

ISOLAMENTO, CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS DERIVADAS DE CARDIOESFERAS DE CAMUNDONGOS CD1

ISOLATION, CULTURE AND CHARACTERIZATION OF CARDIOSPHERES-DERIVED CELLS FROM CD1 MICE

Poliana Rodrigues ALVES¹; Susana Kelly de ABREU²; Débora Bastos MELLO²;
Tais Hanae KASAI BRUNSWICK²; Lucas Vogt COTA¹; Débora Ribeiro CHAGAS¹;
Adriana Bastos CARVALHO³; Elmiro Santos RESENDE⁴

1. Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina - FAMED, Universidade Federal de Uberlândia - UFU, Uberlândia, MG, Brasil, rodriguespoliana@yahoo.com.br; 2. Doutoranda em Fisiologia do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - IBCCF, Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ, RJ, Brasil; 3. Professora, Doutora, IBCCF-UFRJ, RJ, Brasil; 4. Professor, Doutor, FAMED - UFU, Uberlândia, MG, Brasil.

RESUMO: No Brasil, como em todo o mundo, as doenças cardiovasculares têm sido uma das principais causas de morte. A alta mortalidade e as poucas alternativas terapêuticas para esta doença têm estimulado a investigação no campo das células estaminais. Recentemente, alguns grupos têm mostrado a presença de células-tronco/progenitoras residentes no coração. Estas poderiam ser cultivadas diretamente a partir de tecidos cardíacos produzindo aglomerados esféricos denominados Cardioesferas estas, contém células proliferativas que dão origem, após o plaqueamento, a uma população heterogênea denominada: células derivadas de cardioesferas (CDCs). O objetivo deste estudo foi isolar, cultivar e caracterizar as CDCs de camundongos da linhagem CD1. Para isto, as células primárias foram isoladas a partir de corações de camundongos adultos da linhagem CD1 após a digestão de pequenos fragmentos do órgão em 420U/ml utilizando colagenase tipo II por 20 minutos 37°C. Nas análises por Citometria de Fluxo (FACS) foram observadas baixa expressão das moléculas de CD19 (0,4%), CD45 (0,5%) e CD90 (4,77%), e alta expressão das moléculas CD73 (71,47%), CD105 (25,1%), CD14 (25,17%). Nos ensaios de imunofluorescência foi possível observar a expressão das proteínas no citoplasma dos cardiomiócitos: vimentina, desmina e alfa actina de músculo liso, além da expressão do filamento intermediário nestina. Ao analisar a expansão celular por *population doubling time* foi observado que as CDCs duplicaram sua população original em cerca de 1,8 dias. Estes resultados sugerem que as CDCs isoladas a partir de camundongos da linhagem CD1, são células que apresentam características de células mesenquimais, constituindo uma população celular a ser testada nos estudos em terapias celulares. Estes resultados, motiva a estabelecer protocolos mais efetivos a fim de investigar possíveis efeitos parácrinos benéficos, bem como o potencial angiogênico e cardiogênico destas células.

PALAVRAS-CHAVE: CDCs. Células tronco cardíacas. Caracterização.

INTRODUÇÃO

No Brasil, assim como no resto do mundo, as doenças cardiovasculares (DCV) são importantes causas de morte. Em 2007, por exemplo, ocorreram 308.466 óbitos em decorrência de doenças do aparelho circulatório. Além disso, as DCV são responsáveis pela alta frequência de internações, ocasionando elevados custos médicos e socioeconômicos (SBC, 2010).

Apesar dos avanços notáveis no tratamento da doença coronariana, quase um terço dos pacientes que sobrevivem a um infarto do miocárdio (IAM) desenvolvem insuficiência cardíaca no prazo de cinco anos (VELAGALETI, et al.; 2008). A alta mortalidade e as poucas alternativas terapêuticas para esta doença têm levado a pesquisas com células progenitoras para o coração, incluindo ensaios clínicos com células derivadas da medula óssea (ASSMUS et al.; 2002; SHACHINGER et al.; 2006).

Mais recentemente, diversos grupos demonstraram, de forma independente, a presença de células-tronco residentes no coração, que podem gerar novos cardiomiócitos. Esta descoberta tem despertado grande interesse visando futuras aplicações clínicas. Entretanto, as células-tronco cardíacas existem em pequenas quantidades *in vivo* e seu isolamento e expansão *ex vivo* constituem um desafio para seu uso clínico (JOHNSTON et al.; 2009).

Células-tronco derivadas de múltiplas fontes têm sido utilizadas na tentativa de se promover um remodelamento cardíaco favorável. As células progenitoras residentes cardíacas são particularmente promissoras, uma vez que apresenta capacidade intrínseca de promover cardiogênese e angiogênese, tanto através da regeneração direta do tecido cardíaco quanto, indiretamente, através de efeitos parácrinos que permitem o recrutamento de progenitores endógenos (LI et al.; 2010).

Um dos grupos de progenitores cardíacos já isolados são as células derivadas de cardioesferas (CDC). Estas são células que expressam marcadores tipicamente mesenquimais e um grau variável de marcadores de progenitoras. Estas células, quando injetadas no coração, podem melhorar a função cardíaca e, se confirmado em estudos clínicos, poderá constituir uma nova modalidade terapêutica no tratamento das miocardiopatias em geral (JOHNSTON et al.; 2009). O objetivo deste estudo foi isolar, cultivar e caracterizar células derivadas de cardioesferas de camundongos da linhagem CD1.

MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo foram utilizados camundongos da linhagem CD1 fornecidos pelo biotério local vinculado ao Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada entre 22°C e 24°C e ciclo claro/escuro de 12 horas. Foram respeitadas as normas recomendadas pelo Comitê de Uso de Animais do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (Protocolo - IBCCF 006) e pelo Comitê de Ética Animal (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (Protocolo 24/2011).

Obtenção das células do tecido cardíaco

Camundongos da linhagem CD1 entre 8 e 12 semanas de vida foram utilizados para extração das células do coração. Os animais foram anestesiados com isoflurano (VET ONE, Boise, Estados Unidos) e posteriormente sacrificados por deslocamento cervical. O protocolo de isolamento foi realizado como descrito previamente (BELTRAMI et al.; 2003) com algumas modificações. Os corações foram retirados com auxílio de pinça e tesoura e lavados com solução tampão de fosfato (PBS) para retirar o excesso de sangue. Em seguida, átrios e ventrículos foram cortados em pequenos pedaços denominados explantes, de aproximadamente 1 mm³. Estes foram colocados em Erlenmeyers juntamente com uma solução contendo colagenase tipo II na concentração de 420U/ml (Worthington, Lakewood) em meio HAM's F12 (LGC Biotecnologia, Rio de Janeiro).

Os Erlenmeyers foram vedados cuidadosamente e submetidos a quatro ciclos de cinco minutos cada de digestão enzimática a 37°C, sob leve agitação. Ao fim de cada ciclo, a suspensão celular foi coletada e centrifugada a 300g durante 5 minutos à 4°C. O sedimento celular foi ressuspenso em meio nutritivo para posterior plaqueamento bem

como os explantes remanescentes do processo de digestão enzimática.

Obtenção das células aderentes e formação das cardioesferas

Após a digestão enzimática, os explantes remanescentes e os sobrenadantes foram plaqueados separadamente em placas de poliestireno de 100 mm (Falcon 353003, Becton Dickson and Company), contendo meio HAM's F12 (@Gibco, Grand Island, NY) acrescido de 10% de soro fetal bovino (@Gibco, Grand Island, NY), 1% de penicilina e estreptomicina (@Gibco, Grand Island, NY), 10 ng/ml de fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF – @Peprotech), 0,005 unidades/ml de eritropoietina (@Sigma-Aldrich) e 10ng/ml de fator inibitório de leucemia (Recombinant murine LIF, @Millipore). As células foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera úmida em presença de 5% de CO₂.

Após três dias, o meio de cultura foi trocado parcialmente e as células não aderentes removidas da cultura. Aproximadamente uma semana após o plaqueamento, as células começaram a se desprender dos explantes e aderir ao frasco de cultura formando uma monocamada. Sobre as células que formavam a monocamada migraram espontaneamente pequenos grupos de células arredondadas denominadas “*phase-bright cells*” (células brilhantes). Nas placas onde foram plaqueadas a suspensão celular do sobrenadante, uma população aderente também foi observada, bem como as “*phase-bright cells*”.

Para a formação das cardioesferas, primeiramente as “*phase-bright cells*” foram coletadas cuidadosamente das placas de cultura utilizando uma solução tampão de fosfato (PBS). Em seguida, a suspensão celular foi centrifugada a 300xg. O sobrenadante contendo PBS foi descartado e o sedimento celular contendo as “*phase-bright cells*” transferidos para placas de cultura de 35 mm tratadas com Poly 2- hidroyethylmethacrylate (Poly-Hema-@Sigma) a fim de impedir a aderência das células e possibilitar a formação das cardioesferas.

Três dias após a formação das cardioesferas na placa de cultura não aderente, as mesmas foram transferidas para uma nova placa de cultura de poliestireno de 100 mm onde permaneceram aderidas e expandiram, formando as células derivadas de cardioesferas (CDCs). A partir deste ponto, o meio de cultura foi trocado a cada três dias, sendo realizada a passagem enzimática com tripsina 0,05% (@Sigma). Os resultados deste trabalho foram obtidos entre a terceira e quarta passagens.

Citometria de fluxo

A citometria de fluxo foi realizada para caracterizar imunofenotipicamente a população de CDCs sendo incubadas com anticorpos específicos da linhagem hematopoiética, mesenquimais e de células progenitoras.

Para tanto, as células foram retiradas da placa de cultura utilizando-se uma solução de dissociação não enzimática (®Sigma) com o objetivo de preservar suas moléculas de superfície. A seguir, 10^5 CDCs foram incubadas por 30 minutos a 4°C na diluição de 1:30 contendo os seguintes anticorpos primários: anti-CD90 conjugado à fluoresceína de isotiocianato (FITC), anti-CD73 conjugado à ficoeritrina (PE) para identificação de células mesenquimais, anti-CD45 conjugado à alofococianina (APC Cy7), anti-CD19 conjugado à FITC, anti-CD14 conjugado à PE para identificação de células hematopoiéticas e anti-CD105 conjugado à 4'-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) para identificação de células progenitoras.

As amostras foram lavadas uma vez com PBS e os dados foram adquiridos utilizando o citômetro de fluxo BD FACS ARIAM (®BD Biosciences, San Diego) e analisados através do software FlowJo (®BD Biosciences, San Diego). Os anticorpos contra os mesmos isotipos associados a cada molécula analisada foram utilizados nas mesmas concentrações de cada anticorpo específico analisado.

Caracterizações por Imunofluorescência

A expressão de proteínas citoplasmáticas foram estudadas por imunofluorescência. Para esse ensaio, as CDCs foram cultivadas sobre lamínulas em placas de 24 poços (®BD Falcon, San Diego). O meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas uma vez com PBS e fixadas com paraformaldeído a 4%. A seguir, elas foram permeabilizadas com uma solução de Triton X-100 0,01% e incubadas com uma solução de soro de cabra a 10% em temperatura ambiente por 1 hora para bloquear os sítios inespecíficos.

Os anticorpos primários foram encubados durante a noite (overnight) a 4°C em câmara úmida. No dia seguinte, as placas foram lavadas três vezes com PBS e incubadas com o anticorpo secundário conjugado a um fluorocromo por 1 hora em temperatura ambiente, também em câmara úmida.

A marcação nuclear foi feita utilizando DAPI durante 5 minutos e as lamínulas foram colocadas sobre as células em lâminas utilizando solução de Vectashield (®Vector Laboratories). As proteínas estudadas foram: vimentina (1:100; mouse-monoclonal, Sigma®), α actina de músculo

liso (1:200; mouse-monoclonal, Abcam®), desmina (1:200; mouse-monoclonal, ®Sigma) e nestina (1:100; mouse-monoclonal, ®Abcam). A presença dessas proteínas foi verificada pela observação da marcação em microscópio de epifluorescência (®Zeiss Imager. M2) acoplado ao sistema apotome.

Ensaio de *population doubling time* (PDT)

Foram cultivadas em placas de culturas 2x 10^5 CDCs que contém quadriculados com 4mm^2 de área em triplicata. A quantidade de células foi somada de quatro quadrantes escolhidos aleatoriamente, processo este realizado diariamente até a cultura atingir um estágio de monocamada confluenta. Para assim se obter um gráfico com a quantidade média de células por unidade de área por cada dia de experimento.

O tempo que a população original levou para dobrar sua quantidade (PDT) foi obtida pelo cálculo inverso do coeficiente angular da reta obtida por meio da transformada deste gráfico para escala de \log_2 .

RESULTADOS

Cultura de células do tecido cardíaco e formação das cardioesferas

A Figura 1 mostra campo representativo de culturas de células derivadas dos explantes cardíacos de camundongos da linhagem CD1. Uma semana após plaqueamento inicial, pequenas células aderentes, com aspecto fibroblastóide, migram do explante.

Aproximadamente dez dias após o plaqueamento inicial, pequenas células brilhantes, as *phase bright cells*, são observadas sobre a monocamada aderente. Estas são coletadas para a formação das cardioesferas (Figura 2).

Com o intuito de formar as cardioesferas, tal como descrito por Messina *et al.*, (2004), as *phase bright cells* foram coletadas e transferidas para placas não aderentes. Aproximadamente três dias após o plaqueamento, foi possível observar os aglomerados celulares ou cardioesferas (Figura 3).

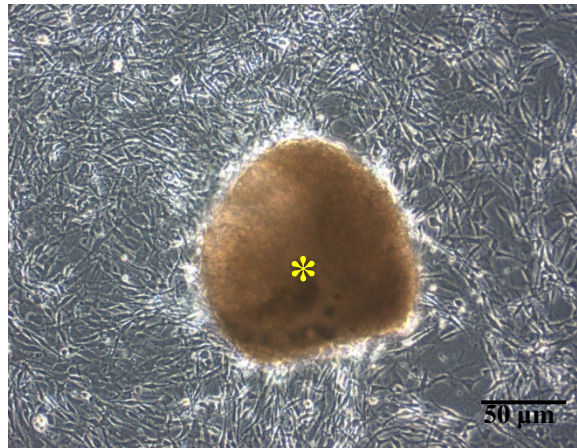


Figura 1. Aspecto morfológico das células derivadas do tecido cardíaco. Pequenas células migram a partir de explante cardíaco (*) uma semana após plaqueamento. Imagem representativa registrada utilizando o microscópio invertido Olympus modelo CKX41.

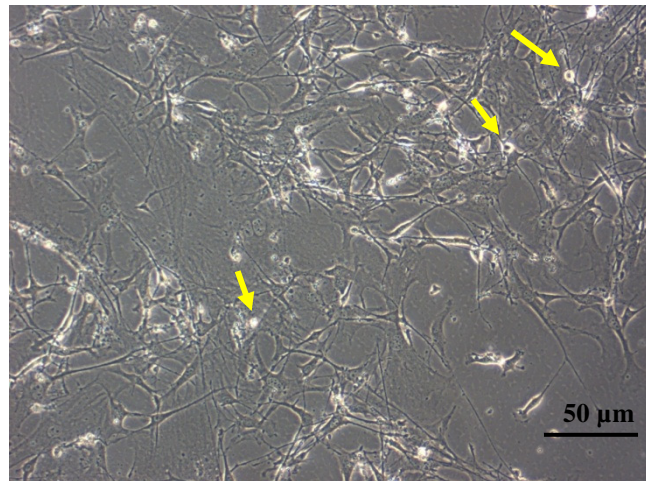


Figura 2. Aspecto morfológico das *Phase bright cells*: Pequenas células brilhosas (setas em amarelo) sobre a monocamada aderente 10 dias após plaqueamento. Imagem representativa registrada utilizando o microscópio invertido Olympus modelo CKX41.



Figura 3. Aspecto morfológico das cardiosferas: após três dias de cultivo em placas de culturas de 35 mm não-aderentes, as “*phase bright cells*” formam aglomerados celulares denominados cardiosferas. Imagem representativa registrada utilizando o microscópio invertido Olympus modelo CKX41.

Obtenção das células derivadas das cardioesferas (CDCs)

Dada a importância da avaliação da eficiência do método de isolamento e expansão direcionado para a linhagem estudada (DAVIS *et al.*, 2009), a próxima etapa do presente experimento foi a obtenção das células derivadas de cardioesferas (CDCs).

Após a formação das cardioesferas (Figura 3), as mesmas foram transferidas para placas não tratadas, para permitir a aderência celular. Três dias após o plaqueamento, pequenas células aderentes migram das cardioesferas dando origem às células derivadas de cardioesferas (CDCs - Figura 4).

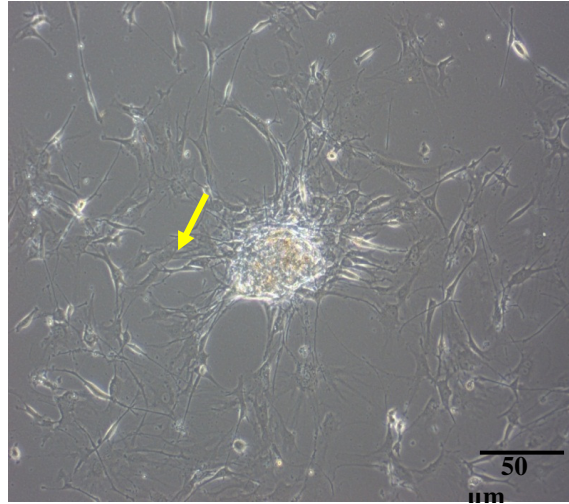


Figura 4. Aspecto morfológico das células derivadas de cardioesferas (CDCs): três dias após plaqueamento das cardioesferas em placas aderentes, células migram das cardioesferas dando origem às CDCs (seta em amarelo). Imagem representativa registrada utilizando o microscópio invertido Olympus modelo CKX41.

As células derivadas das cardioesferas foram mantidas em cultura para expansão. Todos os ensaios para a caracterização foram realizados entre a terceira e a quarta passagem.

Population DoublingTime

O ensaio *population doubling time*, foi realizado para avaliar a taxa de duplicação da população original. Foram analisadas três amostras. O *population doubling time* foi obtido ao calcular o inverso do coeficiente angular da reta por meio da transformação deste gráfico para escala de \log_2 .

A quantidade de células observadas em quatro quadrantes escolhidos aleatoriamente foi contada diariamente. No sexto dia, quando a cultura atingiu um estágio de monocamada confluenta, a contagem foi finalizada. Campos representativos relacionando os dias pós-plaqueamento com a densidade celular observada estão demonstrados na Figura 5.

Concluída a contagem, obteve-se uma quantidade média de células por unidade de área, durante cada dia do experimento. Os resultados

estão demonstrados no gráfico com curva exponencial positiva (Figura 6). O tempo em que a população de células original levou para dobrar seu tamanho (*population doubling time*) foi de 1,8 dias (Figura 7).

Caracterização das CDCs por citometria de fluxo

Com o intuito de investigar e quantificar, com precisão, o percentual da expressão de moléculas que caracterizam as células mesenquimais, hematopoiéticas e progenitoras, três amostras diferentes de CDCs foram estudadas por citometria de fluxo.

Nas amostras de CDCs analisadas, observou-se baixa expressão das moléculas CD19 (0,4%), CD45 (0,5%) e CD90 (4,77%) e uma elevada expressão das moléculas CD73 (71,47%). As moléculas CD105 (25,1%) e CD14 (25,17%) também foram observadas nas CDCs. A viabilidade celular foi de 98,5%. As moléculas de superfície observadas nas CDCs estão representadas na Figura 8.

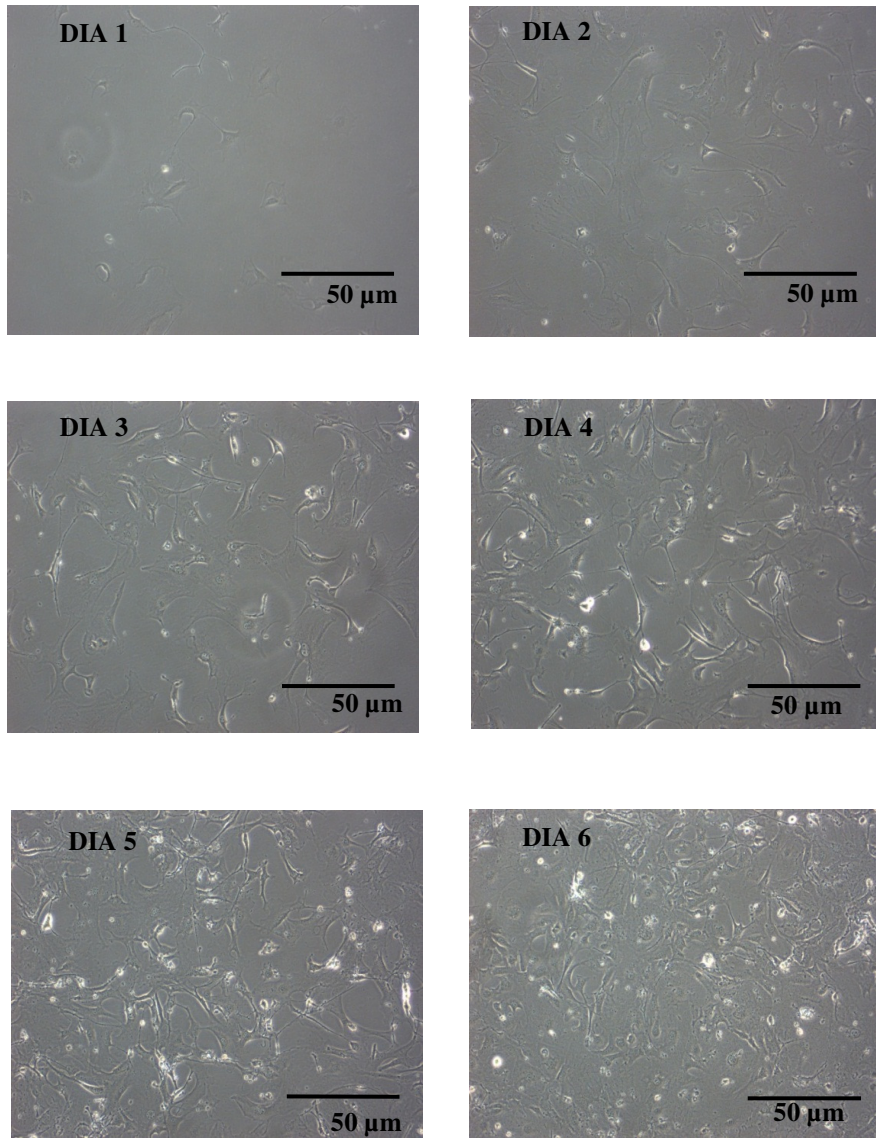


Figura 5. Campos representativos relacionando os dias pós-plaqueamento com a densidade celular.

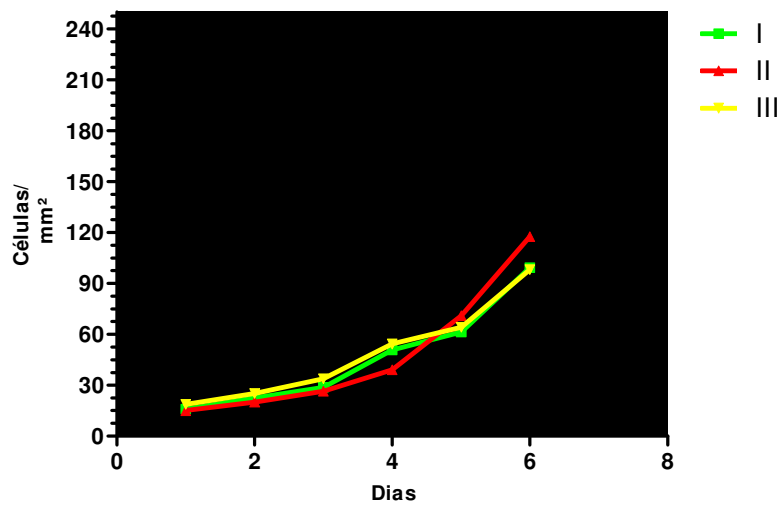


Figura 6. Curva exponencial positiva representando a quantidade de CDCs contadas por mm^2 e relacionada aos dias de ensaio do *population doubling time*.

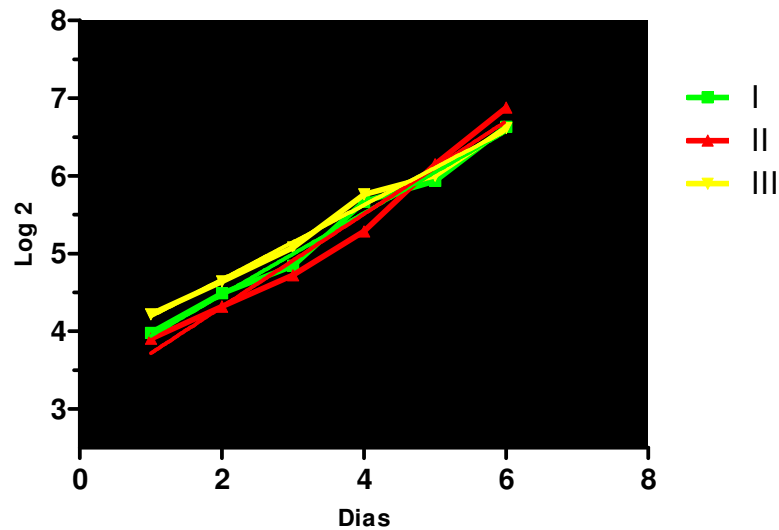


Figura 7. Tempo que a população de células levou para dobrar de tamanho (PDT) e obtido ao calcular o inverso do coeficiente angular da reta por meio da transformação em escala de log2.

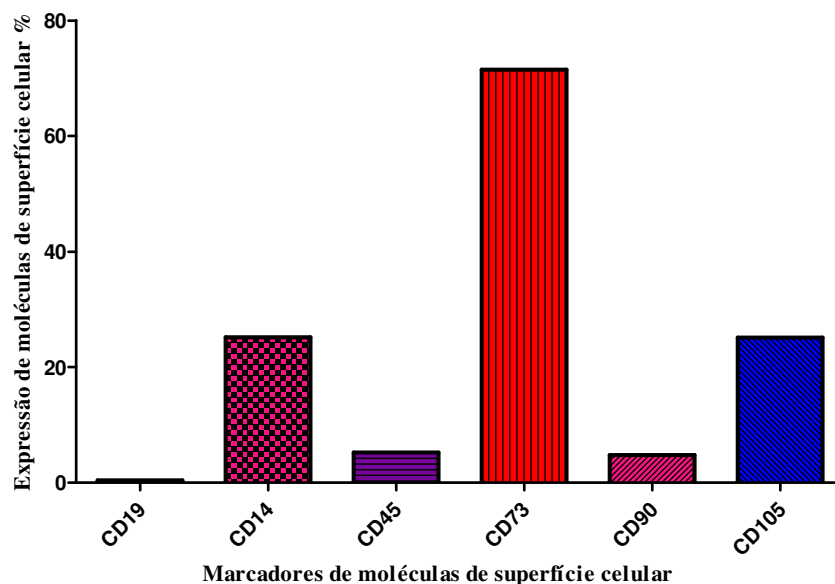


Figura 8. Caracterização por citometria de fluxo das células derivadas de cardioesferas (CDCs) de camundongos da linhagem CD1. Comparação da expressão das moléculas de superfície nas CDCs.

A Figura 9 mostra os *dot plots* representativos de uma das amostras analisadas de CDCs onde se pode observar a alta expressão da molécula CD73. Além disso, a expressão de CD 90, uma molécula amplamente observada em células cardíacas murinas, teve uma baixa expressão nas CDCs analisadas, possivelmente uma característica relacionada à linhagem de camundongos estudada, CD1

Caracterização por imunofluorescência

Para avaliar a presença de proteínas citoplasmáticas, as CDCs foram plaqueadas em lamínulas para os ensaios de imunofluorescência.

A expressão das proteínas α -actina de músculo liso (Figura 10) e desmina (Figura 11) foram detectadas nas CDCs analisadas. Além disso, a nestina, uma proteína citoplasmática conhecida por ser um marcador específico de células progenitoras neurais, foi observada nas células derivadas de cardioesferas de camundongos CD1 (Figura 12). A presença de vimentina (Figura 13) também foi observada nas CDCs.

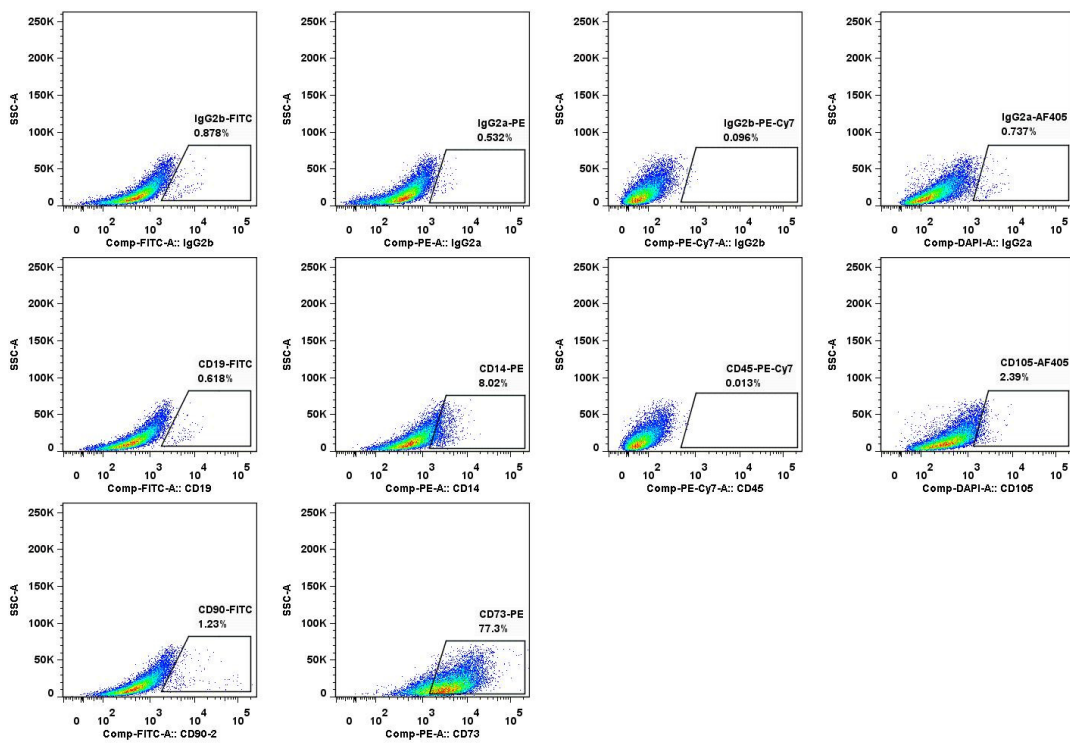


Figura 9. Caracterização por citometria de fluxo das células derivadas das cardioesferas (CDCs). *Dot plots* representativos de uma das amostras analisadas mostrando a intensidade de fluorescência dos canais associados a cada anticorpo e/ou isotipo, no eixo X, e da granulosidade (SSC) no eixo Y.

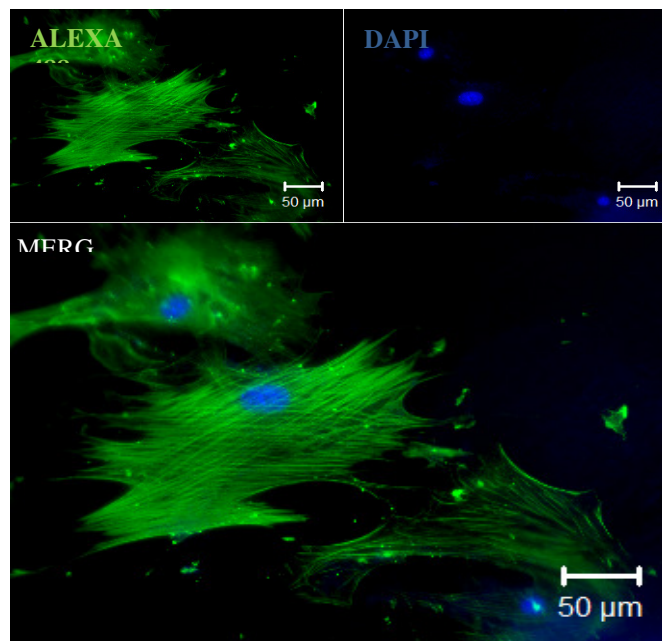


Figura 10. Células derivadas de cardioesferas mostrando a expressão da proteína de filamento intermediário tipo III α -actina de músculo liso. Imagem representativa adquirida utilizando microscópio de epifluorescência (Zeiss Imager. M2) acoplado ao sistema apotome

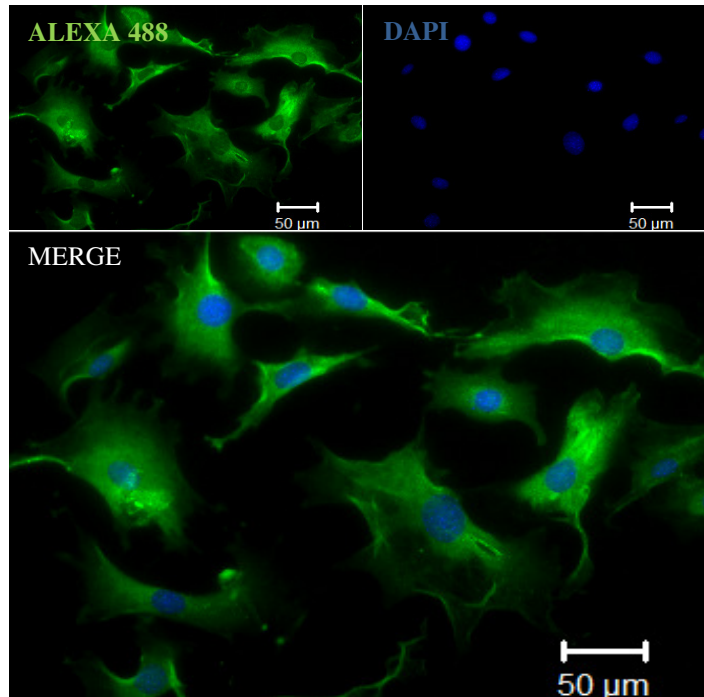


Figura 11. Células derivadas de cardioesferas mostrando que expressão da proteína de filamento intermediário tipo III **desmina**. Imagem representativa adquirida utilizando microscópio de epifluorescência (@Zeiss Imager. M2) acoplado ao sistema apotome.

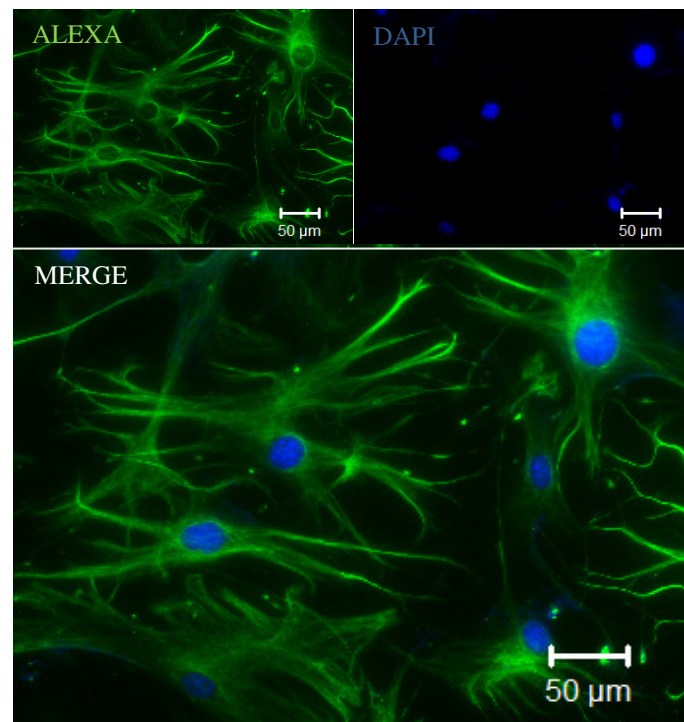


Figura 12. Células derivadas de cardioesferas mostrando a expressão da proteína de filamento intermediário tipo IV **nestina**, característica de células progenitoras neurais. Imagem representativa adquirida utilizando microscópio de epifluorescência (@Zeiss Imager. M2) acoplado ao sistema apotome.

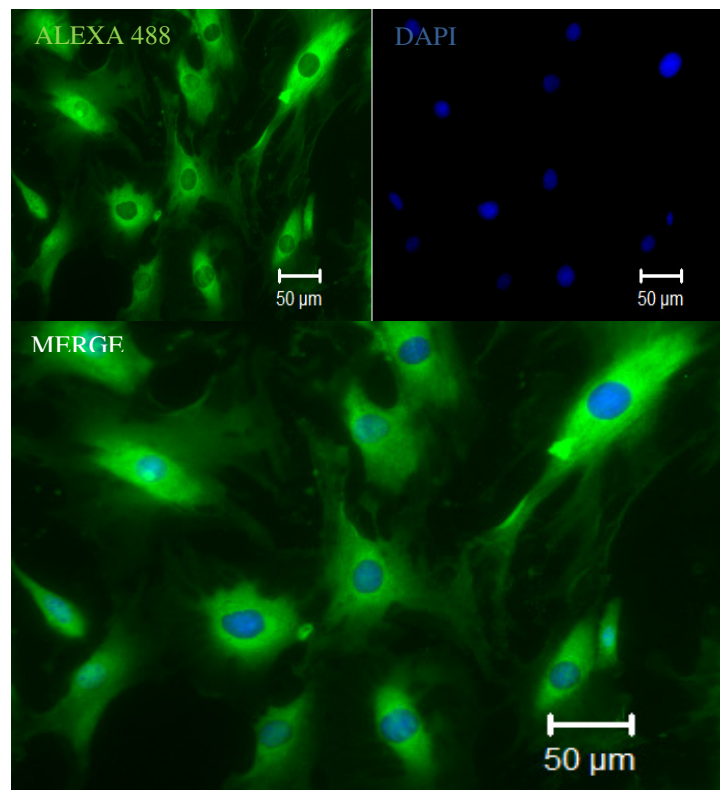


Figura 13. Células derivadas de cardioesferas mostrando que expressão da proteína de filamento intermediário tipo III **vimentina**. Imagem representativa adquirida utilizando microscópio de epifluorescência (®Zeiss Imager. M2) acoplado ao sistema apotome.

DISCUSSÃO

O modelo utilizado no presente estudo permitiu o isolamento, cultivo e caracterização das CDCs. O isolamento de células derivadas de cardioesferas (CDCs) a partir de corações de camundongos da linhagem CD1 foi conseguido de forma relativamente simples utilizando o método previamente descrito.

Este processo de isolamento das CDCs foi reproduzido utilizando as técnicas descritas na literatura pelos grupos de: Davis et al. (2009); Messina et al. (2004) e Smith et al. (2007).

Ao estudar a expressão das moléculas de superfície utilizando citometria de fluxo, a viabilidade celular foi de 98,5% e evidenciou baixa expressão das moléculas hematopoiéticas CD19 (0,4%) e CD45 (0,5%) e aumento nas expressões das moléculas mesenquimais CD73 (71,47%) e CD105 (25,1%). Davis et al. (2009) também encontraram este mesmo padrão de expressão, no presente estudo obteve-se baixa expressão das moléculas CD90 de marcação mesenquimal. Este resultado não era esperado, porém pode ser justificado por ser uma especificidade da linhagem

murina estudada. Estas pequenas variações nas expressões moleculares também está de acordo com a literatura já descrita (MARBÁN et al., 2012).

No ensaio de imunofenotipagem, as marcações citoplasmáticas típicas de cardiomiócitos foram observadas. As CDCs foram marcadas para alfa actina de músculo liso, nestina, vimentina e desmina. Chan et al.,(2012) também encontraram estas marcações em CDCs humanas, confirmando nossos resultados.

E por último, o ensaio de quantificação da expansão celular o PDT, após o plaqueamento de 2.10^5 células/ml e realização de registro durante seis dias, mostrou que as CDCs, originalmente plaqueadas, necessitam de 1,8 dias para duplicar sua população inicial.

CONCLUSÕES

A técnica de isolamento e cultivo foi realizada de forma simples e eficaz, com boa recuperação celular.

A caracterização das células de coração obtidas sugere que as CDCs isoladas a partir camundongos da linhagem CD1 apresentam, no

momento da análise realizada, um fenótipo mesenquimal e seu potencial terapêutico no reparo cardíaco deve ser testado.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Uberlândia (UFU), ao Programa de Pós-Graduação em Ciências

da Saúde (PGCS-UFU), ao Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro pelo apoio técnico científico, e aos órgãos de fomento FAPEMIG e CNPq.

ABSTRACT: In Brazil, as elsewhere in the world, cardiovascular diseases have been a major cause of death. The high mortality and few therapeutic alternatives for this disease have stimulated research in the field of stem cells. Recently, some groups have shown the presence of stem cells residents at heart. These could be grown directly from tissue cardiac producing spherical agglomerates called cardiospheres these contains proliferating cells that give rise after plating, a heterogeneous population named: cells derived from cardiospheres (CDC). Our goal in this study was to isolate and characterize the cultivar CDC CD1 strain of mice. For this purpose, primary cells were isolated from hearts of adult mice of the CD1 strain after digestion of the organ into small fragments using 420U/ml collagenase type II for 20 minutes 37 ° C. In analysis by Flow Cytometry (FACS) were observed low expression of CD19 molecules (0.4%), CD45 (0.5%) and CD90 (4.77%), and high expression of the molecules CD73 (71.47%), CD105 (25.1%), CD14 (25.17%). In the immunofluorescence assays was possible to observe the expression of the proteins in the cytoplasm of cardiomyocytes: vimentin, desmin and smooth muscle alpha actin, and expression of the intermediate filament nestin. By analyzing the cellular expansion team for Population doubling was observed that the original CDC doubled its population in about 1.8 days. These results suggest that CDCs isolated from CD1 mouse strain to be have characteristics of mesenchymal cells, constituting a potential population studied in cellular therapies, motivating us to establish more effective protocols to investigate possible beneficial paracrine effects and their angiogenic and cardiogenic potential.

KEYWORDS: CDCs. Cardiac stem cells. Characterization.

REFERÊNCIAS

ANDERSEN, D. C.; ANDERSEN, P.; SCHNEIDER, M. et al. Murine “Cardiospheres” Are Not a Source of Stem Cells with Cardiomyogenic Potential. **Stem Cell**, Ohio, v. 27, n. 7, p. 1571–81, Jul 2009.

ASSMUS, B.; SCHÄCHINGER, V.; TEUPE, C.; et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). **Circulation**, US, v. 106, n. 24, p. 3009–3017, Dec 2002.

BEARZI, C.; ROTA, M.; HOSODA, T. et al. Human cardiac stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, NY, v. 104, p. 14068 - 14073, Aug 2007.

BELTRAMI, A.P.; BARLUCCHI, L.; TORELLA, D.; et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. **Cell**, NY, v. 114, p. 763–776, Sep 2003.

CHAN, H. H.; MEHER HOMJI Z.; GOMES RS.; et al. Human cardiosphere-derived cells from patients with chronic ischaemic heart disease can be routinely expanded from atrial but not epicardial ventricular biopsies. **Journal of cardiovascular translational research**, v. 5, n. 5, p. 678-87, Oct 2012.

DAVIS, D. R.; ZHANG, Y.; SMITH, R. R et al. Validation of the cardiosphere method to culture cardiac progenitor cells from myocardial tissue. **PLoS One**, San Francisco, v. 4, n. 9, Sep. 2009.

JOHNSTON, P.V.; SASANO, T.; MILLS, K.; et al. Engraftment, Differentiation, and Functional Benefits of Autologous Cardiosphere Derived Cells in Porcine Ischemic Cardiomyopathy. **Circulation**, Baltimore, v. 120, n. 12, p. 1075-1083, Sep 2009.

LI, T. S.; CHENG, K.; LEE, S. T. et al. Cardiospheres Recapitulate a Niche-Like Microenvironment Rich in Stemness and Cell-Matrix Interactions, Rationalizing their Enhanced Functional Potency for Myocardial Repair. **Stem Cells**, Dayton, v. 28, n. 11, p. 2088-98, Nov 2010.

MARBÁN, E.; CINGOLANI, E. Heart to heart: cardiospheres for myocardial regeneration. **Heart Rhythm**, NY, v. 9, n.10, p. 1727-31, Oct 2012.

MESSINA, E.; ANGELIS, L.; FRATI, G. et al. Isolation and Expansion of Adult Cardiac Stem Cells From Human and Murine heart. **Circulation Research**, London, v. 95, n. 9, p. 911-921, Oct 2004.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, São Paulo, v. 95, n. 1, sup. 1, p. 1-51, 2010.

SCHÄCHINGER, V.; ERBS, S.; ELSÄSSER, A. et al. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. **New England of Journal Medicine**, Boston, v. 355, n. 12, p. 1210 –1221, Sep 2006.

SMITH, R.R.; BARILE, L.; CHO, H.C. et al. Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens. **Circulation**, Dallas, v.115, n. 7, p. 896 –908, Feb 2007.

VELAGALETI, R. S.; PENCINA, M. J.; MURABITO, J. M. et al. Long-term trends in the incidence of heart failure after myocardial infarction. **Circulation**, Dallas, v. 118, n. 20, p. 2057-62, Nov 2008.