

# Melhora Sintomática e da Capacidade de Exercício Após o Transplante Autólogo, Transendocárdico, de Células Mononucleares da Medula Óssea em Pacientes com Cardiopatia Isquêmica Grave, Sustentada até o Sexto Mês de Evolução

*Sustained Improvement in Symptoms and Exercise Capacity up to Six Months After Autologous Transendocardial Transplantation of Bone Marrow Mononuclear Cells in Patients With Severe Ischemic Heart Disease*

Hans Fernando R. Dohmann, Emerson C. Perin, Radovan Borojevic, Suzana A. Silva, Andre L. S. Souza, Guilherme V. Silva, João A. R. Assad, Maria I. D. Rossi, Claudio T. Mesquita, Hans J. Dohmann  
Rio de Janeiro, RJ – Houston, TX - USA

## Objetivo

Este estudo tem por objetivo avaliar os efeitos, no seguimento de 6 meses, do transplante autólogo, transendocárdico, de células mononucleares da medula óssea (TACMMO), sobre os sintomas, capacidade de exercício, perfusão e contratilidade miocárdica nos portadores de cardiopatia isquêmica grave.

## Métodos

Vinte e um pacientes foram incluídos neste estudo prospectivo (os 14 primeiros pacientes, grupo tratado; os 7 últimos pacientes, grupo controle). Inicialmente todos os indivíduos foram submetidos à avaliação clínica e laboratorial, teste ergométrico, ecocardiograma, cintilografia miocárdica e Holter de 24 horas. As CMMO foram isoladas, lavadas e diluídas em salina 0,9% para injeção transendocárdica em áreas de miocárdio viável no grupo tratado, (15 injeções de 0,2 ml). Todos os pacientes foram reavaliados ao final de 2 e 6 meses de acompanhamento.

## Resultados

Os dados demográficos e demais características não diferiram significativamente entre os grupos na avaliação inicial. Não foram observados eventos adversos maiores relacionados ao TACMMO. Ao final de 6 meses, houve redução da área isquêmica na imagem de perfusão nuclear ( $p=0,05$ ) e melhora significativa dos sintomas, da capacidade funcional e da função global do ventrículo esquerdo.

## Conclusão

Este estudo demonstra a segurança da realização de injeções transendocárdicas de CMMO em humanos com cardiopatia isquêmica associada a grave disfunção ventricular. Os efeitos observados em curto prazo foram mantidos até 6 meses de acompanhamento.

## Palavras-chave

células, insuficiência cardíaca, isquemia, revascularização, terapia gênica

## Objective

*This study aimed at assessing the effects of autologous transendocardial transplantation of bone marrow mononuclear cells (ATTBMMC) on symptoms, exercise capacity, myocardial perfusion and contractility in patients with severe ischemic heart disease during a 6-month follow-up period.*

## Methods

*This prospective study comprised 21 patients as follows: the first 14 patients forming the treated group, and the last 7 patients forming the control group. Initially, all patients underwent clinical and laboratory assessment, treadmill testing, echocardiography, myocardial scintigraphy, and 24-hour Holter. The bone marrow mononuclear cells (BMMC) were isolated, washed, and diluted in 0.9% saline solution for transendocardial injection in areas of viable myocardium in the treated group, (15 0.2-mL injections). All patients were reassessed in the end of 2 and 6 months of follow-up.*

## Results

*The demographic data and other characteristics did not significantly differ between the groups in the initial evaluation. No major adverse events related to the ATBMMC were observed. In the end of 6 months, a reduction in the ischemic area was observed on nuclear perfusion imaging ( $P=0.05$ ), as was a significant improvement in symptoms, functional capacity, and left ventricular overall function.*

## Conclusion

*This study showed that transendocardial injections of BMMC are safe in human beings with ischemic heart disease associated with severe ventricular dysfunction. The effects observed in the short run were maintained up to the sixth month of follow-up.*

## Key words

*cells, heart failure, ischemia, revascularization, gene therapy*



Em função do aprimoramento das diversas técnicas de revascularização miocárdica, percutâneas ou cirúrgicas, permitir resultados cada vez mais efetivos quanto à redução da morbidade e mortalidade de coronariopatas agudos e crônicos, o número de pacientes com cardiomiopatia isquêmica cresce progressivamente e é responsável por mais da metade de todas as internações por insuficiência cardíaca, gerando no Brasil, segundo dados do DATASUS, mais de 400.000 internações/ano<sup>1</sup>.

A taxa de mortalidade entre os pacientes com cardiomiopatia isquêmica é elevada e torna-se ainda maior no subgrupo de pacientes com insuficiência cardíaca, superando a taxa de 30% ao ano<sup>2</sup>. Devido à elevada morbidade e mortalidade, estes casos consomem uma grande quantia dos recursos do sistema de saúde.

Entender as características clínicas desta população é fundamental para que possamos identificar e desenvolver novas técnicas capazes de suprir as necessidades desta parcela de pacientes.

Várias estratégias terapêuticas vêm sendo testadas para o tratamento tanto dos secundários à disfunção ventricular quanto daqueles secundários ao déficit perfusional, crônico e refratário às técnicas disponíveis de revascularização miocárdica. Estas estratégias incluem o uso intermitente ou em longo prazo de uroquinase<sup>3-5</sup>; neuroestimulação<sup>6</sup>; revascularização transmiocárdica por laser, radiofrequência ou mecânica<sup>7-12</sup> e neoangiogênese através do implante de fatores de crescimento endoteliais<sup>13-20</sup>. Nenhuma destas técnicas, no entanto, a despeito de alguns anos de desenvolvimento, demonstrou efetividade no sentido de alterar o mau prognóstico destes pacientes, de forma a justificar seu emprego clínico rotineiro<sup>7-12</sup>.

Mais recentemente, alternativas relacionadas à terapia celular começaram a ser desenvolvidas. Vários estudos recentes vêm sugerindo que células originadas na medula óssea (MO) também participam intensamente da regeneração de várias estruturas do sistema cardiovascular.

O implante de células para o tratamento de doenças cardiovasculares encontra-se sob investigação em vários centros no mundo. Várias linhagens celulares têm sido investigadas em modelos experimentais<sup>21-26</sup> e as primeiras séries de casos em humanos já foram descritas<sup>27-31</sup>.

Duas fontes de células foram utilizadas em humanos até o momento: a musculatura esquelética (origem dos mioblastos)<sup>29</sup> e a medula óssea (fonte de células tronco nos adultos)<sup>31,32</sup>.

É consistente na literatura internacional, a utilização de células originadas da MO em experimentos de neovascularização utilizando a via intracoronariana, a transendocárdica e a transepicárdica. Em modelos experimentais de isquemia miocárdica aguda e crônica<sup>22,33-43</sup>, o implante de células mononucleares de medula óssea (CMMO) foi capaz de melhorar a contração e a perfusão miocárdica<sup>22,41,42,44,45</sup>. Tais resultados foram reproduzidos em estudo clínicos recentes, de fase 1, em humanos<sup>30,31,46-49</sup>, incluindo nossa publicação anterior quando avaliamos a segurança deste procedimento<sup>50</sup>.

Este estudo tem por objetivo avaliar a evolução clínica até seis meses após o TACMMO, sob a hipótese de que este tratamento é capaz de promover neovascularização e, conseqüentemente, resultar em melhora sintomática e da capacidade de exercício em pacientes com cardiopatia isquêmica grave, sem indicação para outras alternativas de revascularização<sup>48</sup>.

## Métodos

Estudo prospectivo, não randomizado, de 21 pacientes com cardiopatia isquêmica grave e sem outra opção de terapia de revascularização miocárdica, percutânea ou cirúrgica (tab. I). A metodologia detalhada deste estudo foi publicada recentemente<sup>50</sup>.

Os critérios de inclusão foram: 1) doença arterial coronariana crônica com defeito de perfusão reversível detectado pela cintilografia miocárdica (SPECT); 2) fração de ejeção (FE) do ventrículo esquerdo (VE) < 40%; 3) inelegibilidade para revascularização miocárdica percutânea ou cirúrgica, avaliada pela coronariografia; 4) termo de consentimento livre e esclarecido assinado. A inelegibilidade para procedimentos de revascularização miocárdica cirúrgica ou percutânea foi determinada por 2 comitês: um comitê cirúrgico composto por 2 cirurgiões cardiovasculares e um cardiologista clínico, e um comitê intervencionista formado por 2 cardiologistas intervencionistas e um cardiologista clínico. Os critérios de exclusão foram: 1) dificuldade em obter acesso vascular para procedimentos percutâneos; 2) história de neoplasia ou outra co-morbidade prévia ou concomitante que pudesse ter impacto na sobrevida em curto prazo deste paciente; 3) arritmias ventriculares malignas; 4) aneurisma do VE; 5) anormalidades laboratoriais inexplicadas; 6) tecido ósseo com aspecto radiológico anormal; 7) doença hematológica primária; 8) infarto agudo do miocárdio nos 3 meses prévios a inclusão no protocolo; 9) presença de trombo intraventricular; 10) instabilidade hemodinâmica no momento do procedimento; 11) fibrilação atrial; ou 12) qualquer condição que, no julgamento do investigador, pudesse colocar o paciente em risco.

Os sintomas de angina e insuficiência cardíaca seguiram a Classificação da Sociedade Canadense de Cardiologia (CSCC) e da Associação do Coração de Nova Iorque (NYHA, do inglês *New York Heart Association*), respectivamente.

As seguintes avaliações foram realizadas: teste ergométrico (protocolo de rampa), com utilização do pico de VO<sub>2</sub> para avaliação do consumo máximo de oxigênio; ecocardiograma uni e bidimensional com Doppler, utilizando a técnica de Simpson; cintilografia miocárdica com estresse farmacológico com dipiridamol, dosagem de peptídeo natriurético cerebral (BNP, do inglês *Brain Natriuretic Peptide*), eletrocardiograma e avaliação clínica.

Os pacientes do grupo tratado foram submetidos à avaliação invasiva através de coronariografia, ventriculografia esquerda e mapeamento eletromecânico imediatamente antes do procedimento de injeção e 4 meses após. O sistema *NOGA® mapping system* (Cordis®, Miami Lakes, Fla, USA) foi utilizado para o mapeamento eletromecânico com o objetivo de identificar a área de miocárdio viável (voltagem unipolar > 6,9 mV) e guiar a injeção da solução de células mononucleares.

Os pacientes do grupo controle foram submetidos somente aos exames não invasivos descritos neste protocolo. Ambos os grupos tratado e controle foram submetidos à reavaliação no seguimento de 2 e 6 meses, utilizando os mesmos procedimentos realizados na avaliação inicial. Cabe ressaltar que todos os pacientes estavam com o tratamento clínico pleno, na dose máxima tolerada, no momento da inclusão no protocolo, sendo que 50% dos pacientes do grupo controle e 70% dos pacientes do grupo tratado estavam em tratamento com betabloqueador no início do protocolo (p=NS) (tab. II).

**Aspiração, isolamento das células mononucleares da medula óssea** - Cerca de 4 horas antes da injeção transendocárdica de células mononucleares, 50 ml de aspirado da medula óssea foram obtidos da crista ilíaca posterior dos pacientes alocados no grupo tratado, sob anestesia local associada à sedação/analgesia. As células mononucleares foram isoladas pelo gradiente de *Ficoll-Paque Plus*<sup>®</sup> (Amersham Biosciences<sup>®</sup>), exaustivamente lavadas com salina heparinizada contendo albumina humana 5% e posteriormente filtradas através de uma peneira de nylon de 100 µm para remover os agregados celulares. Uma pequena fração da suspensão de células foi utilizada para citometria e avaliação da viabilidade celular pelo método de exclusão utilizando azul de trypan, com demonstração de viabilidade celular superior a 90% (96,2±4,9%), garantindo a qualidade da suspensão.

A caracterização dos marcadores de diferenciação leucocitária por citometria de fluxo e a avaliação funcional também foram realizadas em uma fração das células obtidas. A capacidade clonogênica dos progenitores hematopoiéticos foi avaliada pelas unidades formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos, conforme previamente descrito<sup>51</sup>. Culturas de bactérias e fungos das preparações de células clinicamente utilizadas foram realizadas.

**Implante das células mononucleares da medula óssea** - Os pacientes alocados no grupo tratado foram transferidos para o laboratório de intervenção cardiovascular cerca de 3 horas antes do início do procedimento, para realização de coronariografia e ventriculografia esquerda seguida de mapeamento eletromecânico, a fim de identificar áreas de miocárdio viável definidas como voltagem unipolar preservada (>6,9 mV) e atividade mecânica diminuída (encurtamento linear local <12%)<sup>52,53</sup>. As injeções transendocárdicas, com o cateter NOGA Myostar<sup>®</sup> cardiology catheter, foram realizadas em pontos com estas características.

Cada ponto de injeção foi cuidadosamente avaliado antes das injeções, utilizando-se os seguintes critérios: 1) posição perpendicular do cateter na parede do ventrículo esquerdo; 2) excelente estabilidade do cateter (*Loop Stability* < 4mm) e 3) presença de extra-sístole ventricular à exteriorização da agulha no miocárdio. Foram realizadas 15 injeções de 0,2ml cada (25,5±6,3x10<sup>6</sup> células/paciente).

As diferenças nas características demográficas, entre os grupos, foram avaliadas através do teste qui-quadrado. Teste exato de Fisher e Teste T foram utilizados para as variáveis discretas e contínuas, respectivamente. A comparação das mudanças ocorridas entre a fase inicial e o seguimento de 2 e 6 meses no grupo tratado e no grupo controle foi feita através do teste ANOVA para medidas repetidas. A avaliação das mudanças ocorridas ao longo do seguimento de 6 meses do grupo tratado em relação ao grupo controle foi feita através do modelo ANOVA para medidas repetidas, incluindo a interação entre os dois grupos, com análise Pos hoc de Kruskal-Wallis para variáveis não paramétricas e para variáveis contínuas com distribuição assimétrica. Análise Pos hoc com correção de Bonferroni foi realizada para variáveis contínuas, com distribuição normal. Um valor de p<0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

O Comitê de Ética em Pesquisas envolvendo seres humanos do Hospital Pró-Cardíaco e a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) aprovaram o protocolo de pesquisa.

## Resultados

Não houve diferenças quanto às características clínicas entre os grupos (tab. I). Os pacientes foram tratados de acordo com a diretriz brasileira para o tratamento de insuficiência cardíaca<sup>54</sup>. Todos os pacientes utilizaram inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA) ou inibidores do receptor de angiotensina. Setenta e um por cento dos pacientes do grupo tratado e 50% dos pacientes do grupo controle estavam em uso de betabloqueadores. Não houve diferença no uso de nitratos, IECA, beta bloqueadores ou diuréticos nos 6 meses de seguimento, conforme demonstrado na tabela II e figura 1.

As características da população celular estão descritas na tabela III. A viabilidade celular foi superior a 95% (96.2±4.9%), garantindo a qualidade da suspensão de células. As culturas de

	Grupo Tratado	Grupo Controle	p
N	14	7	
Idade	56,9 ± 9,8	64,3 ± 7,3	0,1
Sexo (% masculino)	85,7	90	0,53
Hipertensão (%)	64,3	70	0,74
Diabetes (%)	28,6	70	0,35
Hipercolesterolemia (%)	78,6	70	0,35
Fumo (%)	7,1	0	0,47
IAM prévio (%)	100	100	1
ATC prévia (%)	7,1	40	0,09
RM prévia (%)	64,3	90	0,61
AVE prévio (%)	28,6	10	0,26
Doença vascular periférica (%)	57,1	60	0,66
Insuficiência renal crônica (%)	14,3	10	1
Doença multivascular (%)	100	100	1

	Inicial % (mg/dia)	6 meses % (mg/dia)	p
IECA + IAT1			
Grupo controle	85,7 (63,8±52,0)	85,7 (62,6±54,0)	1,0
Grupo tratado	85,7 (71,2±77,3)	92,9 (70,3±83,6)	0,3
p	0,60		
Nitrato			
Grupo controle	85,7 (67,1±45,7)	85,7 (72,9±50,0)	1,0
Grupo tratado	92,8 (44,0±35,0)	85,7 (48,3±37,6)	0,9
p	0,90		
Betabloqueador			
Grupo controle	42,9 (17,1±9,4)	57,1 (16,2±8,4)	0,5
Grupo tratado	71,4 (11,5±7,3)	64,3 (16,7±9,4)	0,7
p	0,90		
Diurético			
Grupo controle	71,4 (85,0±53,0)	57,2 (90,0±50,0)	0,7
Grupo tratado	85,7 (60,0±24,5)	71,4 (40,0±28,3)	0,6
p	0,70		
Antagonista do Ca <sup>2+</sup>			
Grupo controle	14,3 (¥)	28,6 (¥)	0,5
Grupo tratado	21,4 ( )	21,4 ( )	1,0
p	0,60		

(¥) Apenas 2 pacientes do grupo controle utilizaram antagonista do cálcio. O primeiro paciente foi tratado durante todo o protocolo com diltiazem 180 mg/dia. Amlodipina 10 mg/dia foi adicionada ao tratamento do segundo paciente, a partir do quarto mês de evolução, para controle da pressão arterial (PA). Apenas 3 pacientes do grupo tratado estavam em uso de antagonista do cálcio. Dois pacientes estavam em uso de diltiazem (180 mg/dia e 60 mg/dia, respectivamente) e 1 paciente estava em uso de amlodipina 10 mg/dia, para controle da PA. IECA - inibidor da enzima conversora de angiotensina, IAT1 - inibidor do receptor de angiotensina.



fungos e bactérias foram negativas. O tempo total do procedimento de injeção foi de  $81 \pm 19$  minutos. Os mapas eletromecânicos contaram com  $92 \pm 16$  pontos.

Não houve complicações maiores relacionadas ao procedimento. Um paciente teve um episódio transitório de congestão pulmonar que foi tratado com diuréticos e dobutamina. Nenhuma arritmia sustentada foi observada durante o procedimento. Não foi detectado caso algum de derrame pericárdico nos exames seriados de ecocardiografia realizados nas 48 horas após o procedimento. Todos os pacientes tiveram alta hospitalar 48 horas após o procedimento de injeção conforme previsto no protocolo.

Um paciente do grupo controle morreu 2 semanas após a entrada no estudo e não foi incluído na análise. Um paciente do grupo tratado morreu na 14ª semana de seguimento por morte súbita, precedida por precordialgia de forte intensidade. Os familiares recusaram a necropsia.

Os pacientes do grupo tratado apresentaram menos sintomas de insuficiência cardíaca e angina após 2 e 6 meses de seguimento quando comparados ao grupo controle ( $p=0,0001$  e  $0,008$ , respectivamente).

Não houve incidência de arritmias ventriculares graves na análise pelo holter realizado nas 24 horas imediatamente após o procedimento e nos seguimentos de 2 e 6 meses. Houve uma tendência à redução no número de extra-sístoles ventriculares de  $4.445 \pm 8.512/24h$  para  $941 \pm 1.244/24h$  ( $p=0,08$ ) mantendo este padrão até o 6º mês de seguimento. O percentual de ESV variou não significativamente de  $3,8 \pm 6,8\%$  para  $0,9 \pm 1,14\%$  em 2 meses e para  $0,95 \pm 1,28\%$  em 6 meses.

No acompanhamento de 6 meses, dentre todos os valores laboratoriais (tab. IV), somente os níveis séricos de creatinina

variaram entre o grupo controle e o grupo tratado, tendo aumentado significativamente no grupo controle quando comparados ao grupo tratado ( $p=0,02$ ). Os níveis de PCRt na avaliação inicial e no seguimento de 2 e 6 meses não apresentaram diferença significativa entre os 2 grupos ( $p=0,8$ ). Houve aumento dos níveis séricos de BNP no grupo controle em relação ao grupo tratado, no seguimento de 6 meses ( $p=0,003$ ).

Na avaliação iniciada a geometria ventricular diferiu significativamente entre os grupos. O grupo controle apresentou volumes sistólico e diastólico finais menores ( $p<0,001$ ) assim uma FE inicial maior ( $p=0,054$ ). No entanto, no seguimento de 6 meses a FE diminuiu de forma significativa no grupo controle ( $p=0,05$ ), o que não aconteceu no grupo tratado. Os volumes cavitários se mantiveram inalterados em ambos os grupos.

O pico de  $VO_2$  foi semelhante entre os 2 grupos na avaliação inicial e ocorreu aumento significativo após 2 meses no grupo tratado (de  $17,96 \pm 8,78$  para  $23,40 \pm 8,30$ ,  $p=0,01$ ), que se manteve ( $24,20 \pm 7,50$ ) aos 6 meses de seguimento ( $p=0,05$ ), o que não foi observado no grupo controle (Tabela V). Esta variação do pico de  $VO_2$  não foi suficiente para gerar diferença estatística significativa na interação entre os grupos tratado e controle, ao final de 6 meses de seguimento.

O tamanho do total de defeito de perfusão reversível (TDPR) (isquemia) e o percentual de defeito de perfusão em repouso (PDPR) com 50% de atividade (cicatriz) foi semelhante entre os grupos na avaliação inicial. Não houve variação do PDPR 50% em 2 ou 6 meses, em ambos os grupos. No grupo tratado houve redução absoluta, significativa, de 10% do DPRT ( $p=0,022$ ) ao final de 2 meses (redução relativa de 73%) diferindo de forma significativa em relação ao grupo controle. Ao final de 6 meses, esta redução absoluta da área isquêmica perdeu 4% do seu impacto inicial, porém, mantendo uma redução absoluta (em relação à avaliação inicial) de 6% (tabela V), bem como uma diferença significativa em relação ao grupo controle ( $p=0,05$ ). Na figura 2 está ilustrado um exemplo de resolução da isquemia ínfero-lateral em um paciente tratado.

## Discussão

Este estudo descreve, pela primeira vez, a evolução de médio prazo (6 meses) de pacientes submetidos ao transplante transendocárdico com células autólogas mononucleares da medula óssea por meio de injeções transendocárdicas em pacientes com grave

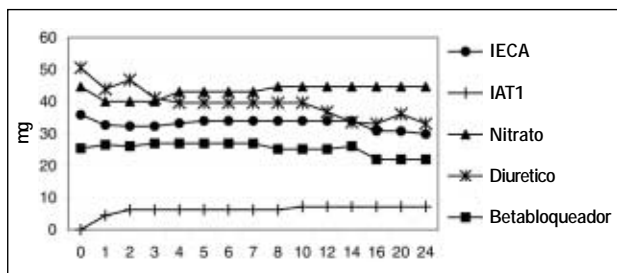


Fig. 1 - Evolução semanal da terapia medicamentosa no grupo tratado. IECA - inibidor da enzima conversora de angiotensina, IAT1 - inibidor do receptor de angiotensina.

Tabela III - Características da população celular

População celular e fenótipo	Percentual de células injetadas	Nº de células injetadas ( $\times 10^3$ ) / $mm^2$
Células progenitoras hematopoiéticas (CD45 <sup>b</sup> CD34 <sup>+</sup> )	$2,4 \pm 1,8^*$	$57,4 \pm 61,4^*$
Células progenitoras hematopoiéticas precoces (CD45 <sup>b</sup> CD34 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>-</sup> )	$0,1 \pm 0,06$	$2,1 \pm 1,8$
Células CD4 <sup>+</sup> T (CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> )	$29,5 \pm 10,1$	$537,0 \pm 265,7$
Células CD8 <sup>+</sup> T (CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> )	$17,9 \pm 5,4$	$311,0 \pm 221,6$
Células B (CD45 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> )	$19 \pm 10$	$232,5 \pm 174,8$
Monócitos (CD45 <sup>+</sup> CD14 <sup>+</sup> )	$8,2 \pm 2,2$	$202,8 \pm 161,0$
Células NK (CD45 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> )	$1,14 \pm 0,8$	$21,2 \pm 13,5$
Avaliação funcional	Nº colônias / $10^6$ CMMO	Nº Células Injetadas ( $\times 10^3$ ) / $mm^2$
CFU-F (Unidade formadora de colônia de fibroblasto)	$3,2 \pm 2,8$	$0,2 \pm 0,2$
CFU-GM (Unidade formadora de colônia de granulócito e macrófago)	$792,6 \pm 84,8$	$16,4 \pm 18,5$

Características da população celular e fenótipo. \* Resultados do fenótipo celular dos 14 pacientes submetidos ao procedimento de injeção das células mononucleares da medula óssea, com exceção do CD34<sup>+</sup>CD45<sup>b</sup>HLA-DR<sup>-</sup> avaliado em 13 pacientes; CD45<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>, avaliado em 11 pacientes; e CD45<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, avaliado em 9 pacientes.

	Grup tratado	Grupo controle	p
N	14	7	
Creatinina (Pré) (mg/dL)	1,17±0,32	1,58±0,9	ns P3*
Creatinina (Pós 2m) (mg/dL)	1,1±0,3	1,78±0,9	
Creatinina (Pós 6m) (mg/dL)	1,1±0,27	1,8±1,1	
p	0,23 P*	0,05 P**	0,02 P4*
PCRt (Pre) (mg/dL)	0,93±0,70	0,76±0,53	ns
PCRt (Pos 2m) (mg/dL)	1,03±1	0,69±0,6	
PCRt (Pos 6m) (mg/dL)	0,96±0,44	0,94±0,65	
p	0,69	0,96	0,8
BNP (Pre) (pg/mL)	328,1±410,7	466±415	ns
BNP (Pós 2m) (pg/mL)	274±271	694±264	
BNP (Pós 6m) (pg/mL)	443±404	657±245	
p	0,43	0,3	0,003

BNP = Peptídeo Natriurético Cerebral do inglês Brain Natriuretic Peptide; ns = não significativo; P\* = Anova para medidas repetidas ao longo de 6 meses de seguimento, no grupo tratado; P\*\* = Anova para medidas repetidas ao longo de 6 meses de seguimento, no grupo controle; P3\* = Análise univariada da diferença entre o grupo tratado e o grupo controle na avaliação inicial, antes do procedimento de injeção de células mononucleares da medula óssea; P4\* = Anova para medidas repetidas ao longo de 6 meses de seguimento, do grupo tratado em relação ao grupo controle incluindo a interação entre os dois grupos.

disfunção ventricular. Estes resultados sugerem que a injeção de CMMOs é uma terapia segura, tanto no curto prazo<sup>50</sup>, quanto em sua evolução de 6 meses.

Existem estudos em modelos experimentais na literatura que embasam a possibilidade da neovascularização em tecidos isquêmicos com o transplante de CMMO. Nosso grupo demonstrou em ratos a capacidade de células da medula óssea gerarem um processo angiogênico, o que ficou demonstrado através de dados funcionais e histopatológicos<sup>55</sup>. Outros grupos obtiveram resultados semelhantes, incluindo Fuchs e Kawamoto que estudaram porcos com isquemia miocárdica crônica induzida por implante de constritores na coronária e que a seguir foram submetidos ao transplante de CMMO. Os animais foram avaliados antes de 1 mês, incluindo a análise histopatológica, e os autores observaram melhora da perfusão miocárdica relacionada ao desenvolvimento de novos vasos<sup>22,40</sup>. Portanto, neste estudo, a melhora da perfusão miocárdica observada nas áreas injetadas no grupo de pacientes tratados pode ter como um de seus mecanismos a angiogênese. Embora não descrito nos resultados, a maioria dos pacientes referiu melhora dos sintomas a partir da segunda semana, o que só pôde ser demonstrado em 8 semanas conforme o desenho do estudo.

A demonstração objetiva da melhora de perfusão é fundamental quando estamos lidando com técnicas de angiogênese, as quais contam com dados da literatura demonstrando serem altamente suscetíveis a efeito placebo<sup>13-19</sup>. Recentemente foram descritos relatos de melhora sintomática de pacientes submetidos a revascularização direta por laser<sup>7-12</sup>, que no entanto não foram confirmadas, em estudo randomizado e duplo-cego<sup>56,57</sup>. É importante lembrar, no entanto, que ao contrário do observado com a terapia celular, a revascularização direta com laser não foi capaz de demonstrar nenhuma melhora dos exames de perfusão miocárdica por cintilografia. De forma diferente, nosso grupo, assim como outros, já relatou melhora do padrão de perfusão miocárdica dos pacientes submetidos ao transplante de células tronco mononucleares da medula óssea<sup>48-50</sup>.

	Grupo tratado	Grupo controle	p
N	14	7	
NYHA (Pré)	2,21±0,89	2,71±0,75	nsP3*
NYHA (Pós 2m)	1,14±0,36	2,57±0,53	
NYHA (Pós 6m)	1,30±0,60	2,43±0,53	
p	0,001P*	0,75P**	0,0001P4*
CCSC* (Pré)	2,64±0,84	2,57±0,97	ns
CCSC (Pós 2m)	1,29±0,60	2,29±0,95	
CCSC (Pós 6m)	1,38±0,50	2,14±0,38	
p	0,0001	0,23	0,008
Pico de VO <sub>2</sub> (Pré)	17,96±8,78	17,50±6,80	ns
Pico de VO <sub>2</sub> (Pós 2m)	23,40±8,30	16,90±10,30	
Pico de VO <sub>2</sub> (Pós 6m)	24,20±7,50	15,30±8,00	
p	0,05	0,9	0,08
METs (Pré)	5,09±2,5	5,07±1,96	ns
METs (Pós 2m)	6,68±2,35	5,16±2,45	
METs (Pós 6m)	7,19±2,4	5,08±2,04	
p	0,04	0,9	0,02
TDPR** (Pré)	15,15±14,90	20±25	ns
TDPR (Pós 2m)	4,50±10,60	40±38	
TDPR (Pós 6m)	8,75±9,90	19,60±26	
p	0,13	0,23	0,05
PDPR*** (50%) (Pré)	40,80±11	35,80±9,50	ns
PDPR (50%) (Pós 2m)	38,80±8,80	36±11,40	
PDPR (50%) (Pós 6m)	38,80±7,0	36±8,0	
p	0,44	0,4	0,19
FE (%) (Pré)	30±5,56	36±11,70	0,054
FE (%) (Pós 2m)	35,60±7,90	29,40±7,60	
FE (%) (Pós 6m)	32,83±6,97	28,60±4,0	
p	0,18	0,05	0,03
VSF (Pré)	146,80±53	96,70±19,60	<0,001
VSF (Pós 2m)	123±47,90	103,90±25,60	
VSF (Pós 6m)	133,25±46,20	103,90±28,90	
p	0,91	0,43	0,003
VDF (Pré)	211±77	141,80±22,40	<0,001
VDF (Pós 2m)	189±67,50	146,30±29,10	
VDF (Pós 6m)	209±56	146,60±43	
p	0,89	0,50	0,0001

CCSC - Classificação de Angina pela Sociedade Canadense de Cardiologia; TDPR - Total de defeito de perfusão miocárdica reversível; PDPR - Percentual de defeito de perfusão miocárdica em repouso; ns, não significativo; P\* = Anova para medidas repetidas ao longo de 6 meses de seguimento, no grupo tratado; P\*\* = Anova para medidas repetidas ao longo de 6 meses de seguimento, no grupo controle; P3\* = Análise univariada da diferença entre o grupo tratado e o grupo controle na avaliação inicial, antes do procedimento de injeção de células mononucleares da medula óssea; P4\* = Anova para medidas repetidas ao longo de 6 meses de seguimento, do grupo tratado em relação ao grupo controle incluindo a interação entre os dois grupos.

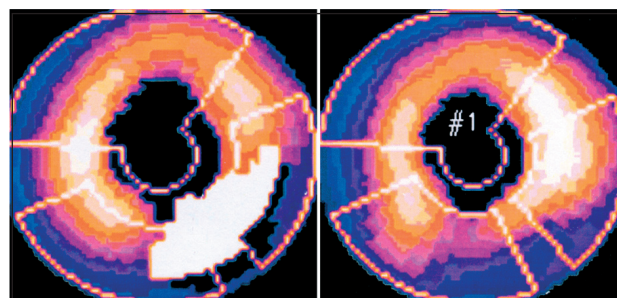


Fig. 2 - Exemplo de cintilografia miocárdica após o tratamento com CMMO. A área branca representa a área de isquemia inicial que desaparece no seguimento de 2 meses.

Resultados clínicos preliminares em pacientes com infarto agudo do miocárdio recente sugerem uma redução na área de fibrose após terapia com células mononucleares de medula óssea<sup>30,31</sup>. No entanto, não há nenhum dado clínico que sugira este tipo de



efeito no modelo de pacientes, com grave disfunção ventricular, apresentado no nosso estudo. Ao contrário, além do fato destes pacientes não terem apresentado melhora do defeito da cintilografia em repouso, o que sugeriria um possível efeito miogênico, devemos observar que houve melhora do VSF e não do VDF sugerindo um melhor desempenho contrátil das áreas viáveis e não o surgimento de novas áreas viáveis. Uma vez que as células foram injetadas somente em áreas de miocárdio isquêmico, é razoável imaginar que aquele meio (micro) ambiente oferecesse forte sinalização angiogênica para as células transplantadas, como, por exemplo, pela presença do Fator de Hipóxia Tecidual (HIF-1, do inglês *hypoxia inducible factor*) gerando Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*). Se esta hipótese se confirmar, a precisão na técnica de liberação celular poderá ser de importância para se atingir os objetivos terapêuticos de cada paciente.

Embora o pequeno número de pacientes e o desenho aberto do estudo possam justificar diferenças estatísticas observadas na comparação de algumas variáveis (efeito *hawthorne*)<sup>58</sup>, os dados apresentados sugerem que os resultados demonstrados podem ser secundários à melhora da perfusão miocárdica.

Neste estudo inicial prospectivo, não randomizado, em pacientes com doença arterial coronária com grave disfunção ventricular e sem outra opção de tratamento, não observamos efeitos adversos graves relacionados ao procedimento, seja na fase de internação, seja no seguimento de 6 meses. Neste período de acompanhamento não observamos deterioração de parâmetros mecânicos e de perfusão nas áreas injetadas, assim como não observamos qualquer sinal de disfunção do sistema de condução. Houve melhora dos sintomas, da função cardíaca e da perfusão miocárdica no grupo tratado em relação ao grupo controle. Nós acreditamos que possa existir um enorme potencial clínico para esta técnica. Investigações futuras conduzidas em estudos maiores e randomizados são necessárias.

## Agradecimentos

O sistema de mapeamento NOGA e os cateteres foram fornecidos pela *Cordis Corporation* (Miami Lakes, Fla, USA).

Este artigo é referente ao prêmio de melhor tema livre julgado pela Comissão Científica, do 58º Congresso da Sociedade Brasileira de Cardiologia, realizado em 28 de setembro de 2003.

## Referências

1. DATASUS. Tecnologia da informação a serviço do SUS. <http://tabnet.datasus.gov.br> 2002.
2. Neto J. A dimensão do problema da insuficiência cardíaca no Brasil. *Rev Soc Cardiol Estado São Paulo* 2004; 14: 1-10.
3. Hogg K, Swedberg K, McMurray J. Heart failure with preserved left ventricular systolic function; epidemiology, clinical characteristics, and prognosis. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43: 317-27.
4. Narain VS, Gilhotra HS. Chronic stable angina - a review on pathophysiology, pharmacotherapy and catheter based treatment. *J Indian Medical Ass* 2003; 101: 240, 242, 244 passim.
5. Hatchett R. Coronary heart disease: 2. The assessment, diagnosis and management of stable angina. *Nursing Times* 2001; 97: 39-42.
6. Aronow WS, Frishman WH. Spinal cord stimulation for the treatment of angina pectoris. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 2004; 6: 79-83.
7. Sayeed-Shah U, Mann MJ, Martin J et al. Complete reversal of ischemic wall motion abnormalities by combined use of gene therapy with transmyocardial laser revascularization. *J Thorac Cardiovasc Surgery* 1998; 116: 763-9.
8. Puc MM, Levin S, Tran HS, Marra S, Hewitt CW, Del Rossi AJ. Transmyocardial laser revascularization: current status. *J Investigative Surgery* 2000; 13: 15-27.
9. Piechota W, Dziuk M. [Transmyocardial laser revascularization]. *Polski Merkuriusz Lekarski* 2002; 13: 5-9.
10. Lee LY, O'Hara MF, Finnin EB et al. Transmyocardial laser revascularization with excimer laser: clinical results at 1 year. *Ann Thoracic Surgery* 2000; 70: 498-503.
11. Landolfo CK, Landolfo KP, Hughes GC, Coleman ER, Coleman RB, Lowe JE. Intermediate-term clinical outcome following transmyocardial laser revascularization in patients with refractory angina pectoris. *Circulation* 1999; 100: II128-33.
12. Korepanov VI, Ambartsumian VR, Eliseenko VI, Zdradovskii SR. [Laser transmyocardial revascularization of the myocardium in ischemic heart disease]. *Vestnik Khirurgii Imeni I. I. Grekova* 1997; 156: 76-8.
13. Grines CL, Watkins MW, Helmer G et al. Angiogenic gene therapy (AGENT) trial in patients with stable angina pectoris. *Circulation* 2002; 105: 1291-7.
14. Grines CL, Engler R, Brinker J et al. Therapeutic angiogenesis: Hope or hype: response. *Circulation* 2002; 106: e220.
15. Losordo DW, Vale PR, Symes JF et al. Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *J Vasc Interv Radiology* 1999; 10: 838-9.
16. Losordo DW, Vale PR, Hendel RC et al. Phase 1/2 placebo-controlled, double-blind, dose-escalating trial of myocardial vascular endothelial growth factor 2 gene transfer by catheter delivery in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation* 2002; 105: 2012-8.
17. Losordo DW, Vale PR, Isner JM. Gene therapy for myocardial angiogenesis. *Am Heart J* 1999; 138 (2, Part 2) Suppl.: S132-S41.
18. Losordo DW, Vale PR, Symes JF et al. Gene therapy for myocardial angiogenesis: Initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation* 1998; 98: 2800-4.
19. Mukherjee D, Ellis SG. New options for untreatable coronary artery disease: angiogenesis and laser revascularization. *Cleveland Clinic J Med* 2000; 67: 577-83.
20. Tandar A, Saperia GM, Spodick DH. Direct myocardial revascularization and therapeutic angiogenesis. *Eur Heart J* 2002; 23: 1492-502.
21. Hughes S. Cardiac stem cells. *J Pathol* 2002; 197: 468-78.
22. Fuchs S, Baffour R, Zhou YF et al. Transendocardial delivery of autologous bone marrow enhances collateral perfusion and regional function in pigs with chronic experimental myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 1726-32.
23. Sakai T, Li RK, Weisel RD et al. Autologous heart cell transplantation improves cardiac function after myocardial injury. *Ann Thorac Surg* 1999; 68: 2074-80; discussion 2080-1.
24. Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P et al. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med* 1998; 4: 929-33.
25. Dutra HS, El-Cheikh MC, Azevedo SP, Rossi MI, Borojevic R. Murine schistosomiasis mansoni: experimental analysis of bone marrow and peripheral myelopoiesis. *Parasitol Res* 1998; 84: 668-75.
26. Olivares E, Dohmann HF et al. ACCE. Cellular cardiomyoplasty with bone marrow cells improves cardiac performance in heart failure induced by healed infarct in rats. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 181A.
27. Strauer BE, Brehm M, Zeus T et al. [Intracoronary, human autologous stem cell transplantation for myocardial regeneration following myocardial infarction]. *Dtsch Med Wochenschr* 2001; 126: 932-8.
28. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 2002; 360: 427-35.
29. Menasche P. Myoblast transplantation: feasibility, safety and efficacy. *Ann Med* 2002; 34: 314-5.
30. Assmus B, Schachinger V, Teupe C et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002; 106: 3009-17.
31. Strauer BE, Brehm M, Zeus T et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002; 106: 1913-8.
32. La Russa VF, Schwarzenberger P, Miller A, Agrawal K, Kolls J, Weiner R. Marrow stem cells, mesenchymal progenitor cells, and stromal progeny. *Cancer Invest* 2002; 20: 110-23.
33. Asahara T, Kalka C, Isner JM. Stem cell therapy and gene transfer for regeneration. *Gene Ther* 2000; 7: 451-7.
34. Asahara T, Masuda H, Takahashi T et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999; 85: 221-8.
35. Al-Khalidi A, Al-Sabti H, Galipeau J, Lachapelle K. Therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow stromal cells: improved blood flow in a chronic limb ischemia model. *Ann Thorac Surg* 2003; 75: 204-9.

36. Carmeliet P, Luttun A. The emerging role of the bone marrow-derived stem cells in (therapeutic) angiogenesis. *Thromb Haemost* 2001; 86: 289-97.
37. Hamano K, Li TS, Kobayashi T et al. Therapeutic angiogenesis induced by local autologous bone marrow cell implantation. *Ann Thorac Surg* 2002; 73: 1210-5.
38. Hamano K, Li TS, Kobayashi T et al. The induction of angiogenesis by the implantation of autologous bone marrow cells: a novel and simple therapeutic method. *Surgery* 2001; 130: 44-54.
39. Ikenaga S, Hamano K, Nishida M et al. Autologous bone marrow implantation induced angiogenesis and improved deteriorated exercise capacity in a rat ischemic hindlimb model. *J Surg Res* 2001; 96: 277-83.
40. Kawamoto A, Tkebuchava T, Yamaguchi J-I et al. Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circulation* 2003; 107: 461-8.
41. Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T et al. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation* 2001; 104: 1046-52.
42. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 2001; 7: 430-6.
43. Takakura N, Watanabe T, Suenobu S et al. A role for hematopoietic stem cells in promoting angiogenesis. *Cell* 2000; 102: 199-209.
44. Tomita S, Mickle DA, Weisel RD et al. Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002; 123: 1132-40.
45. Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA et al. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg* 2002; 73: 1919-25; discussion 1926.
46. Stamm C, Westphal B, Kleine HD et al. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003; 361: 45-6.
47. Hamano K, Nishida M, Hirata K et al. Local implantation of autologous bone marrow cells for therapeutic angiogenesis in patients with ischemic heart disease: clinical trial and preliminary results. *Jpn Circ J* 2001; 65: 845-7.
48. Tse HF, Kwong YL, Chan JK, Lo G, Ho CL, Lau CP. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet* 2003; 361: 47-9.
49. Fuchs S, Satler LF, Kornowski R. Catheter-based autologous bone marrow myocardial injection in no-option patients with advanced coronary artery disease. A feasibility study. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 1721-4.
50. Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation* 2003; 107: 2294-302.
51. Coutinho L. Clonal and long-term cultures using human bone marrow. *Haemopoiesis: A Practical Approach* 1993: 84-85.
52. Perin EC, Silva G, Sarmento-Leite R et al. Assessing myocardial viability and infarct transmural extent with left ventricular electromechanical mapping in patients with stable coronary artery disease: validation by delayed-enhancement magnetic resonance imaging. *Circulation* 2002; 106: 957-61.
53. Perin EC, Silva G, Sarmento-Leite R. Left Ventricular Electromechanical Mapping as a Diagnostic Method. New York, NY: Wiley-Liss, 2001: 183-95.
54. Review of the II Guidelines of the Sociedade Brasileira de Cardiologia for the diagnosis and treatment of heart failure. *Arq Bras Cardiol* 2002; 79(suppl. 4): 1-30.
55. Olivares EL, Ribeiro VP, Castro JPW. Bone marrow stromal cells improve cardiac performance in healed infarcted rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287(2): H464-70.
56. Leon MB. DMR in regeneration endomyocardial channels trial. 12th Annual Transcatheter Cardiovascular Therapeutic, Washington DC, 17-22 Oct. 2000.
57. Leon MB, Baim DS, Moses JW et al. A randomized blinded clinical trial comparing percutaneous laser myocardial revascularization, using Biosense LV mapping, vs placebo in patients with refractory coronary ischemia. *Circulation* 2000; 111: 565.
58. Wickstrom G, Bendix T. The "Hawthorne effect"—what did the original Hawthorne studies actually show? *Scand J Work Environ Health* 2000; 26: 363-7.