



CURSO DE BACHARELADO EM BIOMEDICINA

LETÍCIA CANDIDO MARTINS DE SOUZA

**CÉLULAS-TRONCO NA TERAPIA DE REGENERAÇÃO
CARDÍACA**

Apucarana

2024

LETÍCIA CANDIDO MARTINS DE SOUZA

**CÉLULAS-TRONCO NA TERAPIA DE REGENERAÇÃO
CARDÍACA.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Biomedicina da Faculdade de Apucarana – FAP, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina com nota final igual a _____, conferida pela Banca Examinadora formada pelos professores:

COMISSÃO EXAMINADORA

Profº Me. Vinícius Lopes da Silva
Faculdade de Apucarana

Profª Dra. Cássia Calixto de Campos
Faculdade de Apucarana

Profº Esp. Luciano César Ferreira
Faculdade de Apucarana

Apucarana, ____ de _____ de
2024.

**Apucarana
2024**

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Osvaldo e Alzira, que, com amor e sacrifício, me ensinaram a lutar incansavelmente pelos meus sonhos e a nunca desistir. Vocês sempre estarão ao meu lado, apoiando cada passo da minha jornada. Sou profundamente grata por me mostrarem o verdadeiro significado de coragem e persistência.

À minha irmã Juliana, que sempre foi meu suporte e fonte de inspiração. Obrigada por me fazer rir nos momentos em que eu só queria chorar; sua presença é um presente inestimável.

Ao meu cunhado Alessandro, por ter sido meu motorista particular nesses 4 anos de graduação, me apoiando em todos os momentos, valeu demais.

Aos amigos que iluminaram meu caminho com risos e incentivo; sem vocês, a jornada teria sido muito mais desafiadora.

E ao meu professor orientador, Me. Vinicius Lopes da Silva, cuja orientação e sabedoria foram faróis que guiaram meus passos nesse trabalho. Agradeço por cada sugestão valiosa que não apenas moldou este trabalho, mas também ampliou minha visão como estudante e pesquisadora.

Cada um de vocês é parte essencial desta conquista, e sou eternamente grata por terem acreditado em mim.

*“Queremos ter certezas e não
dúvidas, resultados e não
experiências, mas nem
mesmo percebemos que as
certezas só podem surgir
através das dúvidas e os
resultados somente através
das experiências. “*

Carl Jung

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Fatores de transcrição na pluripotência celular	17
FIGURA 2- Esquema sobre terapia com células-tronco:	23
FIGURA 3- Redução cicatricial em modelo suíno	34

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Comparação de métodos de utilização de células-tronco

32

SUMÁRIO

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	8
1.1 REGENERAÇÃO CARDÍACA	8
1.2 O que são Células-Tronco?	9
1.3 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO:	11
1.4 FATORES DE TRANSCRIÇÃO:	13
1.4.1 Oct4	14
1.4.2 Sox2	14
1.4.3 Klf4	15
1.4.4 C-MyC	15
1.4.5 Nanog	16
1.5 COMO CONSERVAR AS CÉLULAS-TRONCO PARA USOS FUTUROS?	17
1. 1.5 O que são células-tronco autólogas?	19
1.5.2 Regeneração Tecidual	20
1.6 células-tronco na regeneração de tecido cardíaco pós infarto	22
1.5.4 Métodos imuno magnéticos: Lin - e C-kit+	27
1.6 Ensaio sobre a terapia celular na regeneração cardíaca:	28
1.6.1 Caduceu	28
1.6.2 SCIPPIO	29
1.6.3 FOCUS-CCDRN	30
1.6.4 ALCADIA	31
1.6.5 MSC-HF	32
REFERÊNCIAS:	35
ARTIGO	41
ANEXOS	52

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 REGENERAÇÃO CARDÍACA

A regeneração cardíaca tem sido um dos maiores desafios na medicina cardiovascular, especialmente para pacientes com insuficiência cardíaca e outras doenças cardíacas crônicas (BVSMS). A capacidade limitada do coração para se regenerar após danos ou infarto tem impulsionado a busca por novas abordagens terapêuticas que possam restaurar a função cardíaca e melhorar a qualidade de vida dos pacientes (Bergman 2009).

Nesse contexto, a terapia com células-tronco têm emergido como uma promessa significativa, as células-tronco são células primárias que possuem a capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares, imunomodulação e de se auto renovar, oferecendo um potencial único para a regeneração tecidual (Caplan, 1991).

Existem diferentes tipos de células-tronco, incluindo as células-tronco embrionárias pluripotentes e as células-tronco adultas, como as células-tronco mesenquimais, estas células podem ser isoladas de várias fontes, como a medula óssea, o tecido adiposo e o sangue do cordão umbilical (Backer e Carpenter (2023).

As células-tronco pluripotentes induzidas, sendo modificadas geneticamente por fatores de transcrição conhecidos como fatores Yamanaka (Yamanaka, 2007). Essas células quando produzidas em larga escala podem e são congeladas pelo método de criopreservação, que é uma técnica de congelamento rápido utilizando nitrogênio líquido (Silva et. al 2017).

A regeneração tecidual é o processo pelo qual o tecido danificado ou perdido é substituído por novo tecido. É uma função vital do organismo para a recuperação após lesões, isso ocorre quando o tecido danificado é quase completamente substituído por tecido novo que é idêntico ao original, sendo comum em tecidos com alta capacidade regenerativa, como a pele e o fígado (Fontes et. al 2021).

Nem todo tecido tem essa capacidade, o que acaba formando cicatrizes no local da lesão ou perda da função do local, já que sua capacidade regenerativa é muito baixa como o músculo cardíaco e o tecido nervoso (Kamal et.al 2022). No caso da regeneração cardíaca, o objetivo é utilizar essas células para substituir células cardíacas danificadas, promover a formação de novos vasos sanguíneos

(angiogênese) e reduzir a formação de tecido cicatricial, auxiliando na fração de ejeção (Fontes et. al 2021).

A pesquisa sobre a aplicação de células-tronco na regeneração cardíaca tem avançado de forma considerável, mostrando resultados promissores em modelos experimentais primeiramente em animais e em humanos como veremos neste trabalho em estudos clínicos iniciais (Bolli et al 2011; Perin et. al 2003). Esses estudos têm demonstrado que a administração de células-tronco pode melhorar a função cardíaca, aumentar a fração de ejeção do coração e reduzir biomarcadores associados a danos cardíacos (Mathiassen et. al 2015). No entanto, ainda há desafios significativos a serem superados, como a baixa sobrevivência celular, a variabilidade nos resultados por conta do número reduzidos de pacientes utilizados nas pesquisas e a necessidade de garantir a segurança e eficácia a longo prazo sem ocorrer danos maiores a outras patologias que possam estar associadas.(Perin et. al 2003; Mathiassen et.al 2015)

1.2 O que são Células-Tronco?

As células-tronco induzidas são células adultas encontradas em vários tecidos do corpo como a medula óssea, sangue, tecido adiposo, e as células“jovens” encontrados em tecidos neonatais como placenta e o cordão umbilical, com capacidade de se diferenciar em vários tipos de tecidos e de células mesenquimais como osteócitos, condrócitos e adipócitos (Barker, RA; Carpenter, M. 2023).

Às custas da capacidade da imunomodulação, células presentes em organismos multipotentes de forma ilimitada. Elas são fundamentais para o desenvolvimento, crescimento e reparo dos organismos multicelulares (Caplan,1991). Desde sua descoberta no final da década de 1960 pelo pesquisador A. Friedenstein (1968) as explorações acerca dessas células vem crescendo. Por conta de sua capacidade de cultivação baseadas em certos estímulos específicos e formando linhagens de células, permitem que estas se adaptem ao microambiente tecidual do hospedeiro (tecido que a célula será enxertada) (Backer RA; carpenter M, et.al 2023).

Segundo os estudos de Caplan (1991), um dos pais da células-tronco mesenquimais (que deu o nome “células-tronco mesenquimais”), estas células

contribuem para três mecanismos principais: as de diferenciação direta, que permite que a célula se transformem em células específicas, secreção de fatores parácrinos, que estimula a proliferação e diferenciação das células endógenas com o transformador beta, e modulação do microambiente. Com sua capacidade imunomoduladora já descrita por Backer e Carpenter (2023), essas células ajudam a controlar a resposta inflamatória dessa lesão, facilitando a regeneração tecidual

As CT's podem ser utilizadas na medicina diante de estudos conforme sua diferenciação: as células-tronco adultas para reconstrução de tecidos como doenças cardíacas, na regeneração de neurônios para tratamento de alzheimer e parkinson, e as células-tronco embrionárias para doenças de cunho genético. (BVSMS, 2008)

Além dessas diferenciações em células específicas, as células-tronco promovem a criação de células endógenas através da liberação de fatores de crescimento e citocinas (fator derivado de plaquetas, fator de transcrição e fator de crescimento transformador-beta)(Caplan 1991). Essas células também tem a capacidade de modular respostas imunes do organismo, auxiliando na inflamação e na redução de danos nos tecidos, reduzindo a liberação de citocinas inflamatórias, diminuindo a atividade dos linfócitos T e as NK (natural killer), tornando a terapia com células-tronco efetivas na reconstituição de tecidos (RODRÍGUEZ-FUENTES, et al 2021).

As células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) são células somáticas reprogramadas para um estado pluripotente pela introdução de fatores de transcrição específicos. Esta tecnologia, desenvolvida por Shinya Yamanaka em 2006, tem revolucionado a biotecnologia e a medicina regenerativa. Tendo grande expectativas para o futuro com o uso de células-tronco mesenquimais, que vem sendo uma ferramenta poderosa com os acontecimentos na engenharia de tecidos, focado nas técnicas de cultivo e enxerto, espera-se que essas células se tornem essencial e mais acessíveis na medicina regenerativa e na biotecnologia. Além de estudarem mais formas de como obter células-tronco mesenquimais com a reprogramação e o uso dos fatores de transcrição, oferecendo no futuro, uma fonte ilimitada de usos terapêuticos com essas células na medicina regenerativa (Takahashi; Yamanaka, 2006).

As células somáticas (retiradas de tecidos adultos como, tecido epitelial, Medula óssea, sangue periférico...) são isoladas e introduzidas os fatores de transcrição conhecidos como os Fatores de S. Yamanaka (Yamanaka 2006) no

genoma dessas células, expressando esses fatores de transcrição, levando as células somáticas a um estado de pluripotência. essas células se proliferam gerando colônias e se tornando células-tronco, estando pronta para estudos e aplicações na medicina regenerativa e doenças crônicas, sendo esse último uma inovação na área de doenças neurodegenerativas (alzheimer e Parkinson). Outra linha citada por da Silva e Martins (2015) que as células-tronco podem atuar é na pesquisa e investigação de como algumas patologias se desenvolvem dentro de uma célula, testando possibilidades de prevenção, proliferação e fármacos para combatê-la, reduzindo assim testes em animais e cobaias humanas. Um dos poucos erros que podem acontecer com os testes em células-tronco é ocorrer formação de tumores por causa da pluripotência e sua multiplicação (proliferação) criando tumores ou mutações (Da silva; Martins 2015).

No Brasil temos a rede nacional de terapia celular (www.rntc.org.br) que concentra o esforço de laboratórios na pesquisa e utilização de terapias utilizando células-tronco.

1.3 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO:

Como dito anteriormente, as Células-tronco mesenquimais são derivadas de alguns tecidos, como a medula óssea, que é a responsável pela produção de células hematopoiéticas, e também o local mais conhecido pelos leigos para a retirada de células-tronco. Segundo Ele e Sim (2018) a medula óssea é um compartimento de criação de células onde é formado o estroma, um ambiente para essa produção de hematopoiese, mesmo local onde também são encontradas as células-tronco mesenquimais. Vale ressaltar, a partir da década de 80, que essas células do sangue (células hematopoiéticas) são responsáveis pela regeneração de quase 80% dos tipos de doença no sangue, já que são capazes de regenerar o sangue até com níveis muito abaixo do esperado (como perda de sangue volumosa)(Caplan 1991)

Os testes com células-tronco aspiradas da Medula óssea utilizadas em camundongos gerou sucesso, a Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) em parceria com a Universidade do Texas e o Hospital Pós Cardíaco testaram a injeção de células-tronco mesenquimais em humanos com cardiopatias, obtendo sucesso (Perin et.al, 2003) sendo o Brasil um dos pioneiros no uso dessas células. Porém, é

válido lembrar que as células-tronco de tecidos adultos têm sua capacidade limitada de diferenciação celular, sendo programadas para usos mais específicos.

Os tecidos adiposos contém as células adultas, que além de conter células de gordura abriga o tecido conjuntivo e nervoso, estromais, células de defesa e nosso objeto de estudo, as células-tronco, elas estão onde muitos pensam ser apenas a reserva de energia do corpo mas por esse tecido conter estromas (igual a medula óssea) permite a aspiração das células-tronco para futuros estudos, sendo preparada numa centrífuga que irá separar as células para uso da reconstrução do tecido e outros componentes que serão rejeitados (parte gordurosa) (Kamal, et. al, 2022).

Nos estudos de Silva (2010), o cordão umbilical é descrito como um método utilizado no Brasil desde 1990 para testes, após a criação de um banco de sangue derivado desse cordão. O cordão umbilical é composto por duas artérias que conectam o embrião à placenta e contém a geleia de Wharton, uma substância gelatinosa rica em fibroblastos e células-tronco. Esta geleia desempenha um papel crucial ao proteger os vasos do cordão umbilical de possíveis choques. O líquido amniótico, que também possui características similares, é amplamente utilizado devido à sua extração não causar dor nem para a mãe nem ao bebê recém chegado ao mundo (Hyun, 2010). Mas há alguns anos atrás era considerado até a proibição da retirada dessas células, questões ligadas à ética, já que ainda não era provado que o feto não sentiria dor se retirado as células antes do parto, ou risco de criação de tumores onde as futuras células seriam inseridas (Silva; Piccinato et.al 2020).

Já as células-tronco embrionárias, acabou sendo tema de uma discussão muito importante, unindo ética e religiosidade no debate, por serem células cultivadas a partir do blastocisto presente dentro do embrião, e contendo enormes vantagens para suas aplicações, tendo em vista alta capacidade de diferenciação dos outros meios, vem a pergunta “ é ético utilizar uma vida para criar tratamentos medicinais?” (Hyun et. al 2010), e assim depois de muitos debates sobre como o “aborto” aconteceria em prol das pesquisas, foi feita a lei de biossegurança artigo 5º (Lei 11.105/2005), que autoriza a utilização de células-tronco embrionárias obtidas de embriões humanos produzidos por fertilização *in vitro*. Com a aprovação da Lei de Biossegurança, a realização de pesquisas com células-tronco embrionárias passa a ser permitida no Brasil, contudo, a lei estabelece algumas restrições:

Conforme estabelece a Lei de Biossegurança (BRASIL, 2005), os embriões precisam estar congelados há pelo menos três anos; só podem ser usados com o consentimento dos genitores; não é permitido o comércio de embriões, nem sua produção e manipulação genética, sendo proibidas as clonagens terapêuticas para aplicação em pesquisas e a reprodutiva. As terapias com o uso de células-tronco ainda estão em fase de pesquisa, podendo ser aplicadas somente de forma experimental por pesquisadores cujo projeto tenha sido aprovado previamente nos Comitês de Ética em Pesquisa (CEPs).

A criação dessas células oriundas do embrião se dá pela fertilização *in vitro* como dito anteriormente, especificamente na fase onde o blastocisto tem a capacidade de “criar” 3 folhetos embrionários, tendo a massa celular interna do blastocisto isolada e colocada em uma cultura específica para crescer, após cultivadas elas formam uma linha super potente de células-tronco (hyun, et. al 2010).

A inovação vem sendo as células retiradas da urina do paciente, oriundas das cavidades renais, um método indolor e considerado mais barato que os demais, a urina do paciente é coletada e feito o mesmo processo de depuração das células anteriores, o grande ponto dessa informação que as células que são colhidas nessa urina e são tratadas até o ponto de serem utilizadas, podem voltar ao mesmo paciente na forma de terapia sem dores maiores. (Burdeyron, et.al 2020)

1.4 FATORES DE TRANSCRIÇÃO:

Em 2006 foram realizado 5 estudos científicos comprovando a relação entre fatores de transcrição e potência das células, na pesquisa de Takahashi e Yamanaka (2006) foram isolados e testados 24 fatores de transcrição de camundongos, sendo eles: Oct3/4, Sox2, Nanog, GDF3, REX1, FGF4, ESG1, DPPA2, DPPA4, hTERT, DNMT3B, GABRB3, TDGF1, GAL, LEFTB, IFITM1, NODAL, UTF1, EBAF, GRB7, PODXL, CD9, BRIX, KLF4 e cMyc. sendo as mais utilizadas para o estudo seguido por esse trabalho a expressão que mais correspondia eram as combinações entre as Oct4, Sox2, NANOG, Klf e c-MYC. Essas proteínas desenvolveram a iniciação do processo de RNA mostrando resultados surpreendentes na reversão de linhagens originais a um a multipotente

semelhantes às células-tronco, e esse processo ficou conhecido como reprogramação celular (Takahashi; Yamanaka 2006).

1.4.1 Oct4

O fator de transcrição Oct4 que é codificado pelo gene POU5f1 pode se expressar em células de embrião ou germinativas, com a sua deficiência o embrião é comprometido eliminando a pluripotência do blastocisto, porém sua expressão em níveis bons é relacionada a manutenção da pluripotência e auto renovação das células-tronco embrionárias. Ele é uma proteína que pertence a família de transcrição POU, que se caracteriza específico para a ligação do DNA. Oct4 é essencial para manter as células-tronco em estado de indiferenciação e em níveis adequados para a expressão dos genes multipotentes, e regula as atividades de outros genes trabalhando em conjunto com Sox2 e Nanog, esta interação torna os níveis de Oct4 mais equilibrados (Takahashi 2006).

A sua presença na reprogramação de células somáticas como fator de transcrição traz resultados positivos para a criação das células-tronco pluripotente induzidas (iPSCs)

Oct4 atua se ligando a sequências específicas de DNA em promotores de genes pluripotentes. Ele forma conjuntos com outros fatores de transcrição e modula a expressão gênica fazendo essa célula se manter pluripotentes formando complexos com o Sox2, sendo o complexo que aumenta e regula os genes para auto renovação e pluripotência das células, ativa e regula os níveis de transcrição da pluripotência. O Oct4 também é responsável por algumas modificações na cromatina, deixando-a mais acessível para a transcrição e silenciando alguns genes para prevenir as diferenciações nesse período antes de se tornar células-tronco (Boiani 2005, Takahashi, 2006).

Com a importância do Oct4 como fator de transcrição e marcados de células pluripotentes como vimos acima, a sua presença é utilizada nos estudos acerca de células-tronco, tendo grande potencial para a ajuda em criar in vitro células-tronco específicas para tratamento de doenças degenerativas (Boiani, 2005).

1.4.2 Sox2

De acordo com Usake (2014) e Takahashi (2013), em conjunto com outros fatores de transcrição, o Sox2 é essencial na manutenção da pluripotência e auto-renovação dessas células-tronco, principalmente as de origem embrionária, já que sua função sobretudo é modificar a cromatina, facilitando modificações na maquinaria de transcrição. O Sox2 é caracterizado pela sua família Sox que tem presença no domínio de ligação do DNA chamado domínio HMG (High Mobility Group). Esse fator é crucial para a manutenção, colaborando juntamente ao Oct4 e Nanog, regulando a expressão gênica e prevenindo a diferenciação gênica prematura nas futuras células-tronco, além de modular as expressões para a célula continuar com sua pluripotência, isso ocorre com o Sox2 formando heterodímeros (molécula composta por duas subunidade diferentes) com Oct4. A colaboração entre esses dois é essencial principalmente para a auto-renovação e diferenciação das células-tronco embrionárias. Ligando-se com enhancers que modulam sua expressão gênica, em colaboração com Oct4 ele ativa o gene Nanog que é fundamental para a auto-renovação dessas células. Além de trabalhar na criação de células-tronco, o Sox2 está envolvido na formação de tecidos do sistema nervoso central, cérebro, e glândulas pituitárias (Usuke; Hisato 2013).

1.4.3 Klf4

Kruppel-like factors é uma família de fatores de transcrição que desempenham papéis cruciais em várias funções celulares, incluindo a manutenção da pluripotência e a auto-renovação das células-tronco, o Klf4 é o principal utilizado para células-tronco, na manutenção da reprogramação celular e no estado de pluripotência. Sendo essencial junto com os outros 3 fatores de transcrição (Oct4, Sox2 e c-myc) ele é utilizado para reprogramar células somáticas em iPSCs sendo o ponto principal para estabilizar o processo de reprogramação. Ele atua nos genes específicos de pluripotência assim como os outros auxiliando na expressão gênica, utilizando remodeladores da cromatina para deixar a máquina transcricional acessível (Da Silva, Martins, 2015).

1.4.4 C-MyC

Esse fator pertence à família Myc de proteínas, desempenhando papéis de regulação da proliferação celular, metabolismo, diferenciação, crescimento e apoptose, também sendo muito conhecido no meio da oncogênese, por suas

funções. Por atuar na área de proliferação celular ele aumenta a biossíntese necessárias para o crescimento celular promovendo o ciclo e sua proliferação (Lin et. al 2010).

Sendo um dos 4 fatores de transcrição, ele é utilizado na reprogramação das células-tronco, facilitando o estado proliferativo da célula e reconfigurando a estrutura da cromatina. Regula o metabolismo dessas células, auxiliando no aumento da produção de energia, na captação de nutrientes e ativando a transcrição de genes e na síntese das mitocôndrias (Takehashi et. al 2010).

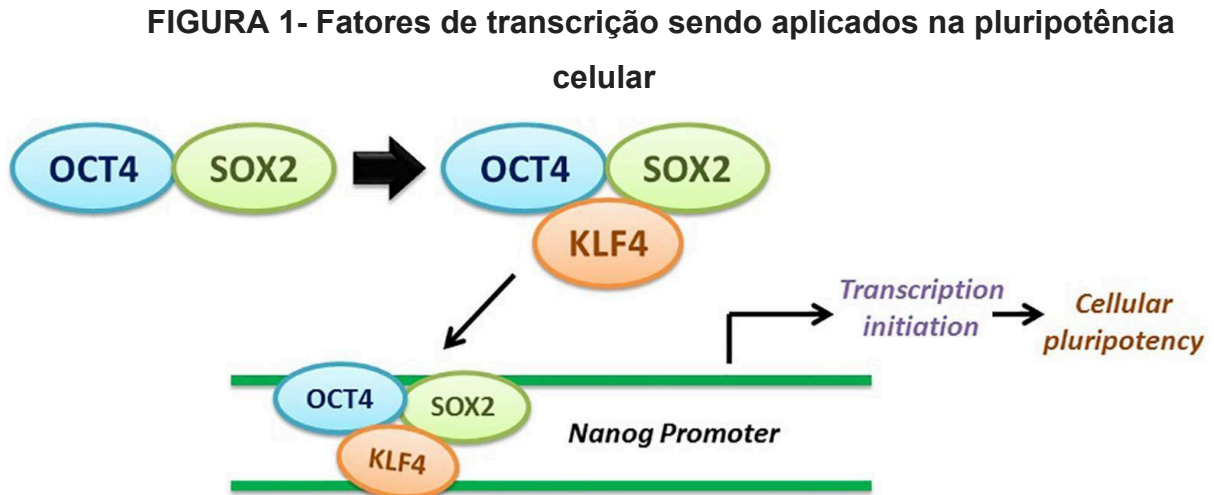
Lin e seus colaboradores (2012) afirmam que o c-Myc atua se ligando a sequências específicas de DNA conhecidas como caixas E (E-boxes) em promotores e enhancers de genes alvo. Ele forma heterodímeros com outra proteína chamada Max, e juntos eles regulam a transcrição gênica. O complexo c-Myc/Max se liga a caixas E no DNA, ativando a transcrição de genes envolvidos na proliferação, crescimento e metabolismo celular. Mesmo com toda suas habilidades devemos lembrar que ele é um potencial oncogênico, podendo causar alguns problemas, tendo seu uso de forma estritamente controlada e monitorado (Lin, et.al 2012)

1.4.5 Nanog

Theunisse et al (2014) descreve Nanog como fator crítico de transcrição, utilizado na auto-renovação e pluripotência de células embrionárias. Seu nome deriva da mitologia irlandesa "Tír na nÓg", que significa "terra da juventude eterna", refletindo sua função na manutenção do estado pluripotente das células. Assim como os fatores acima ele atua regulando a expressão gênica e mantendo o estado pluripotente das células-tronco prevenindo sua diferenciação prematura. Embora não sendo um dos fatores clássicos do pesquisador Yamanaka, ele é frequentemente utilizado na reprogramação de células somáticas as transformando em células-tronco, melhorando a eficiência da reprogramação e estabilizando o estado pluripotente (Lee et. al 2017).

Nanog atua se ligando a enhancers de genes específicos da pluripotência, interagindo com os outros fatores de transcrição como o Oct4 e Sox2 , formando uma rede regulatória que mantém a células em estado pluripotente, e minimizando o estado de diferenciação da célula. (Theunisse, et.al 2014)

Quando os fatores Oct4, Sox2, C-MYC e KLF4 se ligam, esse complexo formado então se liga ao promotor nanog para induzir o fator de transcrição para promover a reprogramação celular (Lee et.al 2017).



Fonte: Lee, Wottrich, Bonavida (2017).

esses fatores modificam geneticamente a reprogramação dessas células, as fazendo entrar em modo pluripotente, retornando ao estado equivalente a uma célula tronco embrionária. esse método foi uma revolução na pesquisa em termos de reprogramação celular, sendo considerado o modo mais fácil de produzir, sendo adotado pelos laboratórios do mundo todo (Yamanaka 2009: Pereira 2009)

1.5 COMO CONSERVAR AS CÉLULAS-TRONCO PARA USOS FUTUROS?

Quando as células-tronco são extraídas do corpo humano podem ser transportadas para possível tratamento e armazenamento mantendo a amostra pronta para futuro uso, utilizando a criopreservação (Souza 2014). A criopreservação está presente em todo o mundo especialmente no Brasil, onde temos o CCB (Centro de Criogenia do Brasil) que atua na preservação dessas células-tronco mesenquimais sendo a pioneira nesse ramo brasileiro (Silva et.al, 2017).

A conservação de células-tronco para usos futuros tem se dado por processos com técnicas avançadas de criopreservação, que é a prática de preservar células vivas em temperaturas extremamente baixas, utilizando nitrogênio

líquido que mantém a visibilidade celular por um maior período de tempo, colaborando para a utilização em pesquisas futuras (Silva et. al 2017). Como sabemos, as células-tronco podem ser coletadas de vários lugares, após sua coleta, essas células são processadas para remover impurezas e concentrar as células-tronco, centrifugadas para a utilização de agentes para a separação celular (Kamal et. al 2022). Seguido da centrifugação, são adicionados crioprotetores como o dimetilsulfóxido e glicerol, a fim de proteger as células durante o congelamento e evitando possíveis cristais de gelo que podem danificar as membranas de células, então as células são incubadas por um tempo para a penetração do crioprotetor antes do congelamento (Centro de Criogenia Brasil, 2020).

Nos dias de hoje células-tronco são armazenadas e congeladas abaixo de 0°C, para que assim impeça a formação de gelo no citoplasma celular, as células são emergidas em meio hipotérmico o qual retira a água presente nas células desidratando-a. Após esse procedimento, as chances de formação de gelo intracelular são reduzidas consideravelmente (Souza 2014).

Existe o risco de que possa ocorrer o congelamento da água dentro do citoplasma, fazendo que essa água intracelular congele causando a morte celular. O descongelamento celular é extremamente importante para estabelecer a validade das células, pois no início do processo de congelamento as células se encontram hidratadas em estágio de equilíbrio, com conteúdo celular à sua volta, e estarem sujeitas a mudanças térmicas e químicas. (Souza, 2014)

As células-tronco que ocorrem na formação do gelo intracelular o aquecimento pode fazer que os cristais de gelo aumentem de tamanho, internamente e externamente levando a células a danos letais. Silva et al (2017) relembra que no começo as células eram congeladas com pentamido ou hidroxietilamido e conservada no nitrogênio, porém os maus resultados da sobrevivência das células, levaram ao abandono dessa técnica (congelamento). O congelamento é controlado e feito de duas formas: Congelamento lento: que envolve a redução lentamente da temperatura, sendo de 1°C por minuto até atingir -80°C. Já o congelamento rápido, as células são expostas direto ao nitrogênio líquido que chega a -196°C, porém menos utilizadas por causarem danos celulares (Silva, et.al 2017). A partir daí as células congeladas são armazenadas em tanques de nitrogênio a -196°C, com sistemas automatizados que monitoram a temperatura e os níveis de nitrogênio, assegurando a preservação a longo prazo, enviando

alertas caso haja alterações. Para descongelá-las para utilização dessas células, essas células são aquecidas em um banho maria a 37°C e removidos os crioprotetores que envolveram as células durante o descongelamento (Souza, 2014).

Feito o processo de descongelamento é medido a viabilidade das células, se houve danos que utilizam as células-tronco, testes são feitos para garantir além de estar livre de danos estruturais as células ainda contém a capacidade de pluripotência, sendo capaz de se proliferar e se diferenciar (Silva et al 2017)

A FACT (Foundation for the Accreditation of Cellular Therapy <https://www.factglobal.org/>) contem normas internacionais rigorosas para a garantia a segurança no uso de terapias células com células-tronco descongeladas.

1. 1.5 O que são células-tronco autólogas?

Células-tronco autólogas são células-tronco que são coletadas do próprio paciente que irá recebê-las. Essas células são coletadas de uma parte do corpo do próprio paciente, eliminando os riscos de rejeição do organismo quando inseridas novamente nesse paciente, já que o corpo reconhece como células próprias, e o sistema imune não as ataca. É considerada mais segura já que não há necessidade de fazer testes com doadores que possam ser compatíveis ou de combinação de tipos de tecidos, e evitar transmissões de doenças que o doador possa ter durante esse processo, aumentando as chances de sucesso. (Caplan, 1991).

Caplan em 1991 descreve que as células-tronco autólogas podem ser utilizadas em várias terapias regenerativas, como tratamentos de lesões ósseas, e cartilaginosa, cardíacas, dermatológicas, neurológicas entre outras. Para a coleta dessas células, a retirada pode ser de qualquer parte do corpo, como a medula óssea e tecido adiposo (por meio de lipoaspiração). Após coletada de alguma parte do corpo do paciente, essas células são processadas em laboratório para serem isoladas e transformadas em uma população de células-tronco, e depois reintroduzidas na lesão a ser tratada do paciente com a regeneração tecidual, podendo ser em forma de injeções contendo esse material ou cirurgicamente em casos de lesões graves e profundas.(Rodrigues et. al 2021). As pesquisas com essas células vêm avançando e abrindo possibilidades incríveis sobre tratamentos em doenças difíceis de tratar, com grande eficácia dessas terapias em várias áreas

médicas. Nas áreas de pesquisa e aplicação, vem sendo usadas e trazendo resultados promissores (Kamal et.al 2022):

- Ortopedia: Utilizadas para tratar fraturas e defeitos ósseos, promovendo a formação de novo tecido ósseo.
- Cardiologia: Aplicadas para reparar tecidos cardíacos danificados após um infarto do miocárdio, melhorando a função cardíaca.
- Dermatologia: Utilizadas em tratamentos para regeneração de pele, como no caso de queimaduras graves.
- Neurologia: Investigadas para a reparação de tecidos neurais danificados em condições como lesões da medula espinhal. (Rodrigues et.al 2021)

1.5.2 Regeneração Tecidual

A regeneração tecidual é o processo biológico de reparação/substituição de células, tecidos e órgãos que tiveram danificações, essa área atua na restauração por completo da estrutura e funções desses tecidos perdidos, trazendo a sua funcionalidade de volta, sendo fundamental para a homeostase e recuperações de lesões de um organismo, tendo resultados promissores no tratamento de diversas doenças acometidas aos seres humanos (Takahashi; Yamanaka, 2006).

A regeneração celular é um processo biológico fundamental em diversos organismos, permitindo a modificação de tecidos e células danificadas ou perdidas. Em seres humanos, embora limitada, a regeneração ocorre em alguns órgãos, como o fígado, que tem uma capacidade notável de se regenerar após danos significativos (TAKEDA; KOZAI, 2020). Nos animais, essas características são mais evidentes em espécies como os anfíbios, onde membros inteiros podem ser reconstruídos após amputações (SÁNCHEZ ALVARADO; TSONIS, 2006). Kamal et.al (2022) diz que para a regeneração tecidual acontecer é necessário alguns pontos importantes como a proliferação celular, que são as células se dividindo para produzir novas células para cobrir aquela lesão, a ajuda promissora que vem sendo tema desta pesquisa é o uso de células-tronco, que podem se diferenciar em tipos celulares específicos para aquela região na reconstrução desse tecido, então essas células são adicionadas ao local e mobilizadas, a fim de cumprir seu papel. Citocinas, os fatores de crescimento e a matriz extracelular ajudam a sinalizar e modular as atividades auxiliando na migração dessas células.(Fontes et. al 2021)

Margiana e colaboradores (2022) citam que alguns tipos de regeneração tecidual podem ser de simples recuperação, como apenas reposição de células que foram danificadas como a epiderme, e casos maiores chamados de regeneração complexa são como reconstrução de tecidos de órgãos internos, como o fígado humano que regenera sua massa quase totalmente em duas semanas.

Ainda de acordo com Margiana et. al (2022) a terapia com células-tronco mesenquimais vem sendo usada para a regeneração completa de tecidos danificados em diversas condições, desde tratamentos na pele, a doenças cardíacas e lesões espinais. O método utilizado atualmente, consiste em combinações de modulação com a bioengenharia de tecidos, que utiliza os fatores de crescimento para estimular os fatores naturais para a regeneração, possibilitando resultados positivos na regeneração tecidual com IPSC's

Essa regeneração pode ocorrer de duas formas, naturalmente o corpo com a capacidade inata resolve, ou com terapias biomédicas, como tratamento de células-tronco e utilizando a bioengenharia de tecidos. (Fontes et. al 2021) Para a regeneração acontecer, inclui vários processos complexos, com a proliferação celular, diferenciação, angiogênese e a remodelação da matriz extracelular. A proliferação celular é o processo que as células se dividem para produzir novas células, assim preenchendo o espaço onde estavam as células danificadas. Takahashi e Yamanaka (2006) descrevem a diferenciação celular como o processo de as células progenitoras ou chamadas de células-tronco se transformam em tipos específicos celulares com suas funções determinadas, sendo a base da regeneração tecidual. A angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos a partir dos vasos existentes. Esse processo é essencial para fornecer oxigênio e nutrientes ao tecido em regeneração, promovendo a cicatrização e o crescimento celular. A matriz extracelular forma uma rede complexa de proteínas que fornecem suporte às estruturas dos tecidos, sendo remodelada para acomodar o crescimento celular durante a regeneração tecidual (Einstein journal, 2020)

Além de possuírem a habilidade de regenerar tecidos conforme já mencionado, para Kamal (2022) as células-tronco mesenquimais também apresentam características anti-inflamatórias e imunomoduladoras. Isso indica que elas podem auxiliar na regulação da resposta do sistema imunológico, diminuindo a inflamação excessiva frequentemente relacionada a doenças crônicas e lesões graves. De acordo com Kamal (2022) esse aspecto se mostra especialmente

relevante em condições como artrite reumatoide, enfermidades autoimunes e lesões cerebrais traumáticas, onde a inflamação desenfreada pode ocasionar danos adicionais aos tecidos.

Uma vantagem adicional das células-tronco mesenquimais é sua habilidade de se inserir no ambiente microscópico dos tecidos e liberar substâncias de crescimento e moléculas de sinalização que estimulam a renovação celular e a criação de novos vasos sanguíneos (angiogênese). Esse papel é essencial para assegurar uma correta oferta de oxigênio e nutrientes aos tecidos em regeneração, acelerando, assim, o processo de cicatrização e recuperação (Einstein journal, 2020)

A utilização clínica das células-tronco mesenquimais tem sido investigada em várias condições médicas, incluindo lesões musculoesqueléticas, doenças do coração, distúrbios neurológicos, problemas pulmonares e no tratamento de queimaduras e feridas na pele. Os primeiros resultados de pesquisas e testes clínicos têm sido promissores, demonstrando avanços significativos na função dos tecidos afetados, alívio da dor e melhoria na qualidade de vida dos indivíduos.(Kamal, et. al 2022, Yacoub et. al 2013, Bolli et al 2013)

Chama a atenção que, mesmo as células-tronco mesenquimais apresentando um vasto potencial terapêutico, ainda existem obstáculos a serem vencidos em relação à uniformização dos métodos de cultivo e aplicação, regulamentação e garantia a longo prazo. No entanto, com o progresso constante da investigação e da tecnologia, é possível que essas terapias avancem e se tornem uma parte essencial da medicina regenerativa no porvir. (Kamal et.al 2022)

1.6 células-tronco na regeneração de tecido cardíaco pós infarto

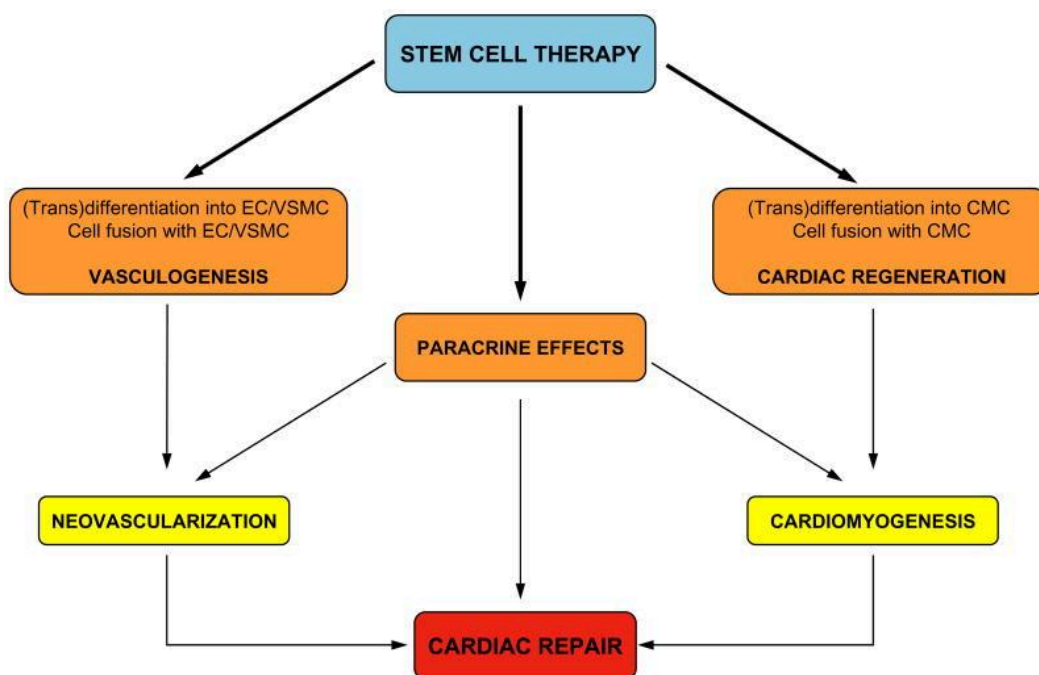
O infarto do miocárdio, também conhecido como ataque cardíaco, ocorre quando o fluxo sanguíneo para de circular por um tempo significativo para uma parte do coração, sendo na maioria das vezes o ventrículo esquerdo (VE), causando sérios danos e até a morte do tecido cardíaco, devido a falta de oxigênio circulante. O infarto está na maioria das vezes associado a formação de coágulos na artéria coronária, posicionada nas paredes do ventrículo esquerdo (local comumente mais afetado durante o infarto de miocárdio), onde previamente foi danificada por ateromas (placas de gordura), impedindo a passagem sanguínea e criando esses

coágulos. Os sintomas principais incluem falta de ar, dor intensa no peito, náusea, suor e fadiga. Se tratando de uma doença crítica, seu tratamento deve ser de emergência, para minimizar danos graves, incluindo a morte do paciente. Métodos comumente utilizados nessa situação, são a intervenção cirúrgica, como a angioplastia e revascularização do coração, intervenção medicamentosa, e o tema de pesquisa, a regeneração com células-tronco, que surgiu sendo uma abordagem promissora no tratamento para minimização de danos na área de cardiologia. (BVSMS, 2018).

O coração é um órgão com capacidade limitada de regeneração, os cardiomiócitos são de baixa proliferação, raramente se dividindo, em vez disso eles se adaptam a certas mudanças do órgão, podendo ocorrer a hipertrofia, e não regeneração do tecido. O coração é um órgão com vascularização complexa, o que acaba dificultando novas revascularizações para esses cardiomiócitos se desenvolverem e se replicarem, limitando a angiogênese nessa parte (Bergman et.al 2009).

O impacto que as doenças cardiovasculares vêm causando é impressionante, sendo a principal causa de morte mundial desde meados da última década com projeções para até 2030 (Schettert, 2008).

FIGURA 2- ESQUEMA SOBRE A TERAPIA COM CÉLULAS-TRONCO:



Fonte: GNECCHI et al (2008).

Gnecchi e seus colaboradores em sua pesquisa de 2008, cita que os três principais mecanismos estabelecidos para a ação das células-tronco adultas no reparo cardíaco são a regeneração de cardiomiócitos, a vasculogênese e as ações parácrinas. A transdiferenciação e a fusão celular das células-tronco transplantadas contribuem para a regeneração cardíaca e a formação de novos vasos (Souza et. al 2010). Os efeitos paracrinos exercidos por essas células podem influenciar positivamente diversos processos, incluindo a cardiomiogênese e a neovascularização (Gnecchi, et. al 2008).

As células-tronco mesenquimais em particular, produzem e secretam uma ampla variedade de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (Lee et.al 2022). As células-tronco liberam substâncias biologicamente ativas de forma temporal e espacial em resposta a estímulos ambientais específicos, como a isquemia. Esses fatores atuam no microambiente celular, promovendo ações parácrinas em diferentes tipos de células, resultando em proteção, reparo e regeneração do tecido (Souza 2010). Um efeito parácrino imediato das células-tronco em ambientes isquêmicos é a liberação de moléculas citoprotetoras que aumentam a sobrevivência dos cardiomiócitos (Jiang 2020). Além da citoproteção e da neovascularização, os fatores parácrinos liberados por células-tronco transplantadas podem modificar a matriz extracelular, favorecendo a remodelação pós-infarto e fortalecendo a cicatriz resultante. As células-tronco que serão associadas ao coração tem duas formas que possam ser aplicadas, substituição direta e com secreção de fatores(Lee et. al 2022)

A substituição direta é quando as células-tronco são diferenciadas em cardiomiócitos substituindo diretamente as células danificadas. Estudos recentes demonstraram que as células-tronco mesenquimais (CTMs) e as células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) são capazes de se diferenciar em cardiomiócitos funcionais, que podem integrar-se ao tecido cardíaco lesado e contribuir para a sua regeneração. No caso das CTMs, embora sua principal contribuição seja a modulação do ambiente inflamatório e a promoção da angiogênese, pesquisas têm mostrado que, sob condições específicas, elas também podem se transformar em cardiomiócitos. As iPSCs, por sua vez, oferecem uma vantagem significativa, pois podem ser geradas a partir de células adultas e, portanto, têm o potencial de se diferenciar em uma ampla gama de tipos celulares, incluindo cardiomiócitos

funcionais. Esses avanços são suportados por estudos que comprovam a eficácia dessas células na regeneração do miocárdio e no aumento da função cardíaca (Lee et al., 2022).

Lee et. Al (2022) diz ainda que além de se diferenciarem em cardiomiócitos as células-tronco desempenham um papel na modulação do ambiente cardíaco danificado, excretando fatores parácrinos, incluindo citocinas, fatores de crescimento e outras moléculas que promovam a angiogênese, que é a formação de vasos sanguíneos novos. Além disso, as células-tronco têm capacidade de reduzir a inflamação local, sendo uma das complicações do tecido cardíaco pós- infarto.

A eficácia e segurança das terapias com células-tronco são questões fundamentais que precisam ser abordadas para que essas terapias possam se tornar práticas clínicas viáveis. A integração Funcional vem sendo um desafio crítico que as células transplantadas tenham funcionalidade total, já que ainda são limitadas, elas precisam formar conexões elétricas com as células cardíacas já existentes para que a função cardíaca seja totalmente restaurada (Jiang, 2020) A introdução de novas células no tecido cardíaco pode provocar arritmias, uma vez que a integração elétrica pode ser imperfeita.

Fontes et. al (2021) afirma que com sua capacidade de diferenciação, as células-tronco mesenquimais têm sido base de estudos e testes para a regeneração do tecido cardíaco, onde se transformam em cardiomiócitos, células cardíacas com imunomoduladores e propriedades parácrinas, trazendo resultados que demonstram eficácia na melhora da função cardíaca pós infarto.

Os estudos utilizando células-tronco da medula óssea em cardiopatias começaram no Brasil por Perin et al. (2003) que conduziram um estudo pioneiro injetando células-tronco mesenquimais aspiradas da medula óssea diretamente no coração de pacientes com doenças cardíacas. Este estudo, realizado em colaboração entre a Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), a Universidade do Texas e o Hospital Pós Cardíaco, mostrou resultados promissores na regeneração do tecido cardíaco, com melhorias significativas na função cardíaca dos pacientes. Este estudo foi motivado pelos testes bem-sucedidos em camundongos, que demonstraram a capacidade dessas células em promover a recuperação do tecido cardíaco. Perin e seus colaboradores(2011), após o fim da primeira fase dos estudos concluíram que as injeções contendo as células-tronco injetadas auxiliaram na melhora de sintomas de cardiopatias, sendo um sucesso e

não contendo eventos inesperados (como infarto ou morte nos pacientes testados) garantindo a segurança do procedimento. Na segunda fase, ocorreu uma intercorrência, notificaram que um paciente teve embolia pulmonar que foi tratado por um diurético de alça, não resultando em problemas maiores, terminando essa fase de análises finais um sucesso.

As pesquisas de Bolli et al. (2011) em humanos com cardiopatia veio sendo pioneiro nesse ramo da pesquisa, antes sendo testados em ratos e porcos. Bolli (2011) inicia pesquisas em pacientes com cardiopatias que após três meses do infarto do miocárdio, esses pacientes foram tratados com uma injeção contendo células-tronco cardíacas autólogas. Após mais 90 dias de tratamento, observou-se, por meio de ecocardiogramas e exames sanguíneos, uma melhora significativa na função do ventrículo esquerdo. Este tratamento atenua a remodelação do tecido danificado e melhorou a cicatrização, reduzindo os danos maiores e promovendo uma recuperação cardíaca mais eficaz.

Um estudo parecido com Bolli et al. (2011) realizado por Perin et. al também em 2011 (Perin et. al 2011) descrevem esses benefícios em termos de função cardíaca melhorada, com aumento da fração de ejeção e diminuição do tamanho da cicatriz, indicando o potencial regenerativo das células-tronco cardíacas, destacando que a terapia com células-tronco foi associada a uma redução significativa no apoptose celular e a um aumento na formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese), o que contribuiu para a melhoria geral da função cardíaca. Os estudos enfatizaram a importância de continuar a investigar a dosagem ideal e os métodos de entrega para maximizar os benefícios terapêuticos das células-tronco em tratamentos cardíacos. (Jiang et. al 2020)

Jiang e colaboradores (2020) afirmam que para que a terapia com células-tronco se torne aplicável, é essencial o desenvolvimento de métodos para a produção em larga escala dessas células. Esse processo inclui o cultivo e a diferenciação de grandes volumes de células com alta qualidade e consistência. Tecnologias avançadas e sistemas automatizados estão sendo criados para atender a essa necessidade crescente. No entanto, o elevado custo de produção e processamento das células-tronco limita o acesso a essas terapias. Reduzir os custos pode ser alcançado através da otimização dos métodos de produção, do uso de técnicas mais econômicas e do desenvolvimento de plataformas comerciais viáveis para o cultivo celular (Jiang et al. Al 2020).

Outro desafio significativo mostrado nos estudos de Rodriguez et al. (2021) e Mathiasen et. al (2015) é a imunogenicidade das células-tronco, que é a capacidade dessas células de desencadear uma resposta imunológica no receptor, podendo levar à rejeição. As células-tronco alogênicas, que não são derivadas do próprio paciente, têm um maior risco de serem reconhecidas como "estranhas" pelo sistema imunológico, resultando em rejeição. Pesquisas estão explorando estratégias para minimizar essa resposta imunológica, como o uso de células-tronco autólogas (derivadas do próprio paciente) ou técnicas de engenharia genética para criar células menos imunogênicas . Embora as células-tronco autólogas evitem problemas de rejeição, o processo de obtenção e cultivo pode ser demorado e complexo. Em contraste, as células-tronco alogênicas são mais facilmente obtidas, mas exigem estratégias rigorosas de controle imunológico (Rodríguez, et al 2021) .

Um estudo recente, liderado por Fontes et. al (2023) reúne alguns resultados sobre a administração de células-tronco para a regeneração cardíaca pós-infarto, onde a fração de ejeção melhorou significativamente indicando que a capacidade de bombeamento voltou a funcionar perfeitamente, tendo maior eficiência na distribuição sanguínea. a diminuição de falhas e arritmias também diminuíram, provando que a terapia com células-tronco foi realizada com sucesso.

A análise feita em relação a angiogênese, mostra as atividades dos capilares abastecidos com células-tronco, indicando melhora e reconstrução de vasos sanguíneos, sendo provado esses feitos com ressonância magnética, e outras técnicas não invasivas (Fontes et.al 2023)

A resposta imunológica revela um aumento na modulação da resposta a inflamação causada pelo infarto, as citocinas teve uma redução expressiva de suas concentrações após a terapia, indicando que as células com suas propriedades imunomoduladoras contribuem para a redução da inflamação e a controlando.(Mathiasen, et. al 2015: Bolli et.al 2013)

1.5.4 Métodos imuno magnéticos: Lin - e C-kit+

Métodos imuno magnéticos são técnicas que utilizam a combinação de marcadores imunológicos e campos magnéticos para isolar e manipular células específicas em uma amostra. Esses métodos são particularmente úteis em biologia

celular e pesquisa médica e biomédica, permitindo a seleção e análise de células baseadas na presença de certos marcadores de superfície. com sua capacidade de aplicação em isolamento de células específicas, os marcadores Lin - e C-kit+ nas células-tronco são encontrados de forma facilitada, ajudando a apenas elas serem retiradas do tecido para outras aplicações Estudos como o de Bolli et.al (2011) sobre células c-Kit+ para regeneração cardíaca mostra que frequentemente usam métodos imuno magnéticos para isolar essas células.

Lin- refere-se a células que são negativas para uma série de marcadores de linhagem celular específicos, o que significa que essas células não são diferenciadas em tipos celulares específicos. Já o c-Kit é um marcador de superfície celular que é encontrado em células-tronco e progenitoras, incluindo células-tronco hematopoiéticas e células-tronco mesenquimais. A presença de c-Kit sugere que essas células podem se diferenciar em vários tipos celulares.. No coração, essas células podem se transformar em cardiomiócitos (Bolli et. al 2011).

1.6 ENSAIOS SOBRE A TERAPIA CELULAR NA REGENERAÇÃO CARDÍACA:

1.6.1 Caduceu

O estudo Caduceu realizado por Makkar et. al (2012) é o estudo randomizado de fase 1 denominado "Cardiosphere-Derived Autologous Stem Cells to Reverse Ventricular Dysfunction" (CADUCEUS), tendo como objetivo investigar a eficácia da infusão de células-tronco cardíacas autólogas nas artérias coronárias após infarto do miocárdio. para acontecer esse estudo foi-se elegidos 25 pacientes, divididos em grupo de transfusão e controle, onde 17 foram submetidos a essa terapia e 8 ao grupo controle. Os pacientes elegíveis para a terapia celular foram selecionados com base na disfunção do ventrículo esquerdo (ejeção menos que 37%)após passarem por angioplastia. Os pesquisadores acompanharam desde a infusão de 25 milhões de células-tronco cardíacas e seus desdobramentos. Essas células foram derivadas de biópsias endomiocárdicas realizadas no ventrículo direito aos 37 dias anteriores. A escolha do número de células a ser infundido baseou-se em estudos experimentais prévios sobre o limite máximo seguro de células que podem ser injetadas sem causar infarto.(Makkar et.al 2012)

No estudo conduzido por Makkar et. al (2012) foram coletadas amostras de tecido do coração através de biópsias endomiocárdicas. Cada amostra tinha um peso médio de 276 mg (com variações de 93 a 891 mg), esse tecido foi triturado em pequenos pedaços de aproximadamente 1 mm sendo chamados de explantes.

Os explantes foram colocados em um meio de cultivo onde começaram a produzir espontaneamente células. Essas células foram coletadas e colocadas em um meio de cultura que permite a formação de estruturas chamadas cardioesferas, que são agrupamentos tridimensionais de células cardíacas. As cardioesferas são transferidas para um frasco de cultura onde se aderem ao fundo para continuar se multiplicando e é repetido até 5 vezes o processo para obter a quantidade necessária de células (dentro de 36 dias após a coleta da biópsia).

Apesar desse estudo não ter poder estatístico para determinar a eficácia do tratamento devido ao baixo número de pacientes submetidos, observou-se redução no tamanho do infarto e aumento na quantidade de tecido miocárdico viável. (Yacoub; Terrovitis, 2013)

1.6.2 Scipio

Segundo Heusch, 2011 "este ensaio parece ter aumentado as expectativas a um grau irrealista com a esperança de que 'transformará a terapia com células cardíacas que seu homônimo, Scipio Africanus, alcançou em campanhas militares romanas'".

O estudo Scipio é um ensaio clínico que explora a aplicação de células-tronco mesenquimais para promover a regeneração do tecido cardíaco em pacientes com disfunção ventricular esquerda pós-infarto do miocárdio. As células-tronco mesenquimais são células que podem ser isoladas do tecido adiposo, medula óssea, tecidos embrionários e neonatais e têm a capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares, incluindo células cardíacas.(Yacoub, Terrovitis, 2013) Para realizar esse estudo foram selecionados pacientes com fração de ejeção do ventrículo esquerdo menor que 45%, onde durante a cirurgia de revascularização, o apêndice atrial foi removido e enviado ao laboratório do Dr. Piero Anversa em Boston para o processamento. Lá, esse tecido foi cultivado para extrair células que expressavam o marcador c-kit. Cerca de 120 dias após a cirurgia,

os pacientes no grupo de terapia celular receberam injeções intracoronárias dessas células. Os pacientes foram randomizados, com 16 recebendo a terapia celular e 7 atuando como controles. A eficácia foi avaliada por ressonância magnética, os resultados mostraram uma melhoria significativa na fração de ejeção do ventrículo esquerdo nos pacientes que receberam a terapia celular, em contraste com nenhum ganho no grupo controle. Além disso, houve evidências de redução no tamanho do infarto entre os pacientes tratados. (Heusch, 2011)

1.6.3 FOCUS-CCTRN

O estudo FOCUS- CCTRN (Focus on Cardiac Care and Transplant Research Network) é uma pesquisa piloto brasileira, realizada por Perin et.al em 2003(sendo a primeira a ser testada em humanos), e levada a mais estudos e testes também por perin et al. em 2012. Essa pesquisa clínica feita aqui resultou em uma pesquisa ainda maior sendo randomizada aprovada nos Estados Unidos pela Universidade do Texas (após primeira pesquisa em 2003).

O FOCUS-CCTRN executado por Perin e seus colaboradores (2012), é um estudo randomizado e duplo cego (cuidadores e paciente não são informados se foram tratados com células-tronco ou placebo), para pacientes que não tem chances de fazer cirurgia para revascularização, tem fração de ejeção do ventrículo esquerdo menor que 45%, ou está na fila para transplante cardíaco, sendo separados em grupos 2:1 onde a parte maior receberia as injeções contendo as células-tronco e a outra parte apenas um placebo. Uma preparação contendo células-tronco aspiradas da medula óssea ou não contendo nada, foi administrada nas regiões miocárdicas viáveis identificadas durante o mapeamento feito na ressonância e biópsias. Nesses pacientes foram aplicadas 15 injeções contendo 0,2 mL cada, sendo via transcendocardica, nas regiões viáveis do ventrículo esquerdo. Após seis meses esses pacientes foram examinados e submetidos a exames que mostrassem os resultados dessa terapia. Os exames mostraram aumento na fração de ejeção do ventrículo esquerdo, angiogênese, redução no tamanho do infarto. E foi-se verificado o nível de consumo de oxigênio, sendo feito um exame na esteira para tal medição. Essa pesquisa começada no Brasil, assim como as citadas acima, nos deixa com a esperança de um tratamento seguro e eficaz na regeneração cardíaca e diminuição do infarto.(Perin, 2003 ; Souza et. al 2010)

Perin e colaboradores (2003-2012) enfatizam a necessidade de abordagens personalizadas e integradas. A pesquisa colaborativa dentro da Rede de Pesquisa em Cuidados Cardíacos e Transplante (CCTRN) foi essencial para identificar melhores práticas e melhorar os desfechos clínicos para pacientes com insuficiência cardíaca avançada e transplantados.

1.6.4 ALCADIA

O estudo ALCADIA (AutoLogous Human CArdiac-Derived Stem Cell To Treat Ischemic cArdiomyopathy) foi um estudo pioneiro, conduzido por Takehara e seus colaboradores em 2012, sendo o primeiro a fazer os teste em humanos, investigando a combinação de células-tronco cardíacas autólogas com uma fórmula de liberação controlada do Fator de Crescimento Básico de Fibroblastos (bFGF) para tratar pacientes com cardiomiopatias e insuficiência cardíaca O ALCADIA foi um ensaio de fase 1, aberto e não randomizado, focado na segurança e viabilidade do uso de células-tronco do coração combinadas com bFGF.

Para essa pesquisa acontecer, Takehara et.al (2012) escolheram como participantes do estudo seis pacientes com cardiomiopatias, fração de ejeção do ventrículo esquerdo de 15% a 45%, e insuficiência cardíaca. Todos os pacientes apresentavam viabilidade e indicação para cirurgia de angioplastia do miocárdio. Essas células-tronco cardíacas foram obtidas de biópsias endomiocárdicas e cultivadas in vitro durante um mês. Durante a cirurgia de angioplastia, essas células foram administradas por meio de 20 injeções intramiocárdicas chegando em aproximadamente 0,5 milhão de células por kg do paciente. No local de aplicação dessas injeções foram adicionados uma folha de hidrogel biodegradável contendo 200 µg de bFGF tendo sua viabilidade assistida pela ocorrência de Eventos Cardíacos Maiores durante um ano. (Takehara et al 2012, Terrovitis 2013).

Dos seis pacientes, um foi excluído devido à piora da insuficiência cardíaca durante o acompanhamento. Entre os cinco pacientes restantes, a FEVE aumentou em 15%, e o tamanho do infarto diminuiu em 3,3%, demonstrando a segurança da administração combinada de células-tronco cardíacas autólogas e um hidrogel com liberação sustentada de bFGF (Takehara et. al 2012)

O estudo ALCADIA, por mais que seja uma pesquisa pequena e sem grupo de controle destacou a importância da engenharia de tecidos e do uso de

biomateriais na regeneração cardíaca, combinando uma folha de hidrogel com células-tronco para criar um ambiente propício à regeneração do tecido cardíaco(Yacoub, terrovitis 2013)

1.6.5 MSC-HF

O estudo MSC-HF (Mesenchymal Stem Cells in Heart Failure) foi conduzido por Mathiassen e colaboradores (2015) e investiga o uso de células-tronco mesenquimais no tratamento de insuficiência cardíaca. O objetivo desse estudo duplo cego e randomizado, foi avaliar a eficácia das células-tronco mesenquimais na função cardíaca, sendo avaliados em 150 pacientes com insuficiência cardíaca e fração de ejeção menor que 45% divididos 2:1, onde o grupo menor recebeu placebo. Esses pacientes foram subdivididos em 6 grupos para aplicação, que levou em torno de 6 meses para concluir as aplicações. A administração dessa terapia se deu por 10 a 15 injeções intramiocárdicas contendo 0,2mL de células. Essas células foram retiradas da medula óssea e alocadas em placas para proliferação por 10 dias antes de sua aplicação. Após algumas avaliações, ocorreram dois eventos adversos graves, um paciente faleceu devido a um infarto fulminante e outro precisou começar o uso de um ressincronizador cardíaco (para auxiliar no bombeamento do sangue). Após exames, foi verificado aumento na fração de ejeção 3,8% a 5,0%, redução da cicatrização em 7,7% e diminuição nos níveis de biomarcadores de insuficiência cardíaca tirando esses pacientes da régua de medição para tamanho do infarto (Mathiassen et.al 2015).

Esse estudo feito por Mathiassen et al 2015 foi considerado o maior utilizando células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea aplicada a pacientes com insuficiência cardíaca, demonstrando muitas melhorias em comparação ao grupo placebo.

TABELA 1 – Comparação de métodos de utilização de células-tronco

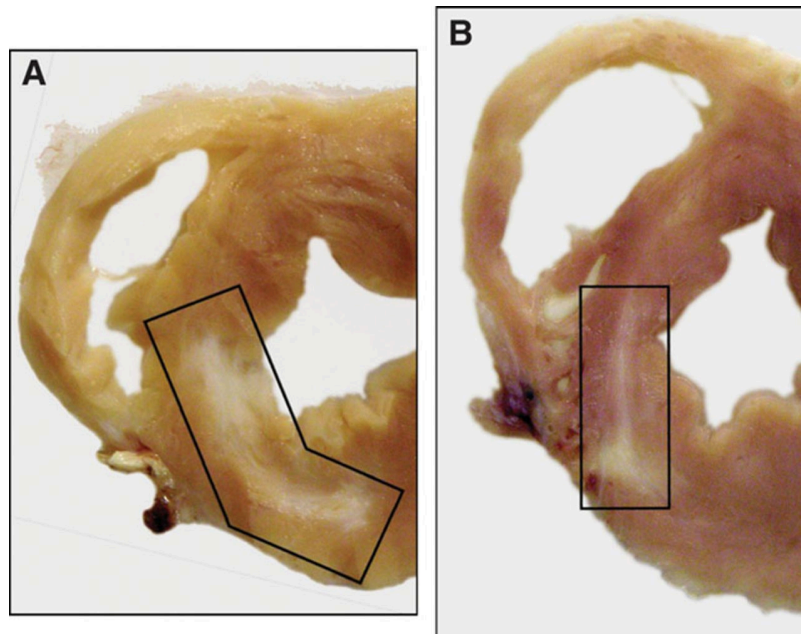
	ALCADIA	CADUCEU	FOCUS-CCT RN	SCPIO	MSC-HF
TIPO CELULAR	CT's AUTÓLOGAS CARDÍACAS	CARDIOS FERA	células-tronco DA MEDULA ÓSSEA	CT's MESENQUIMAIS MARCADAS COM C-KIT	células-tronco DA MEDULA ÓSSEA
MÉTODO DE ISOLAMENTO	MARCADORE S CELULARES CD105/CD90	MARCADOR ES CELULARES CD105/CD90	MARCADOR ES CELULARES CD105/ CD90	MARCADORES CELULARES C-KIT+ E CD105	MARCADORES CELULARES CD105/ CD90
ÁREA DE ISOLAMENTO	BIÓPSIA ENDOCÁRDI CA	BIÓPSIA ENDOCÁRDI CA	M.O. (ASPIRAÇÃO CRISTA ILÍACA)	APÊNDICE ATRIAL ESQUERDO (REVASCULARIZ AÇÃO)	M.O. (ASPIRAÇÃO CRISTA ILÍACA)
MÉTODO DE ENTREGA	INJEÇÃO INTRAMIOCÁ RDICA	INJEÇÃO INTRACORO NÁRIA	INJEÇÃO INTRAMIOCÁ RDICA	INJEÇÃO INTRACORONÁR IA	INJEÇÃO INTRAMIOCÁRDIC A
Nº DE PACIENTES	6	17	92	16	150
FRAÇÃO DE EJEÇÃO VENTRÍCULAR ESQUERDA	%9- 12%	Nenhum dado	3,1% -5,2%	8% - 12%	3,8% - 5,0%
REDUÇÃO NA CICATRIZ	3,3%	8% - 12%	Nenhum dado	Nenhum dado	7,7%

Fonte: Autor do trabalho, (2024).

As terapias testadas por Bolli et. al (2011) em modelos suínos mostraram resultados animadores, como diminuição do infarto, aumento da fração de ejeção do ventrículo esquerdo, redução cicatricial nas áreas afetadas, estímulo da angiogênese, restauração do bombeamento sanguíneo, modulação da inflamação.

Como podemos ver na figura abaixo, a diminuição do tecido cicatricial (mancha esbranquiçada) no modelo relatado nos estudos de Bolli et al 2013, reduziu de tamanho e o tecido cardíaco em volta voltou a ser mais espesso.

FIGURA 3- redução cicatricial em modelo bovino



Fonte: Bolli et. al (2013).

1.7 CONCLUSÃO

As pesquisas citadas nessa fundamentação sobre a regeneração cardíaca por meio do uso de células-tronco têm demonstrado um potencial significativo para transformar o tratamento de insuficiência cardíaca e outras doenças cardiovasculares. Estudos recentes revelam que a aplicação de células-tronco, tanto autólogas cardíacas quanto mesenquimais, podem levar a melhorias notáveis na função cardíaca, como o aumento da fração de ejeção para níveis superiores a 45%, redução do tecido cicatricial, aumento na angiogênese e diminuição dos biomarcadores de infarto, como troponina e CK-MB. Esses resultados são indicativos de uma regeneração tecidual promissora e de um impacto positivo na recuperação do tecido cardíaco.

No entanto, mesmo com todas as melhorias que as células-tronco podem trazer, a implementação desta terapia ainda enfrenta muitos desafios como a baixa sobrevivência celular e os riscos associados, como a potencial criação de anomalias, mutações e arritmias (ainda não totalmente comprovadas a longo prazo), que podem prejudicar o paciente e a pesquisa durante essa terapia, sendo questões que precisam ser cuidadosamente avaliadas. O uso de células-tronco nesses estudos demonstram um baixo nível de ocorrências graves (como morte),

levando em consideração que essas ocorrências aconteceram por motivos externos à terapia celular. A relevância do trabalho desses pesquisadores não pode ser totalmente medida por conta da baixa aplicação (número de pacientes) necessitando de mais pesquisas para confirmar a segurança a longo prazo e a durabilidade dos efeitos terapêuticos.

A padronização dos métodos de isolamento e administração das células-tronco (se são autólogas cardíacas ou de doador, punção intravenosa ou miocárdica), bem como a definição de protocolos claros para a seleção de pacientes, são essenciais para garantir a eficácia e segurança da terapia. A colaboração entre pesquisadores clínicos e estudiosos de biotecnologia será fundamental para superar esses desafios e transformar a terapia com células-tronco em uma opção terapêutica padrão.

O campo da regeneração cardíaca com células-tronco é incrível e está em evolução, oferecendo uma base sólida para futuros avanços. Estudos futuros devem se concentrar na otimização dos métodos de cultivo e administração de células-tronco e explorar novas abordagens para combinar a terapia celular com outras modalidades de tratamento, reduzindo a quantidade de cirurgias invasivas e até mesmo sendo uma esperança para aqueles que necessitam de transplantes. Com progresso contínuo e uma abordagem multidisciplinar, é possível que em breve, esta terapia ofereça soluções eficazes e seguras para uma condição que afeta milhões de pessoas em todo o mundo, além de outras patologias onde a células-tronco podem ser uma das soluções a se tentar.

Em suma, a terapia com células-tronco têm o potencial de redefinir o tratamento das doenças cardiovasculares, proporcionando esperança e novas perspectivas para pacientes com insuficiência cardíaca e outras condições cardíacas.

REFERÊNCIAS:

ALVARADO, Alejandro Sánchez; TSONIS, Panagiotis A. Bridging the regeneration gap: genetic insights from diverse animal models. **Nature Reviews Genetics** , v. 7, n. 11, p. 873-884, 2006.

BARKER, Roger A. et al. Lições aprendidas, e ainda a aprender, em primeiros ensaios com células-tronco humanas. **Stem Cell Reports** , v. 18, n. 8, p. 1599-1609, 2023.

BERGMANN, O. et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. **Science** , v. 324, n. 5923, p. 98-102, 2009. DOI: 10.1126/science.1164680. PMID: 19342590; PMCID: PMC2991140.

BOIANI, M.; SCHÖLER, H. Redes regulatórias em células-tronco pluripotentes derivadas de embriões. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** , v. 6, p. 872–881, 2005. DOI: 10.1038/nrm1744.

BOLLI, R. et al. Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. **The Lancet** , v. 378, n. 9806, p. 1847-1857, 2011. DOI: 10.1016/S0140-6736(11)61590-0. Epub 2011 Nov 14. Retraction in: **The Lancet** , v. 393, n. 10176, p. 1084, 2019.

BOLLI, R. et al. Intracoronary delivery of autologous cardiac stem cells improves cardiac function in a porcine model of chronic ischemic cardiomyopathy. **Circulation** , v. 128, n. 11, p. 1224-1233, 2013.

BRASIL. Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005. Regulamenta os incisos II, IV e V do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos geneticamente modificados - OGM e seus derivados. **Diário Oficial da União** , Brasília, DF, 28 mar. 2005. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/lei/l11105.htm>. Acesso em: 10 jul. 2024.

BURDEYRON, P. et al. Urine-derived stem/progenitor cells: A focus on their characterization and potential. **World Journal of Stem Cells** , v. 12, n. 10, p. 1080-1096, 2020. DOI: 10.4252/wjsc.v12.i10.1080.

CAPLAN, A. I. Células-tronco mesenquimais. **Journal of Orthopaedic Research** , Hoboken, v. 9, n. 5, p. 641-650, 1991. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jor.1100090504>>. Acesso em: 20 maio 2024.

Células-tronco | Biblioteca Virtual em Saúde MS. Disponível em: <https://bvsm.sau.gov.br/ataque-cardiaco-infarto/#:~:text=O%20infarto%20do%20mioc%C3%A1rdio%20ou,de%20forma%20s%C3%BAbita%20e%20intensa> . Acesso em: 20 maio 2024.

DA SILVA, Stéfani Kárita Lima; MARTINS, Paulo Roberto Queiroz. Fatores de transcrição relacionados à pluripotência: reprogramação celular. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde** , v. 16, n. 3, 2015.

DA VEIGA PEREIRA, Lygia. células-tronco: promessas e realidades da terapia celular. **Cadernos de História da Ciência** , v. 5, n. 2, 2009.

EINSTEIN (SÃO PAULO). Immediate analgesic effect of two modes of transcutaneous electrical nerve stimulation on patients with chronic low back pain: a randomized controlled trial. **Einstein (São Paulo)** , v. 18, n. 1, eAO5236, 2020. DOI: 10.31744/einstein_journal/2020AO5236.

ELE, Q. et al. Estudo comparativo de células-tronco mesenquimais da medula óssea e tecido adiposo de rato. **Turkish Journal of Biology** , v. 42, n. 6, art. 3, 2018.

FONTES, Rafael Barros et al. Impacto da terapia com células-tronco na regeneração do tecido cardíaco pós-infarto. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação** , v. 9, n. 7, p. 1716–1727, 2023. DOI: 10.51891/rease.v9i7.10784. Disponível em: <<https://periodicorease.pro.br/rease/article/view/10784>>. Acesso em: 2 ago. 2024.

FRIEDENSTEIN, A. J. et al. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. **Transplantation** , v. 6, n. 2, p. 230-247, 1968.

GNECCHI, Marco; ZHANG, Zhong; NI, Aimin; DZAU, Victor J. Mecanismos parácrinos na sinalização e terapia de células-tronco adultas. **Circulation Research**, v. 103, n. 11, p. 1204-1219, 21 nov. 2008. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.108.176826. PMID: 19028920; PMCID: PMC2667788.

HEUSCH, Gerd. SCIPIO brings new momentum to cardiac cell therapy. **The Lancet** , v. 378, n. 9806, p. 1827-1828, 2011.

HYUN, Insoo et al. The bioethics of stem cell research and therapy. **The Journal of Clinical Investigation** , v. 120, n. 1, p. 71-75, 2010.

JIANG, L. et al. Strategies and Challenges to Improve Cellular Programming-Based Approaches for Heart Regeneration Therapy. **International Journal of Molecular Sciences** , v. 21, n. 20, art. 7662, 2020. DOI: 10.3390/ijms21207662. PMID: 33081233; PMCID: PMC7589611.

KAMAL, M. et al. Fontes e estratégias terapêuticas de células-tronco mesenquimais na medicina regenerativa. In: HAIDER, K. H. (org.). **Manual de Terapia com Células-Tronco** . Singapura: Springer, 2022.

LEE, C. S. et al. Cardiovascular regeneration via stem cells and direct reprogramming: A review. **Korean Circulation Journal** , v. 52, n. 5, p. 341-353, 2022. DOI: 10.4070/kcj.2022.0005. PMID: 35502566; PMCID: PMC9064703.

LEE, SoHyun et al. Crosstalks between Raf-kinase inhibitor protein and cancer stem cell transcription factors (Oct4, KLF4, Sox2, Nanog). **Tumor Biology** , v. 39, n. 4, p. 1010428317692253, 2017.

LIN, C. Y. et al. Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc. **Cell** , v. 151, n. 1, p. 56-67, 2012. Disponível em: <[https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(12\)01128-0](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(12)01128-0)>. Acesso em: 25 jul. 2024.

MAKKAR, Raj R. et al. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomized phase 1 trial. **The Lancet** , v. 379, n. 9819, p. 895-904, 2012.

MARGIANA, R. et al. Aplicação clínica de células-tronco mesenquimais na medicina regenerativa: uma revisão narrativa. **Stem Cell Research & Therapy** , v. 13, art. 366, 2022. DOI: 10.1186/s13287-022-03054-0.

MATHIASSEN, Anders Bruun et al. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment in patients with severe ischaemic heart failure: a randomized placebo-controlled trial (MSC-HF trial). **European heart journal**, v. 36, n. 27, p. 1744-1753, 2015.

OLIVEIRA SILVA, Marinalva; TENÓRIO LEOI, Lélia Cristina. Banco de sangue de cordão umbilical e placentário no Brasil. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde** , v. 14, n. 2, p. 125-141, 2010.

PERIN, E. C. et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. **Circulation** , v. 107, p. 2294-2302, 2003.

PERIN, E. C. et al. Effect of transendocardial delivery of autologous bone marrow mononuclear cells on functional capacity, left ventricular function, and perfusion in chronic heart failure: the FOCUS-CCTRN trial. **JAMA** , v. 307, n. 16, p. 1717-1726, 25 abr. 2012.

POSS, Kenneth D. Avanços na compreensão da capacidade e mecanismos regenerativos de tecidos em animais. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 10, p. 710-722, 2010.

RODRÍGUEZ-FUENTES, David E. et al. Mesenchymal Stem Cells Current Clinical Applications: A Systematic Review. **Archives of Medical Research** , [S. l.], v. 52, n. 1, p. 93-101, 2021. DOI: 10.1016/j.arcmed.2020.08.006. Acesso em: 25 jul. 2024.

SCHETTERT, I. Ensaio clínico no Brasil para doenças cardíacas utilizando células-tronco. **Ciência & Saúde Coletiva** , [S. l.], v. 13, n. 1, p. 15-17, jan. 2008.

SILVA, A. A. R.; RODRIGUES, Cláudio Gabriel; SILVA, M. B. da. Avanços tecnológicos na criopreservação de células-tronco e tecidos, aplicados à terapia celular. **Revista da Biologia** , v. 17, n. 1, p. 13-18, 2017.

SILVA, A. et al. Comparação da progressão da senescência em células mesenquimais de parede de cordão umbilical humano medida por imunofluorescência e citometria de fluxo de p16 e p21. **Einstein (São Paulo)** , v. 18, eAO5236, 2020.

SOUZA, W. B. Criopreservação de células-tronco e suas aplicações. **Revista Brasileira de Ciência, Tecnologia e Inovação**, v. 1, n. 1, p. 45–56, 2014.

Souza, C. F. de ., Napoli, P. de ., Han, S. W., Lima, V. C. de ., & Carvalho, A. C. de C.. (2010). Células-tronco mesenquimais: células ideais para a regeneração cardíaca?. **Revista Brasileira De Cardiologia Invasiva**, 18(3), 344–353. <https://doi.org/10.1590/S2179-83972010000300019>

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** , v. 17, n. 3, p. 183-193, 2016.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell** , v. 126, n. 4, p. 663-676, 2006.

TAKEHARA, N. et al. O ensaio ALCADIA (células-tronco derivadas de coração humano autólogo para tratar cardiomiopatia isquêmica). **AHA** 2012; LBCT-20032.

THEUNISSEN, T. W.; JAENISCH, R. Molecular control of induced pluripotency. **Cell Stem Cell** , v. 14, n. 6, p. 720-734, 2014. DOI: 10.1016/j.stem.2014.05.002.

YACOUB, M. H.; TERROVITIS, J. CADUCEUS, SCIPPIO, ALCADIA: Cell therapy trials using cardiac-derived cells for patients with post-myocardial infarction LV dysfunction, still evolving. **Global Cardiology Science & Practice** v. 2013, n. 1, p. 5-8, 2013. DOI: 10.5339/gcsp.2013.3.

YAMANAKA, S. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. **Cell Stem Cell** , 2007.

ARTIGO**REGENERAÇÃO CARDÍACA E CÉLULAS-TRONCO: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**SOUZA, L.C. M.¹SILVA, V.L.²**RESUMO**

A regeneração cardíaca ainda é um grande desafio, com sua limitada capacidade de recuperação do coração após danos, tem impulsionado novas pesquisas em abordagens terapêuticas, principalmente com células-tronco. Essas células se destacam pela habilidade de se diferenciar em diversos tipos celulares, promovendo a regeneração dos tecidos. Elas mostram potencial na substituição de células cardíacas danificadas, na formação de novos vasos sanguíneos e na redução do tecido cicatricial. Estudos clínicos iniciais indicam que a administração dessas células pode melhorar a função cardíaca e aumentar a fração de ejeção, reduzindo a necessidade de cirurgias invasivas e oferecendo esperança para aqueles que necessitam de transplantes. Esses resultados sugerem uma regeneração tecidual promissora e um impacto positivo na recuperação do tecido cardíaco. Neste artigo, exploraremos os principais estudos realizados nessa área, que foram devidamente cadastrados no clinicaltrials.gov para garantir a segurança dos resultados obtidos, e as projeções para o futuro do uso de células-tronco na regeneração cardíaca.

ABSTRACT

¹ Leticia Candido Martins de Souza Graduanda do Curso de Biomedicina da Faculdade de Apucarana – FAP. Apucarana – Pr. 2024. Contato:

² Vinícius Lopes da Silva Orientador da pesquisa. Docente do Curso de Biomedicina da Faculdade de Apucarana – FAP. Apucarana – Pr. 2024. Contato: viniciuslopesbio@gmail.com

Cardiac regeneration remains a significant challenge, with its limited ability to recover after damage driving new research into therapeutic approaches, primarily using stem cells. These cells stand out for their ability to differentiate into various cell types, promoting tissue regeneration. They show potential in replacing damaged heart cells, forming new blood vessels, and reducing scar tissue. Initial clinical studies indicate that administering these cells may improve cardiac function and increase ejection fraction, reducing the need for invasive surgeries and offering hope for those in need of transplants. These results suggest promising tissue regeneration and a positive impact on cardiac tissue recovery. In this article, we will explore the key studies conducted in this area, which have been duly registered on clinicaltrials.gov to ensure the safety of the obtained results, and the projections for the future use of stem cells in cardiac regeneration.

Palavras-chave: Células-Tronco. Regeneração-Cardíaca. Terapia Celular.

INTRODUÇÃO

A regeneração do tecido cardíaco representa um dos principais desafios na medicina cardiovascular, especialmente para aqueles que sofrem de insuficiência cardíaca e outras condições cardíacas crônicas (BVSMS, 2008), com sua limitada capacidade do coração de se regenerar após danos ou infartos, têm sido motivado a busca por novas terapias que possam restaurar a função cardíaca e melhorar a qualidade de vida dos pacientes (Bergman, 2009). Nesse cenário, a terapia com células-tronco surge como uma abordagem promissora. Essas células primárias têm a capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares, além de possuírem propriedades de imunomodulação e auto-renovação, oferecendo um potencial singular para a regeneração de tecidos (Caplan, 1991).

Com grande diversidade, as células-tronco se dividem em alguns tipos, neste artigo nos concentramos em células-tronco adultas, as chamadas células-tronco mesenquimais, que podem ser extraídas de várias fontes, como a medula óssea, o tecido adiposo e o sangue do cordão umbilical (Backer e Carpenter, 2023). Também se destacam as células-tronco pluripotentes induzidas, que são geneticamente modificadas por fatores de transcrição conhecidos como

fatores Yamanaka (Yamanaka, 2007). A regeneração tecidual refere-se ao processo pelo qual o tecido danificado ou perdido é substituído por novo tecido, essencial para a recuperação após lesões, esse processo ocorre quando o tecido danificado é quase completamente renovado (Fontes et al., 2021). No entanto, nem todos os tecidos possuem essa habilidade, resultando na formação de cicatrizes ou na perda de função, como é o caso do músculo cardíaco e do tecido nervoso, que têm baixa capacidade regenerativa (Kamal et al., 2022). Para a regeneração cardíaca, o objetivo é utilizar células-tronco para substituir células cardíacas danificadas, promover a angiogênese e reduzir a formação de tecido cicatricial, ajudando assim a melhorar a fração de ejeção (Fontes et al., 2021).

As investigações sobre a utilização de células-tronco na regeneração cardíaca têm progredido consideravelmente, apresentando resultados promissores em modelos experimentais, tanto em animais quanto em humanos, como será discutido neste artigo em estudos clínicos iniciais (Bolli et al., 2011; Perin et al., 2003). Esses estudos demonstraram que a administração de células-tronco pode melhorar a função cardíaca, aumentar a fração de ejeção e reduzir biomarcadores relacionados a danos cardíacos (Mathiassen et al., 2015). Contudo, persistem desafios significativos, como a baixa sobrevivência celular, a variabilidade nos resultados devido ao número reduzido de pacientes nos estudos e a necessidade de assegurar a segurança e eficácia a longo prazo, evitando danos adicionais a outras patologias associadas (Perin et al., 2003; Mathiassen et al., 2015). O objetivo deste trabalho é analisar a aplicação de células-tronco na terapia de regeneração de tecidos, explorando sua viabilidade, métodos de aplicação e impacto na qualidade de vida dos pacientes. Serão abordados os principais tratamentos que utilizam células-tronco para a regeneração cardíaca, bem como os desafios enfrentados nas pesquisas relacionadas a essa técnica, buscando destacar o potencial promissor dessa abordagem no tratamento de doenças degenerativas.

METODOLOGIA

Tratou-se de uma pesquisa de revisão bibliográfica de forma eletrônica, onde foram encontrados 340 artigos sobre o critério do uso das palavras-chave: células-tronco; regeneração cardíaca; terapia celular, durante os anos de 2000 a 2024. E utilização dos princípios de exclusão todos os artigos que não condizem

totalmente ao tema e pesquisas realizadas em humanos não cadastradas no clinicaltrials.gov. Restando 80 artigos para leitura e sendo utilizado para pesquisa 20 artigos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Células-tronco Mesenquimais

Considerado o pai das células-tronco mesenquimais, Caplan (1991) refere-se às células-tronco mesenquimais como células adultas retiradas de vários tecidos como medula óssea, sangue, tecido adiposo, cordão umbilical, tendo capacidade de se diferenciar em outros tipos celulares a partir de modificação *in vitro* por fatores de transcrição genéticos (Caplan 1991; Yamanaka et. al 2007; Backer e Carpenter, 2023) as células somáticas, futuras células-tronco mesenquimais são reprogramadas com esses fatores, entrando em um estado pluripotente, facilitando assim a criação de células-tronco com qualquer células retirada desses locais citados acima e conservadas em criogenia, um método de congelamento que preserva as estruturas dessas células utilizando nitrogênio e garantindo que no futuro essas células estão intactas para seu uso (Souza 2014)

Por conta de sua capacidade de imunomodulação, essas células são fundamentais para o desenvolvimento e reparo do organismo (Caplan 1991), os fatores parácrinos auxiliam na proliferação de células já existentes no organismo, modulando o microambiente para esse crescimento (Backer e Carpenter, 2023). Essas células também tem a capacidade de modular respostas imunes do organismo, auxiliando na inflamação e na redução de danos nos tecidos, reduzindo a liberação de citocinas inflamatórias, diminuindo a atividade dos linfócitos T e as NK (natural killer), tornando a terapia com células-tronco efetivas na reconstituição de tecidos (Rodriguez- Fuentes et al 2021).

Essas células mesenquimatosas retiradas da medula óssea e modificada em laboratório para sua proliferação , foram utilizadas pela primeira vez no Brasil pelos pesquisadores da UFRJ com a liderança de Perin e seus colaboradores em 2003, onde em conjunto com uma Universidade do Texas e o Hospital após Cardíaco testaram injeções de células-tronco em humanos com cardiopatias, sendo considerados um dos pioneiros nos primeiros testes em humanos.

Regeneração tecidual

A regeneração celular é um processo biológico fundamental em diversos organismos, permitindo a modificação de tecidos e células danificadas ou perdidas. Em seres humanos, ainda que limitada, a regeneração acontece em alguns órgãos, como o fígado, que tem uma capacidade notável de se regenerar após danos significativos (Takeda; Kozai, 2020). Essa área atua na restauração por completo da estrutura e funções desses tecidos perdidos, trazendo de volta a sua funcionalidade, sendo fundamental para a homeostase e recuperações de lesões de um organismo (Takahashi, Yamanaka, 2006)

O uso de células-tronco, que se diferenciam em diversos tipos celulares específicos naquela região para a reconstrução desse tecido, são adicionadas ao local e mobilizadas, a fim de cumprir seu papel. Citocinas, os fatores de crescimento e a matriz extracelular ajudam a sinalizar e modular as atividades auxiliando na migração dessas células.(Fontes et. al 2021) Para essa regeneração acontecer, são passados vários processos complexos, com a proliferação celular, diferenciação, angiogênese e a remodelação da matriz extracelular.

A utilização das células-tronco mesenquimais vem sendo investigada em várias condições médicas como: lesões musculoesqueléticas, cardiopatias, distúrbios neurológicos, problemas pulmonares e no tratamento de queimaduras e feridas na pele. Os primeiros resultados de pesquisas e testes clínicos têm sido promissores, demonstrando avanços significativos na função dos tecidos afetados, alívio da dor e melhoria na qualidade de vida dos indivíduos.(Kamal, et. al 2022, Yacoub et. al 2013, Bolli et al 2013)

Células-tronco na regeneração cardíaca

O impacto que as doenças cardiovasculares vêm causando é impressionante, sendo a principal causa de morte mundial desde meados da última década com projeções para até 2030 (Schettert, 2008). De acordo com a Biblioteca Virtual em Saúde (BVSMS, 2018) O infarto do miocárdio, também conhecido como ataque cardíaco, ocorre quando o fluxo sanguíneo para de circular por um tempo significativo para uma parte do coração, causando sérios danos e até a morte do tecido cardíaco, devido a falta de oxigênio circulante. O infarto está na maioria das

vezes associado a formação de coágulos na artéria coronária, posicionada nas paredes do ventrículo esquerdo (local comumente mais afetado durante o infarto de miocárdio), onde previamente foi danificada por ateromas (placas de gordura), impedindo a passagem sanguínea e criando esses coágulos.

Métodos comumente utilizados nessa situação, são a intervenção cirúrgica, intervenções medicamentosas, e os testes sobre a regeneração com células-tronco, que surgiu sendo uma abordagem promissora no tratamento para minimização de danos na área de cardiologia (BVSMS, 2018). Gnechchi e seus colaboradores em sua pesquisa de 2008, cita que os três principais pilares para a ação das células-tronco adultas no reparo cardíaco são a regeneração de cardiomiócitos, a vasculogênese e as ações parácrinas. As células-tronco mesenquimatosas, em particular, são capazes de produzir e liberar uma ampla gama de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (Lee et al. 2022). Um efeito parácrino imediato das células-tronco em ambientes isquêmicos é a liberação de moléculas citoprotetoras, que promovem a sobrevivência dos cardiomiócitos (Jiang 2020).

A funcionalidade total vem sendo um desafio crítico nas células transplantadas, já que ainda são consideradas limitadas, elas precisam formar conexões elétricas com as células cardíacas já existentes para que a função cardíaca seja totalmente restaurada (Jiang, 2020) A introdução de novas células no tecido cardíaco pode provocar arritmias, uma vez que a integração elétrica pode ser imperfeita.

Os estudos utilizando células-tronco da medula óssea em cardiopatias começaram no Brasil por Perin et al. (2003) onde conduziram um estudo injetando células-tronco mesenquimais retiradas da medula óssea diretamente no coração de pacientes com doenças cardíacas. Perin e seus colaboradores (2011), após o fim dos primeiros estudos do ensaio chamado FOCUS-CCTRN, concluíram que as injeções contendo as células-tronco injetadas auxiliaram na melhora de sintomas de cardiopatias, sendo um sucesso e não contendo eventos inesperados graves, garantindo a segurança do procedimento.

As pesquisas de Bolli et al. (2011) feitas em humanos com cardiopatias veio sendo pioneiro nesse ramo da pesquisa, antes sendo testadas em ratos e porcos. Bolli (2011) inicia pesquisas em pacientes com cardiopatias que após três meses do infarto do miocárdio, esses pacientes foram tratados com uma injeção contendo células-tronco cardíacas autólogas retiradas do tecido adiposo, medula óssea ou até

tecidos neonatais, sendo o estudo SCIPPIO que levou as pesquisas sobre células-tronco na regeneração cardíaca a ser de grande expectativa no mundo. (Yacoub, Terrovitis 2013)

A pesquisas realizadas em humanos mais conhecidas, sendo elas: CADUCEU (Makkar et. al 2012) SCIPPIO (Bolli et.al 2011) FOCUS-CCTRN (Perin et.al 2012) ALCADIA (takehara, 2012) MSC-HF (Mathiassen et.al 2015) foram consideradas as mais importantes descobertas de resultados sobre terapias com células-tronco na regeneração cardíaca, promovendo no meio científico uma nova promessa as doenças antes consideradas de difícil tratamento.

Para a realização do tratamento, as células são obtidas do próprio paciente ou de doadores e, em seguida, cultivadas in vitro. Durante esse processo, as células são moduladas para diferenciação em cardiomiócitos e são adicionados fatores de crescimento para promover sua proliferação, um procedimento que leva de 15 a 20 dias. A administração dessas células ocorre por meio de injeções intracoronárias ou endocárdicas, utilizando técnicas como angioplastia ou o sistema NOGA, que consiste em um cateter de mapeamento eletromecânico, assegurando que as células sejam direcionadas ao local apropriado de aplicação (Perin et al. 2012). Após o procedimento, os pacientes são liberados para suas residências após um dia de observação e são monitorados a cada três meses por meio de exames, a fim de garantir a saúde e a funcionalidade da terapia.

Um estudo realizado por Fontes et. al (2023) reuniu resultados sobre a administração de células-tronco para a regeneração cardíaca pós-infarto desses estudos, mostrando a eficácia dessas células, onde a fração de ejeção melhorou significativamente indicando que a capacidade de bombeamento voltou a funcionar perfeitamente (acima de 45%), tendo maior eficiência na distribuição sanguínea. a diminuição de falhas e arritmias também diminuíram, provando que a terapia com células-tronco foi realizada com sucesso.

Sobre a análise da angiogênese, mostrou as atividades dos capilares abastecidos com células-tronco, indicando melhora e reconstrução de vasos sanguíneos, sendo provado esses feitos com alguns exames de ressonância e técnicas não invasivas, como ultrassons e exames de sangue (Fontes et.al 2023) A resposta imunológica revela um aumento na modulação da resposta a inflamação causada pelo infarto, as citocinas tiveram uma redução expressiva de suas concentrações após a terapia, indicando que as células com suas propriedades

imunomoduladoras contribuem para a redução da inflamação e a controlando, diminuindo os níveis dos biomarcadores do infarto CK-MB e troponina. (Mathiasen, et. al 2015; Bolli et.al 2013)

Em todos os estudos notou-se também a redução nas cicatrizes causadas pelo infarto, fazendo que o tecido local volte a ter funcionalidade e se torne mais espesso (Fontes, et. al 2023)

Jiang e seus colaboradores (2020) afirmam que, para que a terapia com células-tronco seja acessível a todos, é crucial desenvolver métodos para a produção em larga escala dessas células. Esse processo envolve o cultivo e a diferenciação de grandes volumes de células, garantindo qualidade e consistência. Tecnologias avançadas e sistemas automatizados estão sendo elaborados por meio da bioengenharia de tecidos, para atender a essa demanda crescente. No entanto, os altos custos de produção e processamento das células-tronco dificultam o acesso a essas terapias. A redução dos custos pode ser alcançada por meio da otimização dos métodos de produção, da utilização de técnicas mais econômicas e do desenvolvimento de plataformas comerciais viáveis para o cultivo celular, que recentemente começaram a surgir no mercado (Jiang et al. 2020).

Outro desafio significativo mostrado nos estudos de Rodriguez et al. (2021) e Mathiasen et. al (2015) é a imunogenicidade das células-tronco, que é a capacidade dessas células de desencadear uma resposta imunológica no receptor, podendo levar à rejeição. As células-tronco alogênicas, que não são derivadas do próprio paciente, têm um maior risco de serem reconhecidas como "estranhas" pelo sistema imunológico, resultando em rejeição.

CONCLUSÃO

As pesquisas sobre a regeneração cardíaca por meio das células-tronco mostram um potencial significativo para revolucionar o tratamento da insuficiência cardíaca e outras doenças cardiovasculares. Estes estudos indicam que a aplicação de células-tronco mesenquimatosas, podem resultar em melhorias notáveis na função cardíaca, incluindo o aumento da fração de ejeção para níveis superiores a 45%, redução do tecido cicatricial, promoção da angiogênese e diminuição dos biomarcadores de infarto, como troponina e CK-MB. Esses resultados sugerem uma regeneração tecidual promissora e um impacto positivo na recuperação do tecido

cardíaco. A padronização dos métodos de isolamento e administração das células-tronco e a definição de protocolos claros para a seleção de pacientes, são cruciais para garantir a eficácia e segurança da terapia. Com progresso contínuo é possível que essa terapia em breve forneça soluções eficazes e seguras para condições que afetam milhões de pessoas no mundo, além de outras patologias em que as células-tronco possam ser uma alternativa viável.

REFERÊNCIAS

BARKER, Roger A. et al. Lições aprendidas, e ainda a aprender, em primeiros ensaios com células-tronco humanas. **Stem Cell Reports**, v. 18, n. 8, p. 1599-1609, 2023.

BERGMANN, O. et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. **Science**, v. 324, n. 5923, p. 98-102, 2009. DOI: 10.1126/science.1164680. PMID: 19342590; PMCID: PMC2991140.

BOLLI, R. et al. Cardiac stem cells in patients com ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. **The Lancet**, v. 378, n. 9806, p. 1847-1857, 2011. DOI: 10.1016/S0140-6736(11)61590-0. Epub 2011 Nov 14. Retraction in: **The Lancet**, v. 393, n. 10176, p. 1084, 2019.

BOLLI, R. et al. Intracoronary delivery of autologous cardiac stem cells improves cardiac function in a porcine model of chronic ischemic cardiomyopathy. **Circulation**, v. 128, n. 11, p. 1224-1233, 2013.

CAPLAN, A. I. Células-tronco mesenquimais. **Journal of Orthopaedic Research**, Hoboken, v. 9, n. 5, p. 641-650, 1991. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jor.1100090504>>. Acesso em: 20 maio 2024.

FONTES, Rafael Barros et al. Impacto da terapia com células-tronco na regeneração do tecido cardíaco pós-infarto. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 9, n. 7, p. 1716–1727, 2023. DOI: 10.51891/rease.v9i7.10784. Disponível em: <<https://periodicorease.pro.br/rease/article/view/10784>>. Acesso em: 2 ago. 2024.

HEUSCH, Gerd. SCIPIO brings new momentum to cardiac cell therapy. **The Lancet**, v. 378, n. 9806, p. 1827-1828, 2011.

JIANG, L. et al. Strategies and Challenges to Improve Cellular Programming-Based Approaches for Heart Regeneration Therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 20, art. 7662, 2020. DOI: 10.3390/ijms21207662. PMID: 33081233; PMCID: PMC7589611.

KAMAL, M. et al. Fontes e estratégias terapêuticas de células-tronco mesenquimais na medicina regenerativa. In: HAIDER, K. H. (org.). **Manual de Terapia com Células-Tronco**. Singapura: Springer, 2022.

LEE, C. S. et al. Cardiovascular regeneration via stem cells and direct reprogramming: A review. **Korean Circulation Journal**, v. 52, n. 5, p. 341-353, 2022. DOI: 10.4070/kcj.2022.0005. PMID: 35502566; PMCID: PMC9064703.

MATHIASSEN, Anders Bruun et al. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment in patients with severe ischaemic heart failure: a randomized placebo-controlled trial (MSC-HF trial). **European heart journal**, v. 36, n. 27, p. 1744-1753, 2015.

PERIN, E. C. et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. **Circulation**, v. 107, p. 2294-2302, 2003.

PERIN, E. C. et al. Effect of transendocardial delivery of autologous bone marrow mononuclear cells on functional capacity, left ventricular function, and perfusion in chronic heart failure: the FOCUS-CCTRN trial. **JAMA**, v. 307, n. 16, p. 1717-1726, 25 abr. 2012.

RODRÍGUEZ-FUENTES, David E. et al. Mesenchymal Stem Cells Current Clinical Applications: A Systematic Review. **Archives of Medical Research**, [S. l.], v. 52, n. 1, p. 93-101, 2021. DOI: 10.1016/j.arcmed.2020.08.006. Acesso em: 25 jul. 2024.

SCHETTERT, I. Ensaios clínicos no Brasil para doenças cardíacas utilizando células-tronco. **Ciência & Saúde Coletiva**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 15-17, jan. 2008.

SOUZA, W. B. Criopreservação de células-tronco e suas aplicações. **Revista Brasileira de Ciência, Tecnologia e Inovação**, v. 1, n. 1, p. 45–56, 2014.

TAKEHARA, N. et al. O ensaio ALCADIA (células-tronco derivadas de coração humano autólogo para tratar cardiomiopatia isquêmica). **AHA 2012; LBCT-20032**.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 17, n. 3, p. 183-193, 2016.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 663-676, 2006.

YACOUB, M. H.; TERROVITIS, J. CADUCEUS, SCIPIO, ALCADIA: Cell therapy trials using cardiac-derived cells for patients with post-myocardial infarction LV dysfunction, still evolving. **Global Cardiology Science & Practice**, v. 2013, n. 1, p. 5-8, 2013. DOI: 10.5339/gcsp.2013.3.

ANEXOS

NORMAS PARA A PUBLICAÇÃO DE ARTIGOS - REVISTA F@PCIÊNCIA

Os artigos encaminhados serão submetidos à avaliação de até três consultores, especialistas na área atinente à temática do artigo, e a aprovação do Comitê Editorial da F@P CIÊNCIA, com base nas Normas Próprias de Publicação da Revista Eletrônica. O ISSN da revista eletrônica é 1984-2333 e o título abreviado é F@P Cien., forma que deve ser usada em bibliografias, notas de rodapé, referências e legendas bibliográficas. Serão aceitos trabalhos para as seguintes seções: (1) Revisão – revisão da literatura; (2) Artigos – resultado de pesquisa de natureza empírica, experimental ou conceitual (mínimo de 05 e o máximo de 12 laudas); (3) Notas – nota prévia, relatando resultados parciais ou preliminares de pesquisa; (4) Resenhas – resenha crítica de livro (As Resenhas poderão ter no máximo três páginas e deverão tratar de livros publicados nos últimos 05 anos); (5) Fórum – seção destinada à publicação de 2 a 3 artigos coordenados entre si, de diferentes autores, e versando sobre tema de interesse atual. Os autores devem submeter os manuscritos no formato eletrônico, exclusivamente, por meio do endereço fapciencia@fap.com.br, já configurados para o papel A4, observando as seguintes indicações do arquivo: - salvo em modo “doc” ou “rtf”; - margens sup/esq de 3 cm e inf/dir de 2 cm; - fonte Arial 12 no corpo do texto. (Em nota de rodapé, a fonte é Times New Roman 10, alinhada à esquerda); - espaçamento entre linhas de 1,5 cm. Os textos deverão ser escritos em português e as figuras, gráficos e tabelas, se necessários, devem ser incluídos diretamente no texto no formato JPG, JPEG ou GIF, nos locais adequados e não em anexo, seguindo as normas da ABNT. Veja o modelo no Guia de Normas Trabalhos Acadêmicos, no site da FAP.