

QUANTIFICAÇÃO ATRIAL DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA (CMMO) INFUNDIDAS VIA INTRAPERICÁRDICA EM SUÍNOS SUBMETIDOS A INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO

[Atrial quantification of bone marrow mononuclear cells (BMMC) infused by intrapericardic route in swine submitted to myocardial infarction]

Érika Branco^{1,*}, Ana Flávia Carvalho², Emerson Ticona Fioretto³, Rosa Cabral⁴, Guilherme Buzon Gregores⁵, Guilherme José Ferreira⁵, Carlos Alberto Palmeira Sarmiento⁶, Vivian Y. Samoto⁷, Cristiano de Carvalho Balieiro², Maria Angelica Miglino⁶

¹Instituto de Saúde e Produção Animal – ISPA, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Campus de Belém, Belém, PA, Brasil.

²Departamento de Morfofisiologia, FMV, UniFeob, São João da Boa Vista, SP, Brasil.

³Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Morfologia, UFSE, Aracajú, SE, Brasil.

⁴Centro de Ciências Agrária, FMV, UFPI, Campus de Teresina, Teresina, PI, Brasil.

⁵ Centro de Ciências Agrária, FMV, UFPI, Campus “Profª. Cinobelina Elvas” – CPCE – UFPI, Bom Jesus, PI, Brasil.

⁶Departamento de Cirurgia, FMVZ, USP, São Paulo, SP, Brasil.

⁷Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

RESUMO - Nas últimas décadas a medicina regenerativa tem se destacado em todo o mundo, graças ao surgimento da terapia com células-tronco, as quais tem grande capacidade de diferenciação em diversos tipos de linhagens celulares, reconstruindo tecidos lesados. A medula óssea, fonte das células utilizadas nesse estudo, contém células-tronco adultas, hematopoiéticas e mesenquimais, pertencentes ao grupo de células mononucleares, que dentre outras funções, são capazes de levar ao remodelamento cardíaco pós processo isquêmico, e para tanto, podem ser introduzidas no coração sob algumas vias de infusão, sendo que a mais recentemente estudada foi a via intrapericárdica, a qual foi eleita para o desenvolvimento deste estudo, sendo utilizados 6 suínos, fêmeas, com média de peso de 25Kg, divididos em 2 grupos: 3 animais induzidos ao infarto agudo do miocárdio e tratados com células mononucleares de medula óssea, e 3 animais que apenas receberam as mesmas células, porém não foram induzidos ao infarto (animais controle). As células mononucleares da medula óssea foram coletadas e separadas por densidade Ficoll, marcadas com fluorocromo Hoechst® e infundidas via intrapericárdica. Após analisarmos os átrios dos animais dos 2 grupos, percebemos que houve uma distribuição homogênea, independente da presença de fator quimiotático no grupo dos animais infartados e que as células foram capazes de sair do espaço pericárdico e transmuralmente ocupar toda a estratigrafia cardíaca. Não houve diferença significativa na quantidade de células encontradas, $p > 0,01$, quando comparamos átrios de animais infartados *versus* átrios de animais não infartados.

Palavras-Chave: Terapia celular, via de infusão cardíaca, células-tronco.

ABSTRACT - In the last decades, the regenerative medicine have been applied and investigated worldwide due to the stem cell therapy, which has shown high capacity of differentiation into a diverse cell lineage, restoring damaged tissues. In this study we applied bone marrow, which contains adult stem cells, hematopoietic and mesenchymal lineages. Mesenchymal lineage belongs to the mononuclear cell group that among its function, have demonstrated capacity for cardiac remodeling after ischemic processes and, can be introduced into the heart by infusion techniques like intrapericardic technique which has been investigated lately. In this study we investigated the application of intrapericardic technique for mononuclear cell infusion in swine induced to myocardial infarction. We used 6 female swine, averaging 25 kg distributed into control group (3 animals) and experimental group (3 animals), which animal were induced to infarction and received mononuclear cell infusion by intrapericardic technique. Control group received only mononuclear cell infusion by the same technique in normal heart. Mononuclear cells were obtained by Ficoll density and were stained by Hoescht fluorochrome. Atria analysis in both groups revealed a homogeneous distribution of the infused cells in the atria with no significant difference, $p > 0.01$ between control and experimental group.

Keywords: Cell therapy, rote infusion, stem cells.

* Autor para correspondência. E-mail: erika.branco@ufra.edu.br.

INTRODUÇÃO

A oclusão das artérias do coração é a maior causa de falência cardíaca, gerando a perda do fluxo sanguíneo, o que conseqüentemente resulta na isquemia, infarto, necrose e por fim, um remodelamento tecidual, afetando o funcionamento do miocárdio (Pontes & Leães, 2004).

Tendo em vista o elevado índice desta patologia, desde o início do século XXI, o transplante de células-tronco (CT) tem emergido como uma alta modalidade para o tratamento de doenças cardiovasculares, devido à sua habilidade para induzir neovascularização e formação de novo tecido (Heeschen et al., 2004; Tateishi-Yuyama et al., 2002).

Atuam neste processo citocinas, fatores de crescimento e a sua interação com a célula hospedeira, ou seja, a diferenciação de uma célula-tronco para uma determinada linhagem celular está estritamente relacionada com o microambiente em que ela se encontra (Poulson et al., 2002), e de acordo com Zago e Covas (2006), essa diferenciação se dá por três características: são células indiferenciadas e não-especializadas, são capazes de se multiplicar por longos períodos mantendo-se indiferenciadas, de forma que um pequeno número pode originar uma grande população de células semelhantes e por fim, podem se diferenciar em células especializadas de um tecido particular. Entretanto, descobriu-se que células ainda não-diferenciadas (*stem cells* ou células-tronco) presentes, por exemplo, na medula óssea ou no cordão umbilical de um recém-nascido podem manter a capacidade de diferenciar-se em outros tecidos como o muscular ou o nervoso (Zats 2002).

Vários tipos celulares estão sendo analisados para o tratamento do infarto do miocárdio sendo que a maioria deles emprega a utilização de células adultas, como o mioblasto esquelético, que tem por característica ser mais resistente a hipóxia em relação ao cardiomiócito, contudo, quando enxertado no tecido, pela ausência das junções conexas 43, levam a processos de arritmias nos pacientes (Pouzet et al., 2002).

Outro tipo celular que tem sido empregado em estudos cardíacos são as células mesenquimais, cujo alvo é a restrição da área de remodelamento devido aos seus efeitos imunomodulatórios (Koc & Lazarus, 2001; Fukuda, 2001) bem como a grande capacidade de diferenciação (Giordano et al., 2007).

As células mononucleares da medula óssea (CMMO), que são obtidas através da punção medular, compostas por um agrupamento de células sanguíneas imaturas e das sub-populações de células-tronco estromais e hematopoéticas que derivam de uma célula primitiva precursora, também tem sido largamente utilizadas nos estudos dos tratamentos das cardiomiopatias esquêmicas (Poulson et al., 2002). Pesquisas com estas células contam com literatura consistente, nos quais foram utilizados modelos de isquemia cardíaca aguda e crônica, que foram conduzidos em diversos animais utilizando as vias intracoronariana, via transendocárdica e via transepicárdica para infusão celular (Leite & Dohmann 2004), porém, pouco se sabe sobre a desenvoltura da via intrapericárdica, a qual foi estudada para fins de infusão de drogas (Kolettis et al., 2005) e recentemente, também em suínos, avaliada quanto a infusão de CMMO apenas em áreas ventriculares infartadas (Branco, 2007).

Assim, considerando os motivos aludidos, o presente trabalho propôs estudar a quantificação de células mononucleares de medula óssea infundidas via intrapericárdica em átrios de suínos infartados.

MATERIAL E MÉTODOS

Todo procedimento esteve de acordo com as normas do Comitê de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo, sob o processo de nº 750/2005.

Foram utilizados 6 animais, fêmeas com média de peso de 25kg, os quais foram divididos em 2 grupos, sendo 3 animais induzidos ao infarto agudo do miocárdio e tratados com infusão de CMMO (grupo tratado) e 3 animais que apenas receberam as CMMO (grupo controle). A infusão celular, nos 2 grupos, foi feita pela via intrapericárdica.

Coleta e separação das CMMO

Para todos os fins cirúrgicos, os animais foram pré-anestesiados com Cloridrato de Ketamina (Dopalen[®] - Vetbrand) na dose de 3 mg/Kg associada a Midazolam (Dormire[®] - Cristália) na dose de 0,5mg/Kg via intramuscular e induzidos com Propofol (Propovan[®] - Cristália), na dose de 5mg/Kg Intravenoso. Em seguida realizou-se a intubação oro-traqueal com sonda adequada a cada animal. A manutenção anestésica foi realizada com anestesia geral inalatória utilizando-se Isoflurano (Isoforine[®] - Cristália) através do Shoogun Evolution 2700[®] (Takaoka), e foi utilizada Ventilação Controlada à

Volume (8ml/Kg) e PEEP = 5cm H₂O.

As células foram obtidas adaptando-se a técnica de coleta descrita por CROW; WALSHAW, (2000), através da punção da crista íliaca com agulha para punção óssea, utilizada em humanos - Tamanho 11 x 10,2cm (HS Trapsystem[®] - MEDICAL) acoplada a um total de 6 seringas de 10ml, Luer-lock (BD) contendo heparina sódica (Herin[®] - Prodotti Laboratório Farmacêutico Ltda), e por pressão negativa foram aspiradas aproximadamente 60ml de medula óssea de cada animal, que foi separada por gradiente de densidade Ficoll-PaqueTMPlus[®] (Amershan Bioscience – n° cat 17-1440-03) e marcadas com fluorocromo Hoechst 33258[®] (Sigma-Aldrisch – n° cat 861405).

Indução do infarto agudo do miocárdio e acesso da via intrapericárdica

O infarto foi induzido através do uso de cateter balão introduzido pela artéria femoral, posicionado após o primeiro ramo diagonal da artéria coronária esquerda, com auxílio de imagem através de fluoroscopia (Fluoroscópio Philips BV Pulsera) e mantido inflado com 2atm por 45 minutos, com o intuito de promover o infarto devido à interrupção do fluxo sanguíneo, uma vez que este período é suficiente para promover a morte tecidual (Hou et al., 2005) (Figura 1A e B).

Após este período os animais receberam via intrapericárdica, (Figura 1C), acessada pela região mediana pré-umbilical com agulha epidural Tuohy, 3x10⁸ células marcadas. Essa quantidade de células foi também aplicada ao grupo controle e todos os animais foram mantidos vivos por período de 21 dias, e na sequência foram ortotansados com

infusão intravenosa contínua de cloreto de potássio e o coração foi coletado e fracionado em regiões: átrio, basal, medial e apical, porém, para este estudo, nos atemos somente aos átrios, tendo em vista que os ventrículos foram alvo de outro estudo deste grupo de pesquisa.

Parte dos átrios foi encaminhado para análise por microscopia de luz com as colorações de hematoxilina-eosina e tricromico de Masson, sob fixação por formaldeído 10% em tampão fosfato para a descrição histopatológica e a outra metade foi criopreservada a -80°C e destinada a análise quantitativa, no qual os fragmentos foram cortados em criostato Leica[®] CM 1850 com espessura 5µm, em lâminas previamente silanizadas seguindo-se o padrão de coleta de 10 cortes totais de cada fragmento, desprezando-se 9 cortes e colhendo-se um de maneira seqüencial. Em seguida, os cortes foram fixados as lâminas com acetona PA e contraincorados com azul de Evans.

As células Hoechst[®] positivas foram visualizadas por microscopia de epifluorescência, em microscópio semi-confocal Apotome Imager Z I (Carl Zeiss).

Análise Estatística

Os resultados foram analisados no PROC MEANS do programa *Statistical Analysis System*, versão 9.1.

RESULTADOS

Independente dos átrios não terem sido acometidos pelo infarto, notamos uma boa infiltração de CMMO tanto do lado esquerdo, quanto do lado direito e tanto no grupo tratado, quanto no grupo controle, sendo possível notar agregados de células

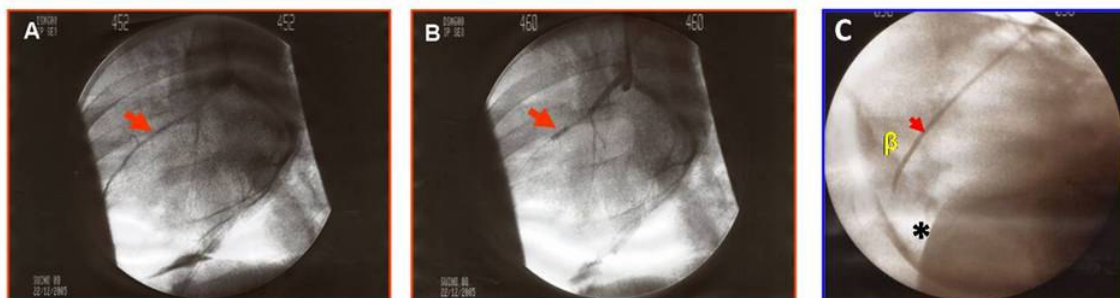


Figura 1: Imagem radiográfica por fluoroscopia do ramo descendente da artéria coronária esquerda contrastada (seta) (A) e o mesmo ramo com fluxo interrompido, pós posicionamento do cateter balão (seta) (B); Local de infusão das células mononucleares da medula óssea (espaço pericárdico - asterisco) conforme visualização pela fluoroscopia. Agulha peridural (seta vermelha) e contraste iodado (β).

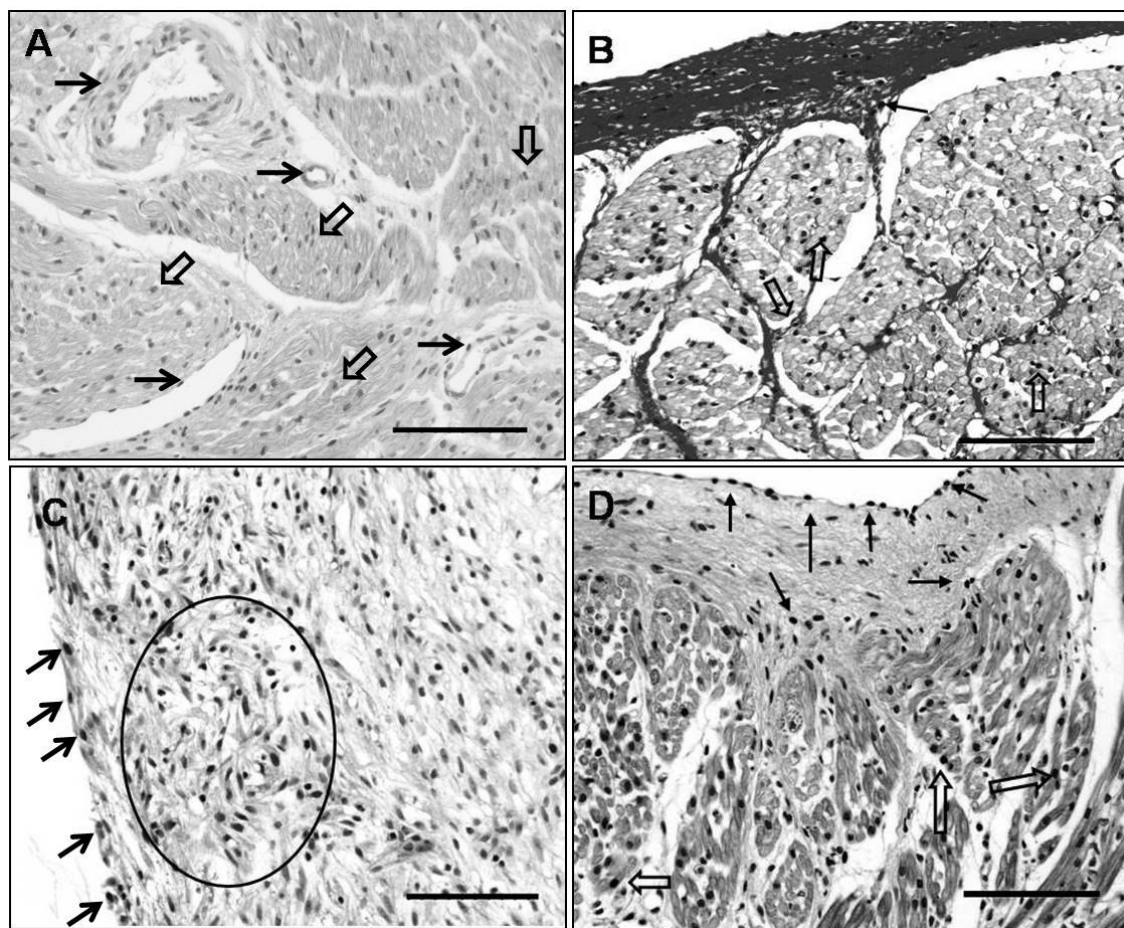


Figura 2: Fotomicrografia do átrio suíno infartado e tratado (A e C) e não infartado (grupo controle) (B e D). Observar: (A) – átrio esquerdo de animal infartado, com grande concentração de células mononucleares dispostas pelo miocárdio (setas vazadas) e ao redor de vasos (setas). Coloração de H.E.; (B) – átrio esquerdo de animal não infartado, com células entre fibras do miocárdio (seta vazada) e concentração de células mononucleares em epicárdio (seta). Coloração de tricrômio de Masson; (C) – átrio direito de animal infartado com uma grande concentração de células mononucleares por todo o epicárdio (setas) e início de miocárdio (círculo). Coloração de tricrômio de Masson; (D) – átrio direito de animal não infartado com células dispostas em epicárdio (seta) e grupos de células mononucleares entre fibras do miocárdio (seta vazada). Coloração de H.E.. Barras = 100µm.

mononucleares na parede dos vasos sanguíneos, tecido conjuntivo adjacente, epicárdio, endocárdio, miocárdio e um grande infiltrado de células no endotélio vascular, sugerindo um possível estímulo de liberação de fatores de crescimento e angiogênico no que tange os vasos de mínimo calibre (Figura 2A, B, C e D).

Na epifluorescência notar presença de células mononucleares próximo à epicárdio, inseridas as fibras miocárdicas em animal infartado e tratado

(Figura 3A), bem como corte transversal de vaso com células mononucleares de medula óssea em átrio esquerdo (Figura 3B).

Os números de observações e as estimativas de médias, desvios padrão, coeficientes de variação, valores de mínimo e máximo para as variáveis, número de células localizadas no Átrio direito ou esquerdo, encontram-se na Tabela 1, na qual não foi evidenciada diferença significativa ($P>0,01$).

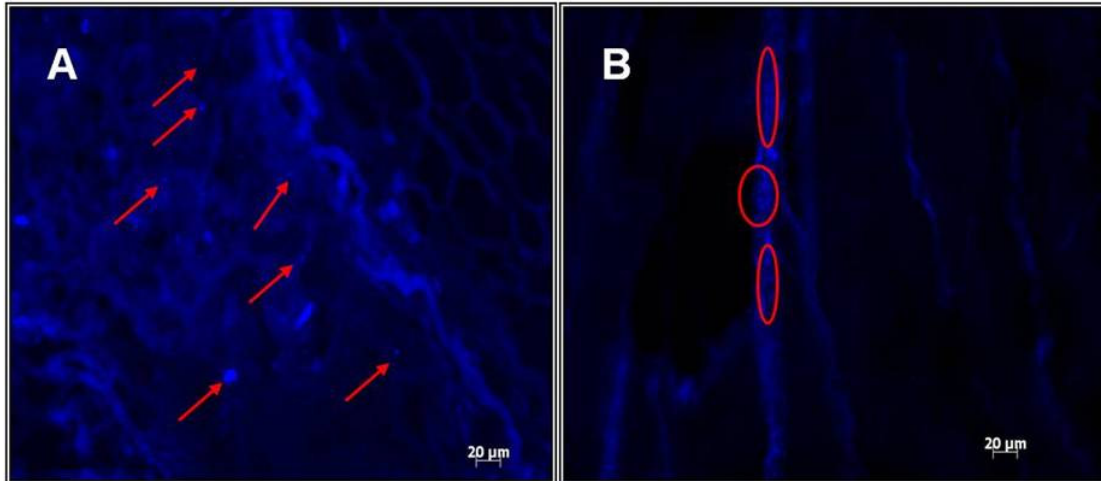


Figura. 3. Fotomicrografias de Epifluorescência do átrio esquerdo de animal infartado e tratado (A) e átrio direito de animal não infartado (grupo controle) (B). Observar: (A) – presença de células mononucleares próximas ao epicárdio, e miocárdio (seta); (B) – corte transversal de vaso repleto de células mononucleares de medula óssea (círculos). Coloração de Azul de Evans. Barra: 20µm.

Tabela 1. Números de observações (N), médias (MED), desvios padrão (DP), coeficientes de variação (CV), valores de mínimo (MIN) e máximo (MAX) para o variável número de células localizadas no Átrio direito ou esquerdo.

Variável	N	MED	DP	CV	MIN	MAX
CONT						
AD	3	924,67	49,34	5,34	869,00	963,00
AE	3	916,67	34,53	3,77	877,00	940,00
TRAT						
AD	3	1.944,67	1.062,30	54,63	914,00	3.036,00
AE	3	1.547,00	509,29	32,92	965,00	1.911,00

CONT= animais controle; TRAT = animais tratados; AD= número de células no átrio direito; AE = número de células no átrio esquerdo.

DISCUSSÃO

A via intrapericárdica é algo recentemente estudado por Branco (2007) para fins de infusão de CMMO, sendo anteriormente estudada apenas para administração de medicamentos (Mannam et al., 2002; Kolettis et al., 2005) e para infusão de fatores de crescimento na tentativa de favorecer a

angiogênese miocárdica (Kornowski et al., 2000). Por conseguinte, não existem dados comparativos de outros experimentos valendo-se desta via, no que se refere à quantificação celular atrial.

As demais vias de infusão celular cardíaca foram testadas por diversos autores, apresentando padrões diferentes de distribuição celular. Assim podemos

destacar a via intracoronariana com padrão de distribuição celular homogêneo, na qual são observadas células em todas as câmaras cardíacas, o que inclui os átrios, atingindo de endocárdio a epicárdio, corroborando com Suzuki et al. (2000); Strauer e Kornowisk (2003) e Samoto (2006). Sugere-se que esta distribuição está relacionada com a própria vascularização do coração e nenhum sinal de microinfarto foi observado, resultado este que difere do observado por Vulliet et al. (2004).

Já pela via intramiocárdica-transendocárdica, ocorre uma entrega seletiva de células, uma vez que as mesmas são infundidas diretamente no tecido cardíaco levando a formação de pequenos grupamentos celulares, como descrita também por Strauer e Kornowisk (2003), Hou et al. (2005) e Samoto, (2006).

Na via retrógrada por seio venoso estes mesmos autores supramencionados relatam a presença de células no espaço extracelular, no chamado interstício celular, como observado em nosso estudo.

Samoto 2006, que realizou estudo quantitativo analisando as 3 vias de infusão mencionadas (intracoronariana, intramiocárdica-transendocárdica e retrógrada) relata que o volume celular encontrado nos átrios de cães foi maior que nas demais câmaras cardíacas, indicando resultados altamente significativos ($P < 0,01$) e revelando a dependência das vias de infusão frente às diferentes regiões avaliadas, o que difere de nossos resultados, no qual os achados não foram significativos ($P > 0,01$). Isso pode ser explicado pelo fato da autora ter estudado cães saudáveis, enquanto que nossos animais apresentavam, no caso do grupo dos infartados, um fator quimiotático importante, que atraiu as células para as áreas lesadas (ventrículos) desviando-as dos átrios.

No que tange a capacidade vasculogênica, sabemos que, a medula óssea contém células-tronco hematopoiéticas (HSCs) e células-tronco mesenquimais (MSCs) que derivam de uma célula primitiva precursora e ambos os tipos celulares quando injetados auxiliam principalmente na vasculogênese (Poulson et al., 2002), fato que vem de encontro com nossos achados na região atrial dos animais dos 2 grupos, sugerindo a formação de novos pequenos vasos, uma vez que não podemos excluir a possibilidade de que as células transplantadas funcionem como focos liberadores de fatores de crescimento e de fatores angiogênicos, que recrutariam células locais de miocárdio hibernante por meio da formação de novos vasos (Bocchi & Issa, 2003).

CONCLUSÕES

Através deste estudo de morfologia e quantificação de células mononucleares de medula óssea, infundidas através da via intrapericárdica em suínos submetidos a infarto agudo do miocárdio, concluímos que:

- Em todos os animais estudados neste experimento (infartados e controles), houve uma grande adesão de células mononucleares no átrio direito e esquerdo ocupando toda a estratigrafia cardíaca;
- Tanto nos animais infartados, quanto os pertencentes ao grupo controle, foi possível notar a presença de pequenos capilares, sugerindo neovascularização;
- Não houve diferença significativa no padrão de distribuição, bem como na quantidade das CMMO, quando comparados os átrios direito e esquerdo independente da presença ou não do processo de infarto, revelando que as regiões estudadas não sofreram influência dos fatores quimiotáticos.

Agradecimentos

Agradecemos a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, e ao Instituto do Coração – INCOR de São Paulo, pelo financiamento e oportunidade oferecida de um projeto de pesquisa que subsidia pesquisa básica em terapia celular, e que futuramente poderá ser empregada como forma terapêutica. Agradecemos aos Professores da FMVZ/USP: José Roberto Kfoury Jr, pelo empréstimo do laboratório LTIAM.

REFERÊNCIAS

- Asahar T., Murahara T., Sullivan A., Silver M., Van der Zee R., Li T., Witzgenbichler B., Schatteman G., Isner J. M. 1997. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275:964-967.
- Bocchi E.A. & Issa V.A. 2003. Transplante celular para o tratamento de pacientes com insuficiência cardíaca. *Rev. Soc. Cardiol. Est. S. Paulo* 13:427-433.
- Branco E. 2007. Uso da via transpericárdica para infusão de células mononucleares de medula óssea em suínos induzidos ao infarto agudo do miocárdio. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo. 98p.
- Crow E.S. & Walshaw S.O. 2000. Colocação e cuidados com cateteres intravenosos. In: Manual de procedimentos clínicos em cães, gatos e coelhos. Editora Artes Médicas Sul, Porto Alegre, p.47-64.
- Dietrich I. 2004. Influência da composição de carreador biodegradável na viabilidade do implante de células

- mesenquimais indiferenciadas do tecido adiposo humano. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo. 90p.
- Dohmann H.F.R. 2004. Pesquisa básica na terapia celular - luxo ou necessidade? Rio de Janeiro, RJ. Arq. Bras. Cardiol. 83:275-277.
- Fukuda K. 2001. Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal "stem cells" for cardiovascular tissue engineering. Int. J. Artif. Organs 25:187-193.
- Giordano A., Galderisi U. & Marino I.R. 2007. From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. J. Cell. Physiol. 211:27-35.
- Heeschen C., Lehmann R., Honold J., Assmus B., Aicher A., Walter D.H., Martin H., Zeiher A.M. & Dimmeler S. 2004. Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow monoclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease. Circulation 109:1615-1622.
- Hou D., Youssef E.A., Brinton T.J., Hang P., Rogers P., Prince E.T., Yeung A.C., Johnstone B.H., Yock P.G. & March K.L. 2005. Radiolabeled cell distribution after intramyocardial, intracoronary, and interstitial retrograde coronary venous delivery? Implications for current clinical trials. Circulation 112:150-156.
- Junqueira L.C.V., Bignonas G. & Bretan R.P. 1979. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in the tissue sections. Histochem. J. 11:447-455.
- Koc O. & Lazarus H. 2001. Mesenchymal "stem cells": heading into the clinic. Bone Marrow Transplant. 27:235-239.
- Kolettis T.M., Kazakos N., Katsouras C.S., Niokou D., Pappa L., Koulouras V., Stefanou P., Seferiadis C., Malamou-Mitsi V., Michalis L.K., Marselos M. & Sideris D.A. 2005. Intrapericardial drug delivery: pharmacologic properties and long-term safety in swine. Int. J. Cardiol. 99:415-421.
- Kornowski R., Fuchs S., Leon M.B. & Epstein S.E. 2000. Delivery strategies to achieve therapeutic myocardial angiogenesis. Circulation 101:454-458.
- Leite R.S. & Dohmann H.F. 2004. Uso das células-tronco aplicado à cardiologia. Rev. Soc. Cardiol. 3:1-5.
- Mannam A.P., Kalon K.K. Ho., Cultip D.E., Carrozza J.P., Cohen D.J., Lorell B.H. & Laham R.J. 2002. Safety of subxyphoid pericardial access using a blunt-tip needle. Am. J. Cardiol. 89:891-893.
- Pontes M.R.N. & Leães P.E. 2004. Remodelamento ventricular: dos mecanismos moleculares e celulares ao tratamento. Rev. Soc. Cardiol. RS 3:1-7.
- Poulson R., Alison M.R., Forbes S.J. & Wright N.A. 2002. Adult stem cell plasticity. J. Path. 197:441-456.
- Pouzet B., Ghostines S. & Allatar N. 2001 Long-term functional results of autologous skeletal myoblast transplantation in rats. Circulation 104:599.
- Samoto V.Y. 2006. Terapia celular cardíaca: vias de infusão de célula mononucleares em cães SRD. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo. 105p.
- Santos R.R., Soares M.B.P. & Carvalho A.C. 2004. Transplante de células da medula óssea no tratamento da cardiopatia chagásica crônica. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 37:490-495.
- Strauer B.E. & Kornowski R. 2003. Stem cell therapy in Perspective. Circulation 107:929-934.
- Suzuki K., Brand N.J., Smolenski R.T., Jayakumar J., Murtuza B. & Yacoub M.H. 2000. Development of a novel method for cell transplantation through the coronary artery. Circulation 102(Suppl. 3):359-364.
- Tateishi-Yuyama E., Matsubara H., Murohara T., Ikeda U., Shintani S., Masaki H., Amano K., Kishimoto Y., Yoshimoto K., Akashi H., Shimada K., Iwasaka T. & Imaizumi T. 2002. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone marrow cells: a pilot study and a randomized controlled trial. Lancet 360:427-35.
- Tolosa E.M., Rodrigues C.J., Behmer O.A. & Neto A.G.F. 2003. Manual de técnica para histologia normal e patológica. 2ª ed. Editora Manole, São Paulo, 331 p.
- Vilas-Boas F., Feitosa G.S., Soares M.B.P., Pinho-Filho J.A., Mota A., Almeida A.J.G., Carvalho C., Carvalho H.G., Oliveira A.D. & Santos R.R. 2004. Transplante de células de medula óssea para o miocárdio em paciente com insuficiência cardíaca secundária a doença de Chagas. Arq. Bras Cardiol. 82:181-184.
- Vulliet P.R., Greeley S.M., MacDonald K.A. & Kittelson M. 2004. Intra-coronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs. Lancet 363:783-784.
- Zago M.A. & Covas D.T. 2006. Células-tronco: a Nova Fronteira da Medicina. Editora Atheneu, São Paulo, p.268.
- Zatz M. 2002. A biologia molecular contribuindo para a compreensão e a prevenção das doenças hereditárias. Ciênc. Saúde Coletiva 7:85-99.