJ, et al. **Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction.** *Am J Cardiol*. 2004;94(1):92-5.
40. Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T, et al. **Intracoronary injections of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction.** *N Engl J Med* 2006;355(12):1199-209.
41. . VULLIET PR, GREELEY M, HALLORAN SM, MACDONALD KA, KITTLESOM MD. **Intra-coronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs.** *Lancet*. 2004;363(9411): 783-4.
42. . Cibelli JB, GRANT KA, CHAPMAN KB, CUNNIFF K, WORST T, GREEN HL, ET AL. **Parthenogenetic stem cells in nonhuman primates.** *Science*. 2002;295(5556):819.
43. FRANCA STEDILE ANGELI, EDIE MELLO DE OLIVEIRA **Terapia Celular no Tratamento do Infarto Agudo do Miocárdio** *Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva* Vol. 15 nº 2 - Junho de 2007 Artigo de Revisão Páginas 145 a 150

44. ZORNOFF L, OKOSHI M, PAIVA S, INOUE R, MATSUBARA L **Acute myocardial infarction: pathophysiology, diagnosis, and treatment** Revista Brasileira de Medicina, 2009 pág 235-240
45. . HOCKMAN JS, BULKLEY BH. **Expansion of acute myocardial infarction: an experimental study.** Circulation. 1982; 65: 1446-50.
46. . PFEFFER JM, PFEFFER MA, BRAUNWALD E. **Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left ventricle of the rat.** Circ Res. 1985; 57: 84-95.
47. PFEFFER MA, BRAUNWALD E. **Ventricular remodeling after myocardial infarction: experimental observations and clinical implications.** Circulation. 1990; 81: 1161-72.
48. COHN JN, FERRARI R, SHARPE N. **Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling.** J Am Coll Cardiol. 2000; 35: 569-82.
49. . FRANCIS GS. **Pathophysiology of chronic heart failure.** Am J Med. 2001; 110: 37S-46S.
50. MATSUBARA BB, ZORNOFF LAM. **Matriz colágena intersticial e sua relação com a expansão miocárdica no infarto agudo.** Arq Bras Cardiol. 1995; 64: 559-63.
51. SCHOLZEN T, GERDES J (2000). "A proteína Ki-67: do sabido e do desconhecido". J. Pilha. Physiol. 182 (3): 311–22.
52. VASCONCELOS, A. **Patologia Geral em Hipertexto.** Universidade Federal de Minas Gerais. < <http://www.icb.ufmg.br/pat/pat/old/classif.htm> >

APÊNDICE A

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA
MESTRADO EM PATOLOGIA
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome do responsável legal: _____.

Natureza (grau de parentesco, tutor, curador etc.) _____.

Data de nascimento: ____/____/____

Endereço: _____ N°._____.

Apto.:_____ Bairro:_____ Cidade _____

CEP:_____ Telefone:() _____

Pesquisa

HÁ PROLIFERAÇÃO DE CARDIOMIÓCITOS NO INFARTO?

Pesquisador: Fernando Antônio Neves

Orientador: Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

Coorientador: Prof. Dr. Luciano Montenegro

Objetivo

Você está sendo convidado(a) a permitir a participação do falecido nesta pesquisa que tem o objetivo de estudar a possível multiplicação de células cardíacas após o infarto agudo do miocárdio recente.

Participação

Sua participação nessa autorização de se utilizar dados de necropsia do falecido é totalmente voluntária, ou seja, você tem o direito de recusá-la a qualquer momento, sem que isso lhe cause qualquer prejuízo.

Procedimentos

Essa pesquisa utilizará dados da necrópsia do coração para avaliar o índice de proliferação miocárdica.

Riscos e desconforto

Não houve nenhum risco nesse estudo, uma vez que o óbito já se verificou.

Benefícios

Não haverá benefício direto ao participar deste estudo, porém as informações fornecidas poderão contribuir para o avanço da ciência no campo da cardiologia e da patologia.

Custos

Não haverá nenhum custo na participação deste estudo.