



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

PROTOCOLO DE PESQUISA: IMPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO EM
PACIENTES COM CARDIOPATIA ISQUÊMICA GRAVE

Jaime Giovany Arnez Maldonado

MANAUS
2012

**PROTOCOLO DE PESQUISA: IMPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO EM
PACIENTES COM CARDIOPATIA ISQUÊMICA GRAVE**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

PROTOCOLO DE PESQUISA: IMPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO EM
PACIENTES COM CARDIOPATIA ISQUÊMICA GRAVE

Tese apresentada à Pós-graduação em
Biotecnologia da Universidade Federal do
Amazonas para obtenção do título de
Doutor,
Área de Concentração: Saúde

Aluno: Jaime Giovany Arnez Maldonado
Orientadora: Profa. Dra. Adriana Malheiro

MANAUS
2012

Ficha Catalográfica
Biblioteca Central da UFAM)

(Catalogação realizada pela

Maldonado, Jaime Giovany Arnez

N. Protocolo de pesquisa: implante de células tronco em
pacientes com cardiopatia isquêmica grave / Jaime Giovany
Arnez Maldonado. - Manaus: UFAM, 2012.
109 f.; il. color.

P Tese (Doutorado em Biotecnologia) — Universidade
Federal do Amazonas, 2012.
Orientadora: Prof^a. Dra. Adriana Malheiro

1. Cardiopatia isquêmica 2. Epidemiologia 3. Células
tronco- Pesquisa I. Malheiro, Adriana (Orient.) II.
Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU 616-12-008.46(043.2)

Todos os direitos deste relatório são reservados à
Universidade Federal do Amazonas e ao seu autor. Parte
deste relatório só poderá ser reproduzida para fins
acadêmicos ou científicos.

Esta pesquisa foi financiada pelo Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), Processo
553237/2005-6, pela Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), e
desenvolvida no Hospital Universitário Francisca Mendes (HUFM) e na Fundação de
Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM).

RESUMO

A insuficiência cardíaca (IC) acomete aproximadamente 2% da população mundial. A cardiopatia isquêmica é responsável por 2/3 da IC, a qual, quando estabelecida, implica limitações físicas, repetidas internações hospitalares, piora da qualidade de vida e aumento da morbimortalidade. As alternativas terapêuticas variam desde o tratamento farmacológico até o transplante cardíaco. Modernas estratégias de reperfusão e avançadas condutas farmacológicas têm propiciado um aumento na sobrevida dos pacientes com cardiopatia isquêmica, porém nenhuma estratégia de tratamento recupera o dano aos cardiomiócitos e à vasculatura perdida; é nesse sentido que o conceito de medicina regenerativa utilizando células-tronco (CT) para o reparo de tecidos pode tornar-se realidade. A mobilização e implante autólogo de CT hematopoéticas CD34+ podem melhorar a função e perfusão. Um total de 15 pacientes com cardiopatia isquêmica grave, inelegíveis para outra alternativa terapêutica, receberam células autólogas CD34+ coletadas de sangue periférico (SP), previamente mobilizadas com fator de estimulação de colônias de granulócitos (G-CSF). As CT coletadas de SP foram implantadas no miocárdio utilizando duas vias (intracoronariana e seio coronariano). Realizou-se em todos os pacientes uma avaliação clínica, laboratorial e exames complementares de imagem para avaliar função, perfusão e voltagem do ventrículo esquerdo. Após 4 meses de seguimento pós-implante, todos os pacientes foram reavaliados. Dos 15 pacientes incluídos, dois foram a óbito durante o seguimento (pós-implante tardio). As diferentes variáveis analisadas no seguimento de 4 meses mostraram uma melhora na classe funcional ($p = 0,014$), escore de angina (Canadian Cardiovascular Society) ($p = 0,006$), teste da caminhada de 6 minutos ($p = 0,005$) e qualidade de vida ($p = 0,003$). A fração de ejeção analisada por ecocardiograma e ressonância magnética mostrou uma discreta melhora, porém sem significância estatística ($p = 0,062$ e $p = 0,0397$); a cintilografia do miocárdio mostrou uma melhora da viabilidade, porém sem significância (20,79 para 27,14%; $p = 0,390$); a atividade elétrica do ventrículo esquerdo realizada através do mapeamento eletroanatômico não mostrou alterações significativas ($p = 0,767$). O implante de CT CD34+ no miocárdio utilizando duas vias simultâneas é seguro. No seguimento de 4 meses os pacientes apresentaram uma melhora em relação à sintomatologia e qualidade de vida, porém sem melhora significativa na função, perfusão e voltagem do ventrículo esquerdo.

Palavras-chave: Terapia celular, G-CSF, CD34+, cardiopatia isquêmica.

ABSTRACT

Heart failure (HF) affects approximately 2% of the world population. Ischemic cardiomyopathy accounts for two-thirds of cases of HF, which, when established, leads to physical limitations, multiple hospital admissions, declining quality of life, and increasing morbidity and mortality. Therapeutic alternatives range from pharmacological treatment to heart transplantation. Modern reperfusion strategies and advanced pharmacotherapeutic management have contributed to increase the survival of patients with ischemic cardiomyopathy, but none of these treatment strategies can reverse damage to cardiomyocytes or recover lost vasculature. Within this context, the concept of regenerative medicine, using stem cells (SC) for tissue repair, may become a reality. Mobilization and implantation of autologous, CD34+ hematopoietic SCs may improve myocardial function and perfusion. A total of 15 patients with severe ischemic cardiomyopathy, not eligible for other therapeutic alternatives, received autologous CD34+ cells collected from peripheral blood (PB) after G-CSF mobilization. SCs collected from PB were implanted in the myocardium using two routes (intracoronary and via the coronary sinus). All patients underwent clinical, laboratory, and imaging-based assessment to evaluate left ventricular function, perfusion and voltage. All patients were reevaluated after 4 months of post-implantation follow-up. Of the 15 initial patients, two died during follow-up (late post-implantation mortality). The different variables analyzed at 4-month follow-up showed improvement in functional classification ($p=0.014$), angina score (CCS) ($p=0.006$), the six-minute walk test ($p=0.005$), and quality of life ($p=0.003$). There was minor improvement in ejection fraction, as analyzed by echocardiography and magnetic resonance imaging, without reaching statistical significance ($p=0.062$ and $p=0.0397$ respectively); myocardial perfusion scintigraphy showed a non-significant improvement in viability (20.79% to 27.14%, $p=0.390$). Electroanatomic mapping of the left ventricle did not show any significant changes in electrical activity ($p=0.767$). CD34+ SC implantation into the myocardium using two routes simultaneously is a safe procedure. At 4-month follow-up, patients experienced improvement in symptoms and quality of life, but without significant improvement in left ventricular function, perfusion and voltage.

Key words: Cell therapy, G-CSF, CD34+, ischemic cardiomyopathy.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AAS	Ácido acetilsalicílico
A-CD	Artéria coronária direita
A-CX	Artéria circunflexa
A-DA	Artéria descendente anterior
AE	Átrio esquerdo
ARA 2	Antagonista dos receptores de antagonista II
ATC	Angioplastia transluminal coronariana
BS	Basófilos
BT	Bastões
CCS	Canadian Cardiovascular Society
CD	Artéria coronária direita
CDI	Cardiodesfibrilador implantável
CENUSA	Centro de Medicina Nuclear
CF	Classe funcional
CKMB	Creatinina-kinase
CM	Cintilografia do miocárdio
CNPq	Conselho Nacional de Pesquisa
CPK	Creatinofosfoquinase
Cr	Creatinina
CT	Células-tronco
CTAHSP	Células-tronco autólogas hematopoéticas de sangue periférico
CTH	Células-tronco hematopoéticas
CTM	Células-tronco mesenquimais
CTMO	Células-tronco de medula óssea
DATASUS	Banco de Dados do Sistema Único de Saúde

DDFVE	Diâmetro diastólico final de ventrículo esquerdo
DDVE	Diâmetro diastólico de ventrículo esquerdo
DHL	Desidrogenase lática
DP	Desvio padrão
DSFVE	Diâmetro sistólico final de ventrículo esquerdo
DSVE	Diâmetro sistólico de ventrículo esquerdo
EACV	Eventos adversos cardiovasculares
ECG	Eletrocardiograma
ECO	Ecocardiograma
EO	Eosinófilos
ESV	Extra-sístoles supraventriculares
EV	Extra-sístoles ventriculares
F	Feminino
FAPEAM	Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Amazonas
FC	Frequência cardíaca
FE	Fração de ejeção
FEVE	Fração de ejeção de ventrículo esquerdo
f_i	frequência absoluta simples
FR	Frequência respiratória
FV	Fibrilação ventricular
G-CSF	Fator de estimulação de colônias de granulócitos
GM-CSF	Fator de estimulação de colônias de macrófagos granulócitos (<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>)
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HB	Hemoglobina
HEMOAM	Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
HM	Hemácias

HT	Hematócrito
HUFM	Hospital Universitário Francisca Mendes
HSJ	Hospital Santa Júlia
IAM	Infarto agudo de miocárdio
IC	Insuficiência cardíaca
ICT	Índice cardiotorácico
IC95%	Intervalo de confiança de 95%
IECA	Inibidores da enzima conversora da angiotensina
IMC	Índice de massa corporal
ISHAGE	International Society for Hematotherapy and Graft Engineering
K	Potássio
LAD	Descendente anterior esquerda
LC	Leucócitos
LF	Linfócitos
MIBI	2-metoxi-isobutil-isonitrila-99mTc
ML	Metamielocitos
MLHFQ	Minnesota Living with Heart Failure Questionnaire
MMII	Membros inferiores
MN	Monócitos
MO	Medula óssea
MT	Mastocitos
mV	Milivolts
MVolt	Mapa de voltagem
Na	Sódio
NYHA	New York Heart Association
OM	Marginal obtuso
PA	Pressão arterial

PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
PD	Descendente posterior
PLA	Plaquetas
P-P	Pico-a-pico
QQdv	Questionário de qualidade de vida
RC	Coronária direita
RM	Ressonância magnética
RMi	Revascularização de miocárdio
SC	Seio coronariano
SCF	Fator de células tronco (<i>stem cell factor</i>)
SEG	Segmentados
SP	Sangue periférico
SUS	Sistema Único de Saúde
TC	Teste da caminhada de 6 minutos
TCE	Tronco da coronária esquerda
TGO	Transaminase glutâmico-oxalacética
TGP	Transaminase glutâmico-piruvica
TIMI	Fluxo coronariano
TRx	Tempo de fluoroscopia
TSV	Taquicardia supraventricular
TSVns	Taquicardia supraventricular não sustentada
TV	Taquicardia ventricular
TVns	Taquicardia ventricular não sustentada
VDVE	Volume diastólico de ventrículo esquerdo
VE	Ventrículo esquerdo

VSVE	Volume sistólico de ventrículo esquerdo
VSFVE	Volume sistólico final de ventrículo esquerdo
Vot ID	Identificação de voltagem
VM	Viabilidade do miocárdio

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Implante de células-tronco, modelo experimental	25
Figura 2 – Diferentes rotas de administração das células-tronco no miocárdio.....	30
Figura 3 – Imagem do sistema arterial cardíaco, via anterógrada de implante	30
Figura 4 – Imagem do sistema venoso cardíaco, via retrógrada de implante.....	31
Figura 5 – Aférese em ciclo doador/paciente	37
Figura 6 – Citometria: quantificação de células CD34+ presentes na suspensão	39
Figura 7 – Seis seringas contendo a suspensão de células-tronco e implante	40
Figura 8 – Fluxograma do protocolo de estudo	44
Figura 9 – Mapa de análise de voltagem do miocárdio (pico-a-pico).....	50
Figura 10 – Mapa de voltagem → área sem atividade elétrica (cicatriz) < 0,5 mV; área transicional = 0,5 a 1,5 mV; área de miocárdio normal > 1,5 mV.....	49
Figura 11 – Distribuição segundo a mediana dos valores dos leucócitos (mm ³), num período de 15 dias, nos pacientes acompanhados no Hospital Universitário Francisca Mendes, Manaus (AM).....	56
Figura 12 – Pico de CD34+ no quarto dia (efeito da terceira dose de G-CSF), análise da citometria.....	57
Figura 13 – Distribuição segundo a mediana dos valores do CD34+ x 10 ³ em três medições dos pacientes acompanhados no Hospital Universitário Francisca Mendes, Manaus (AM)....	60
Figura 14 – Distribuição segundo a mediana do escore da classe funcional antes e 4 meses após implante de células-tronco nos pacientes acompanhados no Hospital Universitário Francisca Mendes, Manaus (AM)	60
Figura 15 – Distribuição segundo a mediana do escore da classe de angina antes e 4 meses após implante de células-tronco nos pacientes acompanhados no Hospital Universitário Francisca Mendes, Manaus (AM)	61

Figura 16 – Distribuição segundo a média e intervalo de confiança de 95% do teste da caminhada de 6 minutos antes e após implante de células-tronco nos pacientes acompanhados no Hospital Universitário Francisca Mendes, Manaus (AM).....	62
Figura 17 – Distribuição segundo a mediana dos pontos do teste para medir a qualidade de vida antes e 4 meses após implante de células-tronco nos pacientes acompanhados no Hospital Universitário Francisca Mendes, Manaus (AM)	63
Figura 18 – Distribuição segundo a média e intervalo de confiança de 95% do resultado do ecocardiograma antes e 4 meses após implante de células-tronco nos pacientes acompanhados no Hospital Universitário Francisca Mendes, Manaus (AM).....	64
Figura 19 – Distribuição segundo a média e intervalo de confiança de 95% do resultado da ressonância magnética antes e 4 meses após implante de células-tronco nos pacientes acompanhados no Hospital Universitário Francisca Mendes, Manaus (AM).....	65
Figura 20 – Distribuição segundo a média e intervalo de confiança de 95% do resultado da cintilografia do miocárdio antes e 4 meses após implante de células-tronco nos pacientes acompanhados no Hospital Universitário Francisca Mendes, Manaus (AM).....	66
Figura 21 – Cintilografia de miocárdio, imagens de bullseye mostrando uma melhora da perfusão do miocárdio (redução da cicatriz, aumento da viabilidade)	66
Figura 22 – Mapa de voltagem do ventrículo esquerdo, paciente do protocolo. Pontilhado amarelo: pontos coletados validados; cor cinza: voltagem < 0,5 mV (área inativa anteroapical e septal).....	67
Figura 23 – Distribuição segundo a média e intervalo de confiança de 95% do resultado do mapa de voltagem do miocárdio antes e após implante de células-tronco nos pacientes acompanhados no Hospital Universitário Francisca Mendes, Manaus (AM).....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição segundo a frequência e a média dos ciclos e do volume da aférese dos pacientes submetidos a implante de células-tronco que são acompanhados no Hospital Universitário Francisca Mendes, Manaus (AM)	37
Tabela 2 – Total de células CD34+ implantadas (60 ml) através de duas vias	40
Tabela 3 – Distribuição segundo a frequência de gênero, idade, risco cardiovascular, histórico médico, índice de massa corporal e eletrocardiograma de pacientes submetidos a implante de células-tronco acompanhados no Hospital Universitário Francisca Mendes, Manaus (AM). .	54
Tabela 4 - Distribuição segundo a frequência da terapia farmacológica aplicada aos pacientes submetidos a implante de células-tronco acompanhados no Hospital Universitário Francisca Mendes, Manaus (AM).....	55
Tabela 5 – Intercorrências durante implante das células-tronco autólogas hematopoéticas de sangue periférico.....	59
Tabela 6 – Eventos adversos cardiovasculares	69

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Classificação funcional (New York Heart Association).....	50
Quadro 2 – Classificação de <i>angina pectoris</i> (Canadian Cardiology Society)	51

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Epidemiologia	21
1.2 Células-tronco	22
1.3 Fonte de células-tronco.....	22
1.4 Coleta de células-tronco adultas.....	25
1.5 Implante de células-tronco	28
2 HIPÓTESE E OBJETIVOS	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 População do estudo	33
3.2 Questões éticas do estudo	33
3.3 Tipo de estudo	34
3.4 Critérios de inclusão	34
3.5 Critérios de exclusão.....	34
3.6 Exames preliminares e de seguimento	35
3.7 Mobilização e coleta de células-tronco.....	36
3.8 Implante de células-tronco	41
3.8.1 Via anterógrada intracoronariana.....	41
3.8.2 Via retrógrada – sistema venoso cardíaco	41
3.9 Terapia medicamentosa	42
3.10 Seguimento	42
3.11 Análise estatística.....	43
3.12 Desenho do estudo – fluxograma.....	44
3.13 Exames complementares para análise dos objetivos	44
4. RESULTADOS	53

4.1 Eficácia do fator de estimulação de colônias de granulócitos	55
4.2 Aférese e citometria de fluxo	56
4.3 Implante de células-tronco autólogas hematopoéticas de sangue periférico	58
4.4 Seguimento de 4 meses	59
4.5 Eventos adversos cardiovasculares	68
5 DISCUSSÃO	70
5.1 Segurança e eficácia da terapia	70
5.2 Limitações do estudo	74
5.3 Implicações clínicas	75
6 CONCLUSÕES.....	77
REFERÊNCIAS	78
APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	84
APÊNDICE B - PROTOCOLO de TERAPIA CELULAR – ISQUÊMICO.....	88
AGRADECIMENTOS	96

Acho que quando você faz algo que dá muito certo,
deve partir para outra coisa ainda mais maravilhosa,
em vez de insistir durante muito tempo no que já foi feito.
Basta imaginar o que virá em seguida.

STEVE JOBS

1 INTRODUÇÃO

A insuficiência cardíaca (IC) é reconhecida como um grave problema de saúde em todo o mundo, acometendo aproximadamente 2% da população mundial e consumindo até 2% dos custos totais em saúde. A etiologia da IC é variada, sendo que as causas mais frequentes são: isquêmica, hipertensiva, valvular e dilatada. A cardiopatia isquêmica é responsável por 2/3 da IC nos Estados Unidos e na Europa, segundo dados da American Heart Association (2002).

No Brasil, não há dados epidemiológicos consistentes sobre a proporção entre as etiologias, porém a principal causa de IC é a cardiopatia isquêmica e a hipertensão arterial. Além destas, em determinadas regiões geográficas do país e em áreas de baixas condições socioeconômicas, ainda existem formas de IC associadas à doença de Chagas, endomiocardiofibrose e cardiopatia valvular reumática crônica, que são situações específicas de IC em nosso meio, segundo dados da *III Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica* (BOCCHI *et al*, 2009).

No último censo (2010), observou-se um crescimento da população idosa no Brasil e, portanto, potencial crescimento de pacientes em risco ou portadores de IC segundo dados da última atualização das *Diretrizes Brasileiras de Insuficiência Cardíaca Crônica* (BOCCHI *et al*, 2012).

A IC, quando estabelecida, implica limitações físicas, sucessivas internações hospitalares, piora da qualidade de vida e progressão significativa da morbimortalidade. Os pacientes com IC morrem por duas grandes causas, que são: a falência elétrica (morte súbita cardíaca) e a falência mecânica (falha de bomba). As alternativas terapêuticas variam desde o acompanhamento clínico com terapia farmacológica até o transplante cardíaco (padrão-ouro para o tratamento da IC). Entre esses dois extremos, temos

alternativas como a angioplastia, valvuloplastia, revascularização miocárdica, troca valvular, ventriculectomia, cardiomioplastia, uso de ressinchronizadores, cardiodesfibriladores e outros. Todo esse arsenal terapêutico pode ser aplicado visando melhorar a qualidade de vida e aumentar a sobrevida dos pacientes. Mesmo assim, a IC tem um prognóstico sombrio, por ter uma mortalidade de 30 a 50% em 1 ano, dependendo da classe funcional (CF) do paciente (AMERICAN HEART ASSOCIATION, 2002).

O conceito de medicina regenerativa utilizando células-tronco (CT) para o reparo dos tecidos pode tornar-se realidade à medida que novos trabalhos da ciência básica e experiências clínicas juntem esforços para desenvolver estratégias terapêuticas alternativas para o tratamento do miocárdio doente (STRAUER, 2002; STRAUER; KORNOWSKI, 2003).

Atualmente, no mundo, se está dando grande importância a essa nova estratégia terapêutica: o implante de CT indiferenciadas no miocárdio (ROSSI NETO *et al*, 2004).

Reparo potencial por enxerto celular ou mobilização de células endógenas têm uma particular atração na doença cardíaca, onde a deficiente capacidade de proliferação do cardiomiócito provavelmente contribui para a irreversibilidade da doença cardíaca; se progenitores cardíacos existem no miocárdio adulto, ainda não se sabe, assim como a questão se células precursoras cardíacas indiferenciadas meramente se fundem com miócitos preexistentes (OH *et al*, 2003).

Sobre os mecanismos através dos quais a terapia celular poderia gerar benefícios, também pouco se sabe, porém o crescimento, a transdiferenciação e o destino das CT dependem da colocação do enxerto no local apropriado. O destino das CT da medula óssea (CTMO) está determinado pelo meio no qual elas são colocadas ao invés de seu destino intrínseco programado (STRAUER; KORNOWSKI, 2003).

Os objetivos do implante de CT nas diferentes cardiopatias, principalmente na isquêmica, são de promover uma melhora da FE, diminuir o volume sistólico final do ventrículo esquerdo (VSFVE), evitar o remodelamento ventricular, melhorar a reserva de fluxo coronariano e aumentar a viabilidade do miocárdio (VM) (SZMITKO *et al*, 2003).

1.1 Epidemiologia

A prevalência de IC no mundo é de aproximadamente 23 milhões de pessoas; no Brasil, não há estudos epidemiológicos envolvendo a prevalência de IC, porém se estima que mais de 7 milhões de brasileiros sofram dessa doença (DATASUS, 2001).

A incidência de IC no mundo, é de aproximadamente 2 milhões de novos casos/ano, sendo, no Brasil, de aproximadamente 400 mil internações/ano em decorrência de quadros agudos da doença. Metade dos pacientes diagnosticados morre em um período de 5 anos, 40% deles no primeiro ano após o diagnóstico (DATASUS, 2001).

Essa doença é a terceira maior causa de hospitalização e a primeira causa de internação por doença cardiovascular na rede pública de saúde (SUS), gerando gastos anuais de R\$ 154 milhões, segundo o Banco de Dados do Sistema Único de Saúde (DATASUS) (2005).

Em 2007 a IC foi responsável por 2,6% das hospitalizações e por 6% dos óbitos registrados pelo SUS-MS no Brasil, consumindo 3% do total dos recursos utilizados para atender todas as internações pelo sistema.

1.2 Células-tronco

As CT são uma população de células indiferenciadas, precursoras teciduais imaturas, com: (1) grande capacidade de proliferação e autorrenovação e (2) capacidade de responder a estímulos externos e dar origem a diferentes linhagens celulares mais especializadas (PEREIRA *et al*, 2008). Isso significa que são células pluripotentes, com capacidade de diferenciação (BREHM; ZEUS; STRAUER, 2002).

As CTMO são conhecidas desde a década de 50 e vinham sendo utilizadas para o tratamento de diferentes doenças que afetam o sistema hematopoético. Nos últimos anos, vem se questionando a possibilidade de que as CT hematopoéticas (CTH) poderiam ter um potencial muito mais amplo de diferenciação, sendo capazes de dar origem a tecidos diferentes daqueles onde residem. Grupos de pesquisa estão explorando a capacidade terapêutica das CTMO em doenças não hematopoéticas (PEREIRA *et al*, 2008).

Atualmente, a aplicação clínica das CT adultas humanas representam a mais promissora abordagem para regeneração celular orgânica no tratamento de doenças cardíacas e extracardíacas. Em condições favoráveis, as CT adultas podem se diferenciar em células maduras tissulares (BREHM; ZEUS; STRAUER, 2002).

1.3 Fonte de células-tronco

As fontes de obtenção de CT podem ser embrionária e adulta; cada uma destas possui fatores a favor e contra sua coleta e aplicabilidade (STRAUER; KORNOWSKI, 2003).

A) Fonte embrionária: são células derivadas da massa interna do blastocisto que possuem a capacidade de se diferenciar nos três tipos celulares dos folhetos embrionários

(ectoderma, mesoderma e endoderma) tanto *in vitro* (EVANS *et al*, 1981), como *in vivo* (NAGY *et al*, 1993). Essa capacidade de diferenciação nos três folhetos embrionários faz com que sejam chamadas de CT pluripotentes. Thomson *et al* (1998) relataram pela primeira vez o isolamento de CT embrionárias em humanos.

B) Fonte adulta: são células indiferenciadas encontradas em tecido diferenciado; assim, temos as CTH e as CT mesenquimais (CTM), as quais podem ser obtidas da medula óssea (MO), cordão umbilical, fígado fetal, sangue periférico (SP) e tecido adiposo (FISCHBACH; FISCHBACH, 2004; PRESTON *et al*, 2003). Têm a capacidade de diferenciar-se em vários tipos celulares, normalmente do mesmo folheto embrionário; são chamadas de CT multipotentes. O uso de CT de cordão umbilical foi proposto por Broxmeyer *et al* (1989).

Dentre os tecidos conhecidos por apresentarem CT após a vida pós-natal, a MO foi a mais estudada por muitos anos, tanto como fonte de CTH quanto de CTM (BYDLOWSKI *et al*, 2009).

As CTMO são de especial interesse para a medicina regenerativa; existem evidências de que CTMO circulam para o SP e de volta para a MO, sendo este um processo fisiológico regulado por uma complexa interação de citocinas (MOTA; SOARES; SANTOS, 2005).

Na década de 70, demonstrou-se que a quimioterapia induzia o aumento de CTH. MacCredie, Hersh e Freireich (1971) foram os primeiros a descreverem que as células progenitoras poderiam ser aumentadas no SP.

No final da década de 1980, ocorreu a demonstração de que o fator de estimulação de colônias de granulócitos (*granulocytic-colony stimulating factor* – G-CSF) produzia a mobilização de CTH para a circulação e que as células mobilizadas poderiam ser utilizadas para o transplante (COVAS *et al*, 2009).

As propriedades cardiomiogênicas dos derivados da MO foram observadas pela primeira vez por Bittner *et al* (1999) em modelo experimental.

Em relação às vantagens da fonte embrionária, podemos mencionar que são células *totipotentes* (com capacidade de formar todos os tipos de células intra e extraembrionárias e todos os 216 tecidos) e *pluripotentes*, com alta capacidade de expansibilidade; as desvantagens estão relacionadas à dificuldade na coleta, no isolamento, no risco de rejeição, no alto risco de teratocarcinomas, na exigência da terapia imunossupressora adicional e ao fator ético, que é um grande limitador nas pesquisas. No entanto, são consideradas as mais promissoras das CT para a terapia regenerativa (WOLLERT; DREXLER, 2005).

As vantagens da fonte adulta é que é facilmente obtida, o transplante é autólogo, não é necessária a terapia imunossupressora, e não há objeções éticas. As desvantagens são a limitada capacidade de diferenciação e a ausência de marcadores específicos para essas células quando utilizadas (THOMSON *et al*, 1998).

Estudos experimentais em ratos (Figura 1) sugerem a potencialidade das células progenitoras para uma transdiferenciação em novos cardiomiócitos após infarto agudo do miocárdio experimental (TOMITA *et al*, 1999).

Kawamoto *et al.* (2006) demonstraram que as CT CD34+ (humanos) mobilizadas com G-CSF implantadas em modelos animais (ratos) pós-infarto induzido promovem uma eficácia maior na preservação do miocárdio e na função quando comparadas com implante de células mononucleares totais.

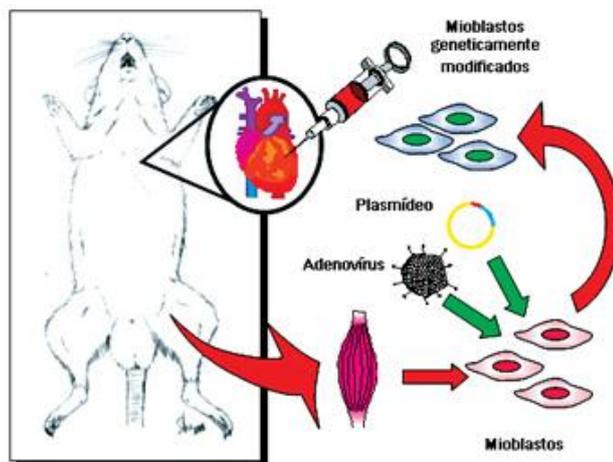


Figura 1 – Implante de células-tronco, modelo experimental

FONTE: Retirado de <http://www.marfan.com.br/links/celulas/tronco/tronco.asp?area=10>, acesso em 15/03/2012.

No infarto agudo do miocárdio clínico, evidências têm mostrado que CTMO autólogas podem regenerar-se dentro do miocárdio infartado e melhorar a perfusão da região comprometida (BARBASH *et al*, 2003).

Assim, por exemplo, inotropismo e estímulo cronotrópico positivos podem promover e intensificar a transdiferenciação de CTMO para o fenótipo de cardiomiócito (STRAUER; KORNOWSKI, 2003).

Perin *et al.* (2003) em um estudo prospectivo não-randomizado em pacientes com cardiopatia isquêmica grave mostraram que o implante de CTMO promove uma melhora da sintomatologia, função cardíaca e perfusão do miocárdio.

1.4 Coleta de células-tronco adultas

A MO representa a principal fonte de CTH e CTM, estas últimas presentes na fração estromal da MO; se estima que há de 1:10.000 a 1:100.000 CTH e aproximadamente 1:200.000 CTM destas células mononucleares na MO. As CTH e CTM

correspondem aproximadamente a cerca de 0,01 a 0,05% e 0,001 a 0,0001%, respectivamente, do total das células nucleadas da MO (ORLIC; CANNON, 2007; BYDLOWSKI *et al*, 2009).

As CTMO podem ser coletadas através de punção direta ou pela técnica de mobilização das CT para o SP, com prévia utilização de fatores de crescimento hematopoéticos recombinantes (citocinas) (SOUZA; MARQUES; BOUZAS, 2009).

As citocinas hematopoéticas tradicionalmente são conhecidas por participar na sobrevivência, proliferação e comprometimento com a linhagem de uma específica via de maturação e diferenciação de progenitores hematopoéticos, células linfoides e mieloides, glóbulos vermelhos e plaquetas. Evidências crescentes indicam que os efeitos biológicos dessas citocinas estendem-se bem além do tradicional domínio da regulação hematopoética (SANGANALMATH *et al*, 2011).

No organismo humano, em situações fisiológicas, após o nascimento, pouca quantidade de células progenitoras está presente no SP, correspondendo a aproximadamente 0,001% (ORLIC; CANNON, 2007).

Para que seja possível a coleta de células progenitoras no SP, deve-se aumentar sua quantidade, fenômeno denominado “mobilização” (da MO para o SP). Para isso, citocinas estão sendo utilizadas, tais como G-CSF, fator de estimulação de colônia de granulócitos-macrófagos (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF), fator de CT (*stem cell factor*, SCF) e outros. A utilização de fatores de crescimento hematopoéticos com intuito de mobilizar células progenitoras para o SP tem mostrado que eles promovem um crescimento de até 100 vezes o número de precursores, em uma dose variando de 0,3 a 60 µg/kg/dia; essa mobilização viabilizaria a coleta por técnicas de leucoaférese para serem criopreservadas e/ou destinadas a transplantes autólogos (SOUZA; MARQUES; BOUZAS, 2009).

A coleta das CT do SP é realizada dias após a mobilização através do procedimento de aférese, o que significa separação e retenção de um componente sanguíneo, com o retorno ao doador ou paciente dos componentes remanescentes. Há diversos equipamentos de aférese disponíveis para coleta de células progenitoras hematopoéticas periféricas. O concentrado de células progenitoras ideal seria aquele que possuísse a maior quantidade das células “desejáveis” e a menor das não desejáveis. As primeiras consistem de células CD34+, e as segundas, de glóbulos vermelhos, granulócitos, plaquetas e outros componentes (SOUZA; MARQUES; BOUZAS, 2009).

Após a estimulação com fatores de crescimento, células primitivas da MO podem alojar-se em regiões infartadas, replicar-se, diferenciar-se e promover reparo do miocárdico; ambos os tipos de CT (mesenquimais e hematopoéticas) podem contribuir para o reparo do músculo cardíaco (ORLIC *et al*, ago. 2001).

Estudos clínicos recentes demonstraram que a utilização de fator de crescimento (G-CSF) estimula potencialmente a mobilização de CT para o SP, e que a coleta destas por aférese não provoca nenhum dano ao paciente com IC (HILL *et al*, 2005).

A terapia com citocinas é um promissor tratamento não invasivo que pode prevenir perda de cardiomiócitos ou regenerar tecido danificado. Pode também ser útil como tratamento adjunto para revascularização mecânica ou terapia celular e para pacientes com isquemia incapacitante apesar de tratamento médico otimizado (BEOHAR *et al*, 2010).

Além de promover a mobilização de células de MO para o miocárdio, numerosos estudos mostram que o G-CSF possui adicionais mecanismos de reparo cardíaco: inibição de apoptose, promoção de angiogênese e reendotelização, proliferação e diferenciação de cardiomiócitos, efeitos cardioprotetores diretos, modulação de matriz extracelular e outros mecanismos parácrinos, todos os quais podem contribuir para melhora na estrutura e função cardíaca (SANGANALMATH *et al*, 2011).

As CT (hematopoéticas e mesenquimais) podem ser fenotipadas e quantificadas por seus antígenos de superfície pelo método de análise por citometria de fluxo (*fluorescence absorbing cell sorting*) (GUTENSOHN; MAGENS; KUEHNL, 2000). Os marcadores antigênicos específicos que melhor expressam as CTH e CTM são:

- a) CTH: CD34⁺ e CD133⁺
- b) CTM: CD34⁻ e CD45⁻

Existem diferentes métodos e protocolos utilizados na quantificação e purificação das CTH através da citometria de fluxo, marcadores antigênicos e marcadores de linhagem negativos, como, por exemplo, anti-CD34⁺; Lin⁻. (BARNETT *et al*, 1999; VOLTARELLI, 2000). Uma das técnicas mais utilizadas é o protocolo da *International Society for Hematotherapy and Graft Engineering* (ISHAGE) (GAJKOWSKA *et al*, 2006)

1.5 Implante de células-tronco

O objetivo principal do implante de CT no miocárdio é manter altas concentrações celulares dentro da área de interesse e evitar o alojamento das células transplantadas em outros órgãos. Dessa forma, foram testadas várias rotas de administração das CT no coração, como mostra a Figura 2, descritas a seguir por alguns autores (STRAUER; KORNOWSKI, 2003; MURAD-NETTO *et al*, 2004; GIORDANO *et al*, 2003):

- a) **Intracoronariana:** As CT selecionadas são colocadas por técnicas de cateterização intracoronariana para um efetivo acúmulo e concentração dessas células dentro da zona infartada. Com a administração intracoronariana, todas as células devem

passar pelo tecido infartado e peri-infartado durante administração de primeira passagem (Figura 3).

- b) **Intravenosa:** É a via mais fácil de administração, sendo que a principal desvantagem é que unicamente um pequeno número de células infundidas atinge a circulação coronariana.
- c) **Intrasseio venoso coronariano:** A perfusão coronariana retrógrada é uma técnica inócua de fácil acesso ao miocárdio isquêmico que pode ser utilizada para a infusão de CT (Figura 4).
- d) **Via direta epicárdica:** Foi recentemente testada em pacientes e ensaiada em grandes experimentos animais, cuja principal vantagem potencial do procedimento cirúrgico é a injeção sob visualização da área alvo e a distribuição das injeções.
- e) **Via direta endocárdica:** A facilidade e segurança da via foram demonstradas através de grandes estudos em animais e algumas experiências em humanos. A manipulação intraventricular do cateter pode lesar o miocárdio e induzir arritmias ventriculares.

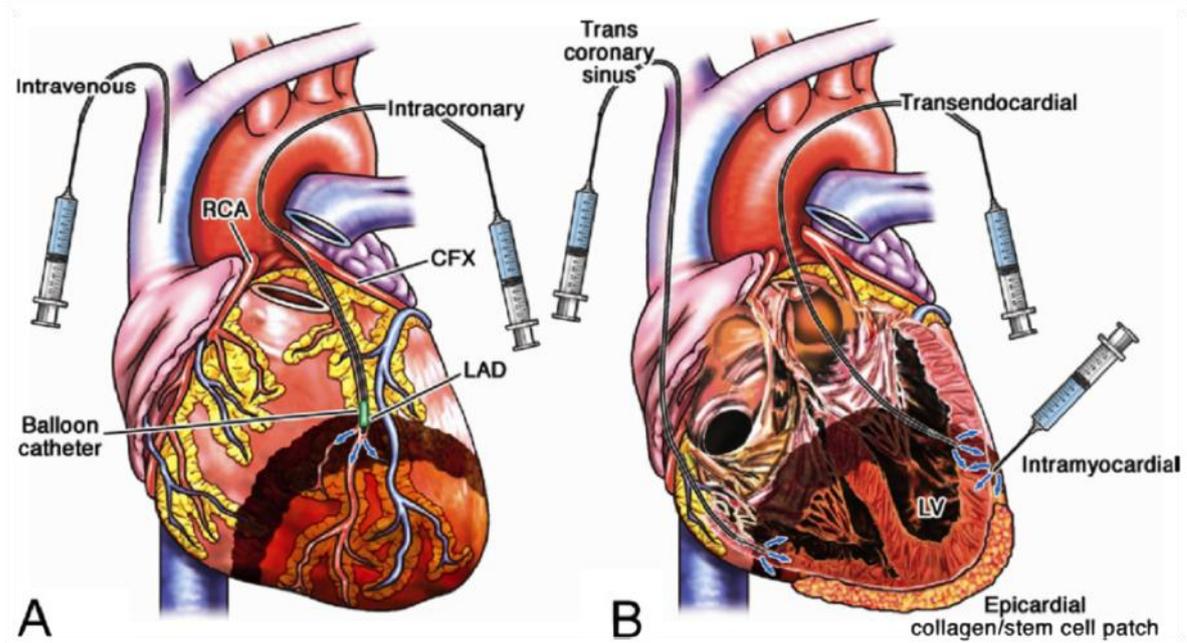


Figura 2 – Diferentes rotas de administração das células-tronco no miocárdio
 FONTE: Strauer; Steinhoff (2011).

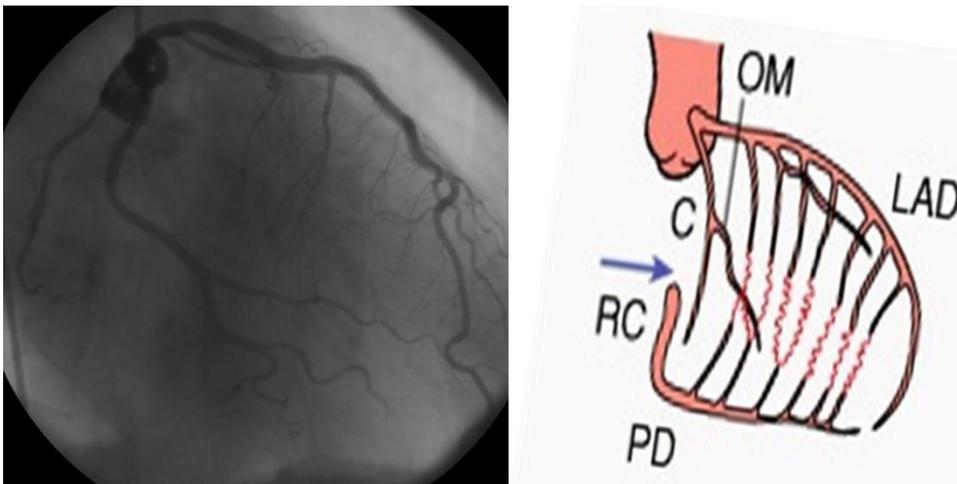


Figura 3 – Imagem do sistema arterial cardíaco, via anterógrada de implante
 LAD = descendente anterior esquerda; OM = marginal obtuso; PD = descendente posterior; RC =
 coronária direita; Cx = circunflexa.
 FONTE: Serviço de Hemodinâmica do Hospital Universitário Francisca Mendes.

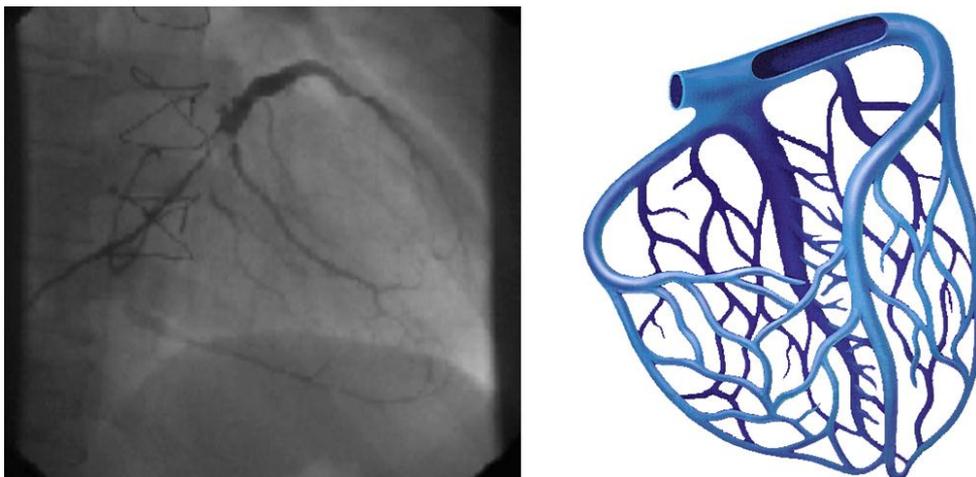


Figura 4 – Imagem do sistema venoso cardíaco, via retrógrada de implante
FONTE: Serviço de Hemodinâmica do Hospital Universitário Francisca Mendes.

2 HIPÓTESE E OBJETIVOS

No presente estudo, a hipótese proposta é de que o implante de CT autólogas hematopoéticas do SP (CTAHSP), previamente mobilizadas com fator de crescimento (G-CSF), em pacientes com cardiopatia isquêmica crônica grave (inelegíveis para qualquer outra alternativa terapêutica) é seguro e benéfico.

Dessa forma, propõe-se verificar essa hipótese tendo os seguintes objetivos:

Objetivos primários

- Avaliar a segurança e impacto do implante por duas vias – arterial e venosa (coronárias e venosa cardíaca) – utilizando CTAHSP, com prévia mobilização com G-CSF, em pacientes com cardiopatia isquêmica crônica grave.
- Avaliar a FE, a viabilidade e a atividade elétrica do miocárdio.

Objetivo secundário

Avaliar a influência do implante de CTAHSP sobre:

- Sintoma de dispneia através da CF da New York Heart Association (NYHA).
- Sintoma de angina através da Canadian Cardiovascular Society (CCS).
- Tolerância ao esforço físico através do teste da caminhada de 6 minutos (TC).
- Qualidade de vida através do escore de Minnesota.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 População do estudo

Neste estudo, foram admitidos pacientes acompanhados no Hospital Universitário Francisca Mendes (HUFM). Para a admissão do paciente no protocolo, cada caso foi apresentado em reunião clínico-cirúrgica, na qual participam médicos cardiologistas, hemodinamicista e cirurgião cardíaco. Uma vez definido que o paciente era inelegível para tratamento cirúrgico ou percutâneo e desde que este preenchesse os critérios de inclusão e exclusão, o paciente era selecionado para o estudo. Na Tabela 1, são expostas as características demográficas, fatores de riscos cardiovasculares, história pregressa, índice de massa corporal e eletrocardiograma (ECG) dos pacientes que foram incluídos no estudo.

3.2 Questões éticas do estudo

O projeto foi aprovado pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa, em abril de 2009, com o número 974/2008, Processo 553237/2005-6.

Todos os pacientes que ingressaram no protocolo foram informados detalhadamente dos objetivos do estudo, da natureza experimental do procedimento proposto, da liberdade de participação, dos riscos inerentes aos procedimentos intervencionistas e ao próprio implante das CT.

Utilizando uma linguagem clara e de fácil compreensão, foi fornecido um relatório de informações e consentimento a cada paciente, o qual foi assinado pelo mesmo e uma

testemunha. Após assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, os pacientes foram incluídos no protocolo (Apêndice A).

3.3 Tipo de estudo

Se trata de estudo clínico descritivo, prospectivo, não randomizado, fase I de intervenção em 15 pacientes com cardiopatia isquêmica crônica grave, inelegíveis para qualquer outra alternativa terapêutica e que preenchiam os critérios de inclusão e exclusão.

3.4 Critérios de inclusão

- Idade > 18 e < 75 anos;
- Cardiopatia isquêmica;
- Pós-infarto do miocárdio > 3 meses;
- FE \leq 45% (acinética e/ou hipocinética);
- CF I, II e III da NYHA;
- Angioplastia há mais de 3 meses;
- Presença ou não de angina;
- Ausência de arritmias ventriculares (TVns e/ou TV);
- Inelegíveis para outra alternativa terapêutica.

3.5 Critérios de exclusão

- CF IV (NYHA);

Aneurisma de VE;

Fibrilação atrial;

Mais de 10 EV/h ou TV ao Holter de 24 horas;

Doença hematológica primária;

Trombo intracavitário;

Infarto do miocárdio há menos de 3 meses;

Outras comorbidades que influenciem na sobrevida a curto prazo.

3.6 Exames preliminares e de seguimento

O exame clínico, testes e exames complementares foram realizados pré-implante, pós-implante (4 meses) e serão realizados aos 12 meses pós-implante. O controle periódico durante 1 ano de seguimento inclui:

1. Exame clínico;
2. Exames laboratoriais;
3. ECG de 12 derivações;
4. Protocolo de caminhada de 6 minutos;
5. Holter de 24 horas;
6. Eco-Doppler colorido;
7. Ressonância magnética (RM) cardíaca;
8. Cintilografia do miocárdio (CM);
9. Mapeamento de voltagem do miocárdio;
10. Cinecoronariografia.

3.7 Mobilização e coleta de células-tronco

Os pacientes incluídos no estudo, após realizarem todos os exames, foram internados para receber G-CSF, monitorar possíveis efeitos adversos da medicação e realizar exames laboratoriais seriados durante o uso da droga. O G-CSF, comercialmente conhecido como Granuloquine (Filgrastim, Neupogen, Amgen, Thousand Oaks, CA), foi administrado na dose de 10 µg/kg, via subcutânea, por um período total de 5 dias (dia 1 – primeira dose), com controle laboratorial diário (hemograma completo) e análise de células CD34⁺/CD45⁻ por citometria de fluxo. Como profilaxia para eventos embólicos, foi utilizada heparina de baixo peso molecular. No quarto dia, que corresponderia ao efeito da terceira dose do G-CSF, foi realizada a aférese em ciclo do doador/paciente (Figura 5), seguida de sua separação em componentes por meio de centrifugação, filtração com retenção do componente celular (“creme de leucócitos”) e devolução dos elementos remanescentes ao doador/paciente. Para a coleta das CT, foi utilizada máquina de aférese MCS+ (Hemonetics MCS+ 9000E) da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) (Figura 5). O número de ciclos realizados dependeu da volemia doador/paciente.



Figura 5 – Aférese em ciclo doador/paciente
 FONTE: Hospital Universitário Francisca Mendes, paciente do protocolo.

De um total de 15 aféreses realizadas, houve uma média de ciclos de $18,9 \pm 3,1$. O tempo médio de duração da aférese foi de aproximadamente 170 minutos. Para esse procedimento, o paciente foi colocado em uma unidade de cuidados semi-intensivos e foram monitorados os batimentos cardíacos e pressão arterial. Esse procedimento foi realizado no HUFM.

Aférese (n = 15)	f_i	%
Ciclos		
16 --- 21	9	53,3
21 --- 25	6	46,7
Média \pm DP	$18,9 \pm 3,1$	
Amplitude	16-25	
Volume (ml)		
96 --- 110	2	13,3
110 --- 120	7	46,7
120 --- 130	4	26,7
≥ 130	2	13,3
Média \pm DP	$117,3 \pm 10,9$	
Amplitude	96 - 141	

Tabela 1 – Distribuição segundo a frequência e a média dos ciclos e do volume da aférese dos pacientes submetidos a implante de células-tronco que são acompanhados no Hospital Universitário Francisca Mendes, Manaus (AM)
 f_i = frequência absoluta simples; DP = desvio padrão.

Após a aférese, o material foi transferido para o HEMOAM, onde realizou-se a separação dos componentes, utilizando o protocolo de gradiente de Ficoll. Em seguida, uma alíquota da amostra foi retirada para que as mesmas fossem contadas em câmara de Neubauer a fim de estimar a viabilidade celular. Por conseguinte, as células mononucleares são ressuspensas em 60 ml de solução salina (NaCl 0,9%) estéril e soro autólogo a 5%. Dessa suspensão, é retirada uma amostra para quantificar as células CD34+. Essa análise é realizada pela citometria de fluxo, obedecendo ao protocolo ISHAGE (SUTHERLAND et al., 1996), no qual são utilizados marcadores antigênicos (anti-CD34+/CD45⁻) (Figura 6).

Após avaliação da viabilidade celular e quantificação das células CD34+, a suspensão de células foi transferida para seis seringas de 10 ml e novamente transportadas para o HUFM em condições assépticas e ideais para a conservação das CT. Na suspensão de 60 ml, está o total de células CD34+ que serão implantadas. Assim, em um total de 60 ml de suspensão, existem $0,80 \times 10^7$ (mediana com intervalo interquartil $0,65 \times 10^7$). Assim na Tabela 2 temos a quantidade de CD34+ implantada em cada paciente.

Vale ressaltar que, ao mesmo tempo em que as células foram transportadas para o local do procedimento (HUFM), a equipe responsável pelo implante preparou o paciente já com os acessos prontos para o implante anterógrado e retrógrado das CTAHSP (Figura 7).

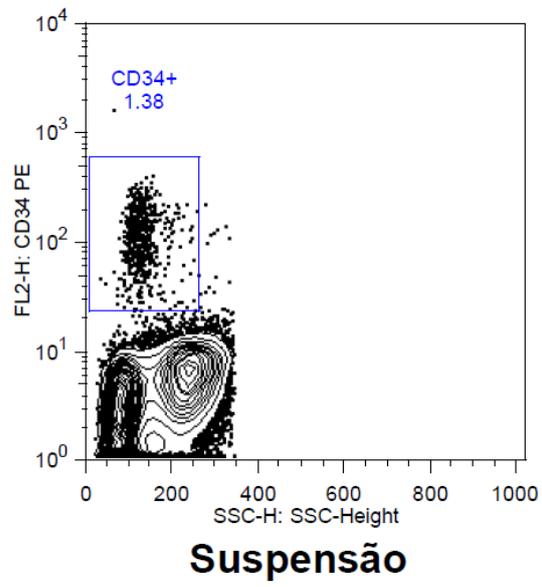


Figura 6 – Citometria: quantificação de células CD34+ presentes na suspensão
FONTE: Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, paciente do protocolo.

Pacientes	Suspensão CD34* x 10 ⁷	Implante anterógrado	Implante retrógrado
1	0,4 x 10 ⁷	20 ml	40 ml
2	0,3 x 10 ⁷	20 ml	40 ml
3	0,4 x 10 ⁷	20 ml	40 ml
4	0,9 x 10 ⁷	20 ml	40 ml
5	0,7 x 10 ⁷	20 ml	40 ml
6	0,8 x 10 ⁷	20 ml	40 ml
7	0,7 x 10 ⁷	20 ml	40 ml
8	0,2 x 10 ⁷	20 ml	40 ml
9	1,4 x 10 ⁷	20 ml	40 ml
10	0,9 x 10 ⁷	20 ml	40 ml
11	1,9 x 10 ⁷	20 ml	40 ml
12	3,3 x 10 ⁷	20 ml	40 ml
13	0,6 x 10 ⁷	20 ml	40 ml
14	0,8 x 10 ⁷	20 ml	40 ml
15	9,3 x 10 ⁷	20 ml	40 ml

Tabela 2 – Total de células CD34+ implantadas (60 ml) através de duas vias
 FONTE: Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas.



Figura 7 – Seis seringas contendo a suspensão de células-tronco e implante
 FONTE: Hospital Universitário Francisca Mendes, Manaus (AM)

3.8 Implante de células-tronco

3.8.1 Via anterógrada intracoronariana

As artérias escolhidas para injeção das células foram aquelas com fluxo no mínimo TIMI ≥ 2 (fluxo coronariano 0 - 3); nessa via anterógrada, foram injetados 20 ml do material através de um microcateter posicionado nas diferentes artérias ou ramos das mesmas, sendo distribuído da seguinte forma: 10 ml para a artéria descendente anterior, 5 ml para a artéria circunflexa e 5 ml para a coronária direita. Esse volume de células implantadas ocasionalmente pode variar dependendo da dominância das artérias ou do grau de lesão das mesmas. A velocidade de infusão da suspensão das células foi de 1 ml/min; paralelamente e após cateterização arterial, é cateterizado o sistema venoso cardíaco (seio coronariano), o qual é ocluído com um cateter balão de Swan-Ganz (oclusão do fluxo venoso cardíaco) durante o implante anterógrado, isso com o intuito de manter o maior número possível de células dentro do miocárdio.

3.8.2 Via retrógrada – sistema venoso cardíaco

O implante por via retrógrada foi realizado imediatamente após o implante anterógrado, utilizando o mesmo cateter balão de Swan-Ganz, o qual foi posicionado no terço médio da grande veia cardíaca; nesse ponto, foi insuflado o balão para ocluir o fluxo venoso. Através do lúmen do próprio cateter balão, foram injetados 40 ml da suspensão de CT no menor tempo possível, após implante retrógrado, e mantendo insuflado o balão por mais 10 minutos.

Dessa forma, foram utilizadas duas técnicas de implante de forma simultânea e infundidos um total de 60 ml da suspensão (20 ml via anterógrada; 40 ml via retrógrada). Esse procedimento foi realizado na sala de hemodinâmica do HUFM e sobre monitorização multiparamétrica contínua.

3.9 Terapia medicamentosa

Todos os pacientes receberam terapia medicamentosa otimizada de acordo com avaliação clínica individualizada.

3.10 Seguimento

Todos os pacientes selecionados para o estudo foram acompanhados periodicamente no ambulatório de cardiologia, seguindo o protocolo desenhado no projeto. Os dados obtidos durante o seguimento de quatro pacientes serão lançados como retorno às agências de fomento Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) e publicados na comunidade científica. Os dados após 12 meses (seguimento em andamento) também serão informados e publicados. Os pacientes, após completarem 1 ano de seguimento, permanecerão em acompanhamento ambulatorial no HUFM.

3.11 Análise estatística

Todos os dados foram analisados pela intenção de tratar. Foram apresentados por meio de tabelas e gráficos, sendo que na análise das variáveis quantitativas, quando os dados apresentavam distribuição normal, foi calculada a média, desvio padrão e aplicado o teste t de Student para dados emparelhados. Na rejeição da hipótese de normalidade, foi calculada a mediana e aplicado o teste não paramétrico de Wilcoxon ou de Friedman (Vieira, 2004; Arango, 2001).

O *software* utilizado na análise dos dados foi o Minitab versão 16, e o nível de significância fixado para aplicação dos testes foi de 5%.

Tratamento estatístico foi efetuado por Felicien Gonçalves Vásquez, que forneceu as seguintes referências:

ARANGO, Héctor Gustavo. *Bioestatística Teórica e Computacional*. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 2001.

VIEIRA, Sonia. *Bioestatística, Tópicos Avançados*. Rio de Janeiro, Editora Elsevier, 2004.

3.12 Desenho do estudo – fluxograma

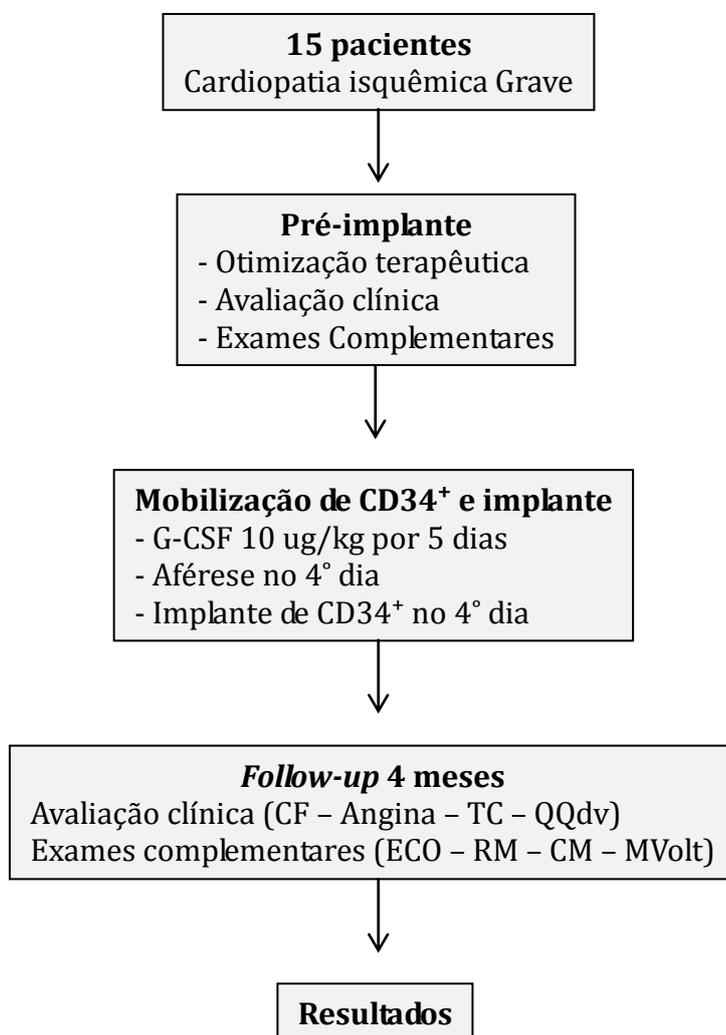


Figura 8 – Fluxograma do protocolo de estudo

G-CSF = fator de estimulação de colônias de granulócitos; CF = classe funcional; TC = teste da caminhada de 6 minutos; QQdv = questionário de qualidade de vida; ECO = ecocardiograma; RM = ressonância magnética; CM = cintilografia do miocárdio; MVolt = mapa de voltagem.

3.13 Exames complementares para análise dos objetivos

Após a inclusão dos pacientes no protocolo, ajustada e otimizada a terapia farmacológica em um período de 30 dias, foram realizados todos os exames complementares, sendo que o ecocardiograma (ECO), a RM, a CM e o mapeamento

eletroanatômico são os métodos de imagem utilizados para análise dos objetivos primários. Os equipamentos e a metodologia são descritos a seguir:

1) Ecocardiograma transtorácico em repouso

Foi realizado ECO transtorácico utilizando equipamento da GE Vivid 3 (EUA); foram utilizados os métodos bidimensional, modo-M, Doppler pulsátil, Doppler pulsado tecidual e Doppler colorido. Foram medidos os seguintes parâmetros: diâmetros diastólico e sistólico finais do VE (DDFVE e DSFVE), FE do VE pelo método de Simpson, índice de escore de contratilidade segmentar, velocidade do fluxo mitral, velocidade do movimento das paredes, volume atrial esquerdo e índice de *performance* miocárdica de VE.

2) Ressonância magnética cardíaca

Foi realizada utilizando um equipamento GE Excite 1.5T (General Electric, EUA), com bobina de oito canais para exames do coração; foram colocados eletrodos para monitorização cardíaca e sincronização dos batimentos cardíacos com as imagens adquiridas (*cardiac gating*).

O estudo da RM foi dividido em função ventricular e realce tardio.

Na análise da função ventricular, foram utilizadas imagens de cinerressonância com sequência do tipo *balanced steady state free precession* (B-SSFP, FIESTA). Foram realizados de oito a 12 cortes em eixo curto, um corte em eixo longo horizontal (quatro câmaras), um corte em eixo longo vertical (duas câmaras) e um corte em via de saída de VE (três câmaras). Todos os cortes foram feitos em apneia expiratória, e em todos os pacientes foi utilizada técnica de aquisição paralela (ASSET).

Para análise de realce tardio, foi infundido mais 0,1 mmol/kg de gadolínio e realizada a aquisição das imagens após 10 minutos da última infusão. A técnica utilizada foi de Gradiente Echo com pulso de inversão-recuperação para saturação do miocárdio normal. Os planos de corte foram os mesmos utilizados na análise da função ventricular. Os seguintes parâmetros foram utilizados: tipo de aquisição = bidimensional (2 D); tempo de repetição = 6,20 ms; tempo de ECO = 2,8 ms; *flip angle* = 20%; tempo de inversão = 140-280 ms; matriz de 256 x 256; espessura de corte = 8 mm; número de excitações = 2.

A análise das imagens foi feita em *software* ReportCard (GE, EUA). A análise da função ventricular foi feita de maneira quantitativa através do *software* descrito. A análise do realce tardio foi feita por avaliação qualitativa visual. A descrição dos achados foi realizada através da segmentação padrão (*bullseye*) em 17 segmentos.

3) Cintilografia de miocárdio com tálio-201 em repouso e *stress*

Para esse procedimento, foi utilizado um equipamento E-cam Siemens (Siemens, Alemanha), *one-head* com processamento syngo e.soft (Cedars). A cintilografia miocárdica foi dividida em etapa de repouso e esforço com protocolo duo-isótopo de 2 dias. Todos os pacientes da etapa de esforço foram submetidos ao *stress* farmacológico com Dipiridamol endovenoso e, em seguida, administrado o radiofármaco sestamibi-99mTc (20 mCi). Após o período de 45 minutos, foram adquiridas imagens tomográficas de 180° gatilhadas com o ECG. Em outro dia, os pacientes realizaram a etapa de repouso com administração de tálio-201 (5 mCi) endovenoso e as imagens tomográficas de 180° não gatilhadas com ECG, adquiridas imediatamente após 4 horas (redistribuição) e após 24 horas (com reinjeção de 2 mCi de tálio-201). Com o término da aquisição, as imagens foram processadas na *workstation* e.soft e analisadas cicatriz miocárdica e viabilidade.

4) Mapeamento eletroanatômico – mapa de voltagem do ventrículo esquerdo

O mapeamento eletroanatômico ventricular de cada paciente foi realizado com o sistema EnSite NavX (St. Jude Medical Inc., EUA) através da ferramenta de mapeamentos diagnósticos Diagnostic Landmark Map (DXL Map).

A técnica consiste no registro da atividade elétrica de diversas regiões da cavidade ventricular utilizando cateter diagnóstico e, após organizados temporalmente, apresentados segundo um modelo anatômico tridimensional (janela de mapa tridimensional) conforme a magnitude do sinal em escala de cores. A aquisição dos sinais elétricos intracavitários é feita sob ritmo cardíaco estável.

A reconstrução da geometria anatômica do paciente é feita através da movimentação de cateter terapêutico quadripolar com ponta de 4 mm, tendo os pontos captados por variação de impedância dentro do campo magnético gerado pelas placas do sistema EnSite NavX.

O mapa utilizado para a avaliação em questão foi pico-a-pico (*peak-to-peak* – P-P), que apresenta valores de voltagem codificados por cores para cada localização obtida (ou superfície do modelo geométrico mais próxima). O mapeamento de voltagem P-P (Figura 8) corresponde à diferença em milivolts (mV) entre os componentes de pico positivo e de pico negativo do complexo de ativação detectado na forma de onda de exploração. A gama de cores varia entre cinza (baixa voltagem) e roxo (alta voltagem) e foi configurada da seguinte forma:



Figura 9 – Mapa de análise de voltagem do miocárdio (pico-a-pico)

- Tipo de mapa (*display*): P-P
- Identificação de baixa voltagem (*low Volt - ID*): 0,5 mV
- Identificação de alta voltagem (*high Volt - ID*): 1,5 mV (Figura 9)
- Coleta de dados com cateter ativo (*active en-Guide*)
- Interpolação (*interpolation*): 8 mm
- Projeção interior (*interior projection*): 8 mm
- Projeção exterior (*exterior projection*): 8 mm

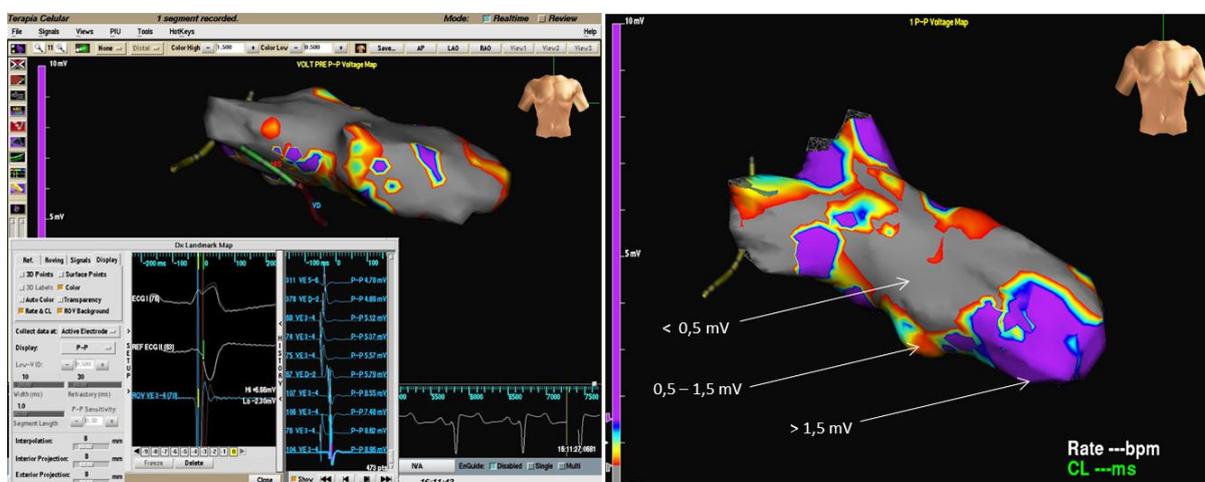


Figura 10 – Mapa de voltagem → área sem atividade elétrica (cicatriz) < 0,5 mV; área transicional = 0,5 a 1,5 mV; área de miocárdio normal > 1,5 mV

Para a avaliação dos objetivos secundários, foram utilizados a CF da NYHA, a classificação de angina da CCS, o protocolo de TC e o questionário de qualidade de vida de Minnesota (Minnesota Living with Heart Failure Questionnaire – MLHFQ), os quais descrevemos a seguir.

1) Classificação funcional da New York Heart Association (Quadro 1)

Um dos maiores valores da anamnese é a categorização em graus da IC através da utilização de um único sintoma: dispneia. Através dessa classificação, pode ser estratificado o grau de limitação imposta pela doença para atividades cotidianas do indivíduo, e embora existam limitações em dar um valor numérico a achados subjetivos, é útil na comparação de grupos de pacientes, além de permitir a avaliação do mesmo paciente em momentos diferentes. Além disso, a CF da NYHA provou ser um indicador forte e independente de sobrevida (BETTENCOURT *et al*, 2000). Tem uma boa correlação com o prognóstico e qualidade de vida e serve também para avaliar a resposta

terapêutica e o melhor momento de intervenção, porém não tem boa correlação com o ECO (GIVERTZ; COLUCCI; BRAUNWALD, 2009).

CF I	Paciente com insuficiência cardíaca, porém sem limitações na atividade física habitual
CF II	Paciente com insuficiência cardíaca, limitação discreta às atividades físicas habituais (dispneia), porém assintomático ao repouso
CF III	Paciente com insuficiência cardíaca, limitação acentuada às atividades físicas habituais (dispneia), porém assintomático ao repouso
CF IV	Paciente com insuficiência cardíaca, com dispneia ao repouso

Quadro 1 – Classificação funcional (New York Heart Association)
CF = classe funcional.

2) Classificação de angina da Canadian Cardiology Society (Quadro 2)

A angina de peito é definida como uma síndrome clínica caracterizada por um desconforto torácico ou em área adjacente, sendo tipicamente agravada ou desencadeada com atividade física ou estresse emocional e atenuada com repouso, uso de nitroglicerina ou derivados. Angina é tipicamente a sintomatologia relacionada a uma doença coronariana, a qual é provocada por um desequilíbrio entre a oferta e a demanda de oxigênio ao miocárdio, segundo as *Diretrizes de doença coronariana crônica – angina estável* (MANSUR, 2004).

Um sistema de graduação da *angina pectoris* proposta pela CCS obteve uma ampla aceitação. O sistema é uma modificação da CF da NYHA, mas permite que os pacientes sejam categorizados em termos mais específicos (CAMPEAU, 1976).

	ATIVIDADE QUE PROVOCA ANGINA	LIMITAÇÃO À ATIVIDADE FISICA HABITUAL
CLASSE I	Exercício prolongado, vigoroso, causa angina	Não
CLASSE II	Caminhar > 2 quarteirões ou > 1 lance de escadas	Leve
CLASSE III	Caminhar < 2 quarteirões ou < 1 lance de escadas	Moderada
CLASSE IV	Mínima ou em repouso	Severa

Quadro 2 – Classificação de *angina pectoris* (Canadian Cardiology Society)

3) Teste da caminhada de 6 minutos

Originalmente, o TC foi utilizado para avaliar o desempenho cardiorrespiratório em indivíduos com pneumopatias crônicas; estudos posteriores avaliaram a utilidade do teste em indivíduos com cardiopatias crônicas, especialmente pacientes com IC. O TC pode ser utilizado com diferentes objetivos, entre os quais: avaliar as intervenções terapêuticas antes e após, a capacidade funcional e como preditor de morbidade e mortalidade (DE OLIVEIRA, GUIMARÃES, BARRETTO, 1996; RODRIGUES, 2006).

Nosso intuito foi utilizá-lo para avaliar o efeito terapêutico (antes e após implante de CT). Para a realização do protocolo, o paciente tinha que estar sem alimentar-se há mais de 2 horas e com roupa confortável. Utilizamos um corredor plano de 50 metros. Foram avaliadas, antes e após a caminhada, pressão arterial e frequência cardíaca e respiratória; durante a caminhada, foi utilizada a escala de percepção de esforço de Borg, e entre os sintomas, foi avaliada a presença ou não de angina.

4) Questionário de qualidade de vida

O MLHFQ é uma importante ferramenta de avaliação da qualidade de vida em pacientes com IC. Trata-se de um questionário formado por 21 perguntas, cujo objetivo é avaliar até que ponto a IC afeta os aspectos físico, psíquico e socioeconômico dos pacientes. Isso nos permite ter uma percepção individualizada acerca de uma série de situações limitantes que se associam a essa síndrome. As perguntas se referem a uma série de sinais e sintomas de IC, relações sociais, atividade física e sexual, trabalho e economia. A escala de pontuação varia de zero (0 = não) até cinco (5 = demais); dessa forma, quanto maior a pontuação, pior a qualidade de vida (PARAJÓN *et al*, 2004).

O MLHFQ foi traduzido e validado ao português por Carvalho *et al* (2009).

No Apêndice B, se encontra o questionário de qualidade de vida (QQdv) aplicado aos nossos pacientes antes e após terapia.

4. RESULTADOS

Desde novembro de 2009 até novembro de 2011, foram incluídos no protocolo de terapia celular 15 pacientes com cardiopatia isquêmica grave seguindo o protocolo de inclusão/exclusão (Tabela 3).

Na análise do seguimento de 4 meses, todos os pacientes mantiveram a terapia farmacológica otimizada. O uso de betabloqueador, inibidores da enzima conversora da angiotensina (IECA), antagonistas dos receptores de angiotensina II (ARA2), espironolactona, antiagregantes plaquetários e hipolipemiantes foi mantido por todos os pacientes do estudo (Tabela 4). No final do seguimento de 4 meses, tivemos dois óbitos: um paciente teve uma morte súbita abortada durante internação, foi realizado implante de um cardiodesfibrilador (CDI), porém foi a óbito por falha de bomba e falência de múltiplos órgãos; o segundo paciente foi a óbito por causa não cardíaca.

Variáveis (n = 15)	f _i	%
Gênero		
Masculino	12	80,0
Feminino	3	20,0
Idade (anos)		
40 --- 50	3	20,0
50 --- 60	7	46,7
60 --- 70	4	26,7
> 70	1	6,7
Média ± DP	56,3±8,5	
Amplitude	41-73	
Risco cardiovascular		
Hipertensão arterial sistêmica	12	80,0
Antecedentes na família	9	60,0
Tabagismo	8	53,3
Dislipidemia	7	46,7
Diabetes melito	2	12,2
Histórico médico		
Infarto do miocárdio	14	93,3
Revascularização do miocárdio	6	40,0
Angioplastia percutânea	6	40,0
Índice de massa corporal		
Normal	3	20,0
Sobrepeso	9	60,0
Obeso	3	20,0
QRS		
Média ± DP	92,7±13,9	
Amplitude	80-120	

Tabela 3 – Distribuição segundo a frequência de gênero, idade, risco cardiovascular, histórico médico, índice de massa corporal e eletrocardiograma de pacientes submetidos a implante de células-tronco acompanhados no Hospital Universitário Francisca Mendes, Manaus (AM).
f_i = frequência absoluta simples; DP = desvio padrão.

Medicação (n = 15)	f _i	%
AAS	15	100,0
Betabloqueador	15	100,0
Hipolipemiante	15	100,0
Espironolactona	14	93,3
IECA	10	66,7
Nitrato	10	66,7
Clopidogrel	8	53,3
ARA 2	5	33,3
Digoxina	4	26,7
HTC	4	26,7
Furosemida	2	13,3
Hipoglicemiante	2	13,3

Tabela 4 - Distribuição segundo a frequência da terapia farmacológica aplicada aos pacientes submetidos a implante de células-tronco acompanhados no Hospital Universitário Francisca Mendes, Manaus (AM)

f_i = frequência absoluta simples; AAS = Ácido acetilsalisílico; ARA2 = Antagonistas dos receptores de angiotensina 2; IECA = Inibidores da enzima conversora de angiotensina; HCT = Hidroclorotiazida.

4.1 Eficácia do fator de estimulação de colônias de granulócitos

Um total de 15 pacientes receberam G-CSF em uma dose de 10 µg/kg de peso, via subcutânea, por um período de 5 dias consecutivos; durante esse período, não foram observados efeitos colaterais relacionados ao uso dessa medicação em nenhum dos 15 pacientes.

Foram realizados exames laboratoriais diários, sendo acompanhadas as mudanças no leucograma dos pacientes antes, durante e após o uso do G-CSF. Os exames laboratoriais evidenciaram um aumento significativo da série branca total (leucograma) durante todo o tratamento, sendo que o pico de leucócitos totais na análise da mediana do quarto dia foi de 30.160 mm³. Esse dado reflete o efeito da terceira dose do G-CSF (exame laboratorial colhido no quarto dia). Quando comparado ao pré-tratamento (5.830 mm³) e 24 horas pós-implante (25.400 mm³) (efeito da quarta dose de G-CSF, exame

laboratorial colhido no quinto dia), observou-se uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) (Figura 11).

Após a quarta dose de G-CSF, foi realizada a aférese, preparo das células mononucleares totais, análise de viabilidade, quantificação de CD34⁺/CD45⁻ e implante (quarto dia). O controle laboratorial do 15º dia demonstrou uma normalização da série branca com uma análise da mediana de 6.400 mm³.

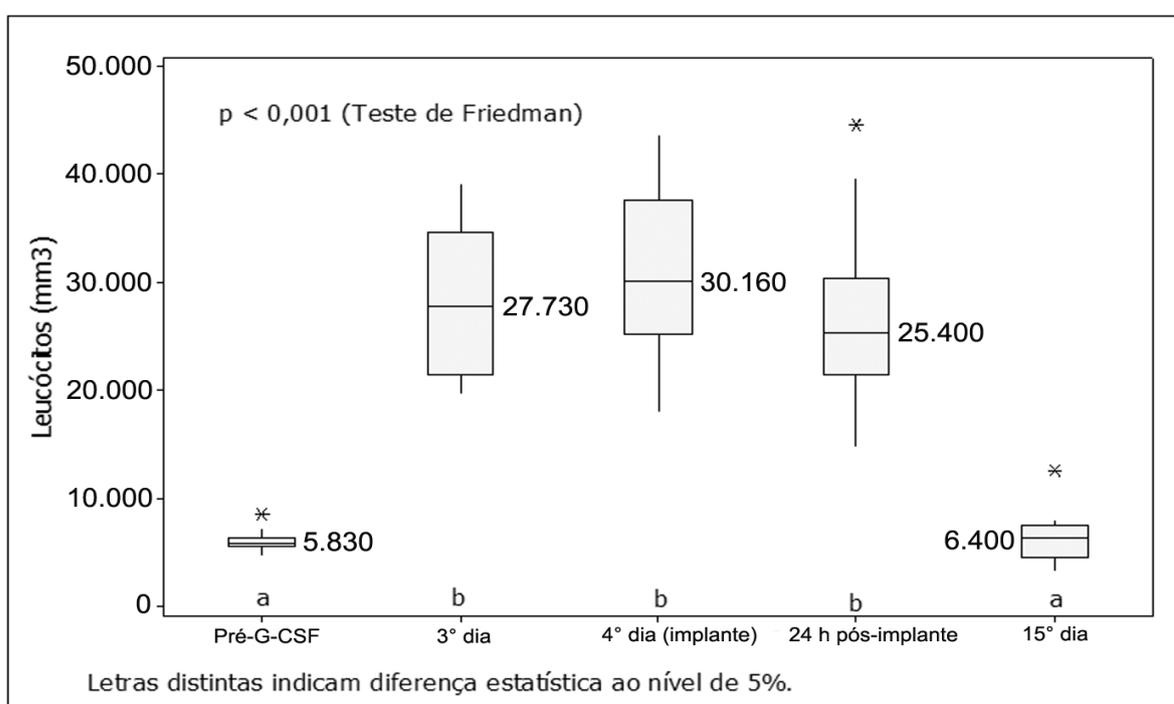


Figura 11 – Distribuição segundo a mediana dos valores dos leucócitos (mm³), num período de 15 dias, nos pacientes acompanhados no Hospital Universitário Francisca Mendes, Manaus (AM)

4.2 Aférese e citometria de fluxo

Considerando que o pico de CT no sangue total ocorreu no quarto dia (efeito da terceira dose do G-CSF), a leucoaférese foi realizada nesse dia em todos os 15 pacientes, seguindo o protocolo já descrito. O tempo de duração desse procedimento foi, em média,

de 170 minutos e transcorreu sem repercussões hemodinâmicas e/ou complicações para os pacientes.

O seguimento quantitativo da mobilização das CTH para o SP foi acompanhado pela citometria de fluxo (Figura 12), segundo o protocolo ISHAGE, como descrito anteriormente na metodologia. No quarto dia, a quantidade de CD34+ do total de células mononucleadas era consideravelmente maior em relação ao início do tratamento, com significância estatística ($p < 0,001$), como mostrado na Figura 13.

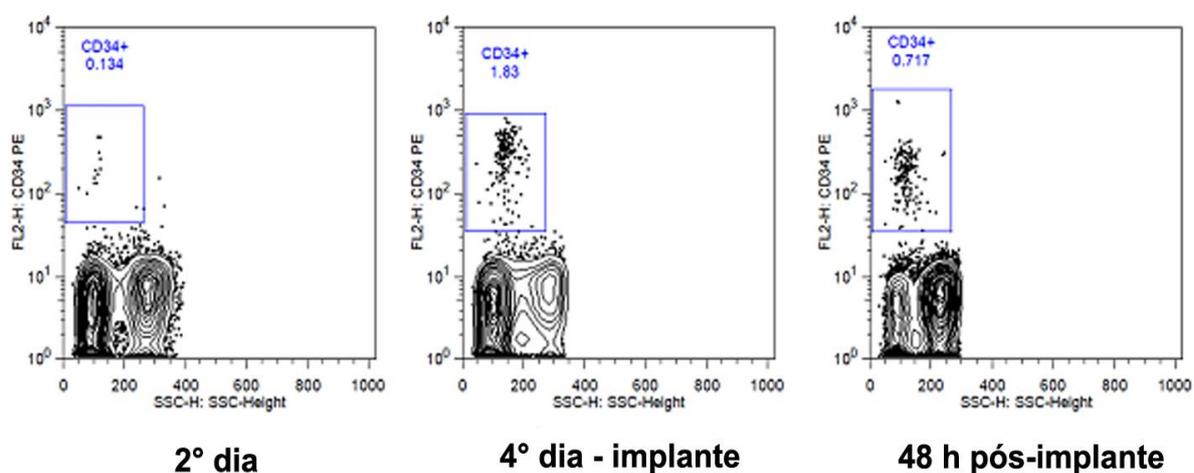


Figura 12 – Pico de CD34+ no quarto dia (efeito da terceira dose de G-CSF), análise da citometria
FONTE: Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas.

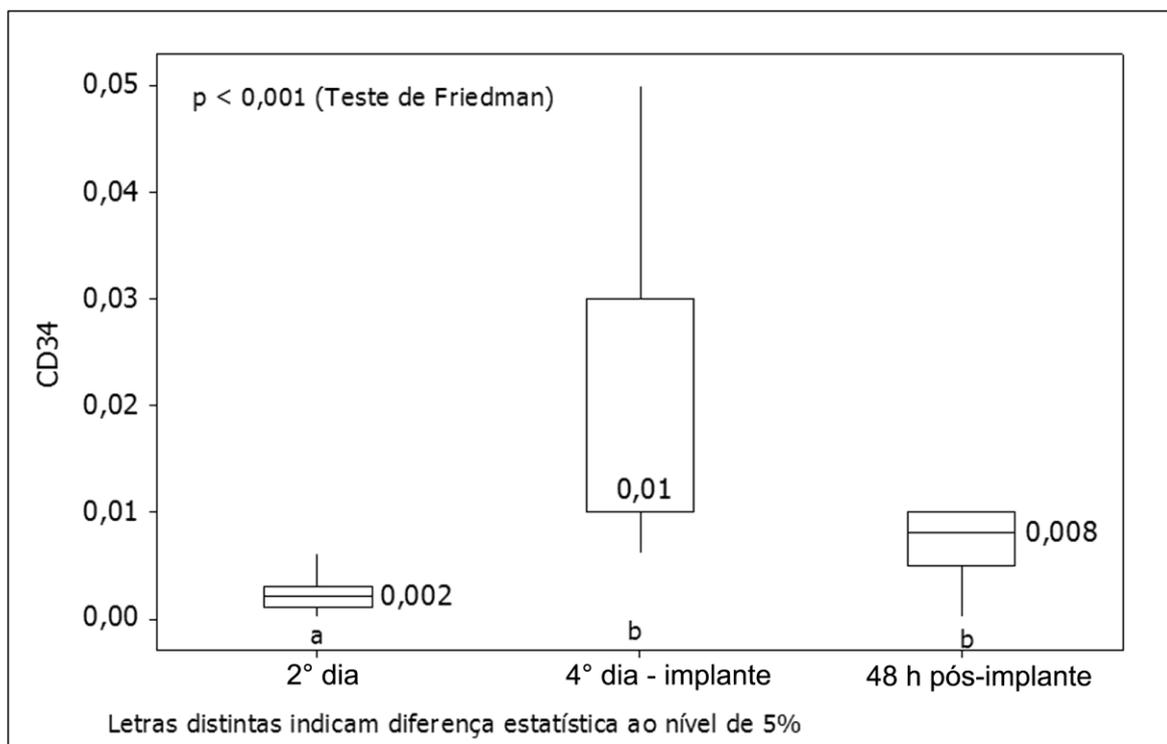


Figura 13 – Distribuição segundo a mediana dos valores do CD34+ x 10³ em três medições dos pacientes acompanhados no Hospital Universitário Francisca Mendes, Manaus (AM)

4.3 Implante de células-tronco autólogas hematopoéticas de sangue periférico

Para o implante anterógrado e retrógrado das CT, realizou-se cateterização das artérias coronárias e sistema venoso coronariano, como descrito anteriormente na metodologia. Um total de 60 ml da suspensão de CT CD34+ foi infundido através de ambas as vias (anterógrada – 20 ml; retrógrada – 40 ml). As intercorrências relacionadas a esse procedimento estão descritas a seguir (Tabela 5).

Intercorrências	Pacientes
FV durante cateterização da CD	1 paciente
Espasmo da coronária durante implante anterógrado	2 pacientes
Angina + infra de ST durante implante anterógrado	1 paciente
Infra de ST durante implante anterógrado	1 paciente

Tabela 5 – Intercorrências durante implante das células-tronco autólogas hematopoéticas de sangue periférico

FV = fibrilação ventricular; CD = coronária direita; ST = segmento ST.

Cabe ressaltar que durante o implante anterógrado foi ocluído simultaneamente o sistema venoso cardíaco (seio coronariano), o qual provocaria um alentecimento do fluxo arterial coronariano.

Não foram observadas complicações relacionadas ao pós-implante imediato; todos os pacientes permaneceram internados por mais 48 horas, sendo posteriormente liberados. O tempo total de internação de cada paciente foi, em média, de 8 dias (tratamento com G-CSF, leucoaférese, implante das CT e observação).

Após implante e alta hospitalar, todos os pacientes foram acompanhados mensalmente, segundo a necessidade individual de cada paciente.

4.4 Seguimento de 4 meses

Durante o seguimento dos 15 pacientes, foram analisadas algumas variáveis (pré-implante e pós-implante de CT), como a CF da NYHA (Quadro 1). Antes do implante, dois pacientes estavam em CF I; nove pacientes, em CF II; e quatro, em CF III.

No seguimento de 4 meses (Figura 14), pode ser observado uma melhora da CF, sendo que quatro pacientes se encontram em CF I, e 11 pacientes, em CF II, mostrando uma melhora da CF no seguimento de 4 meses, com significância estatística ($p = 0,014$).

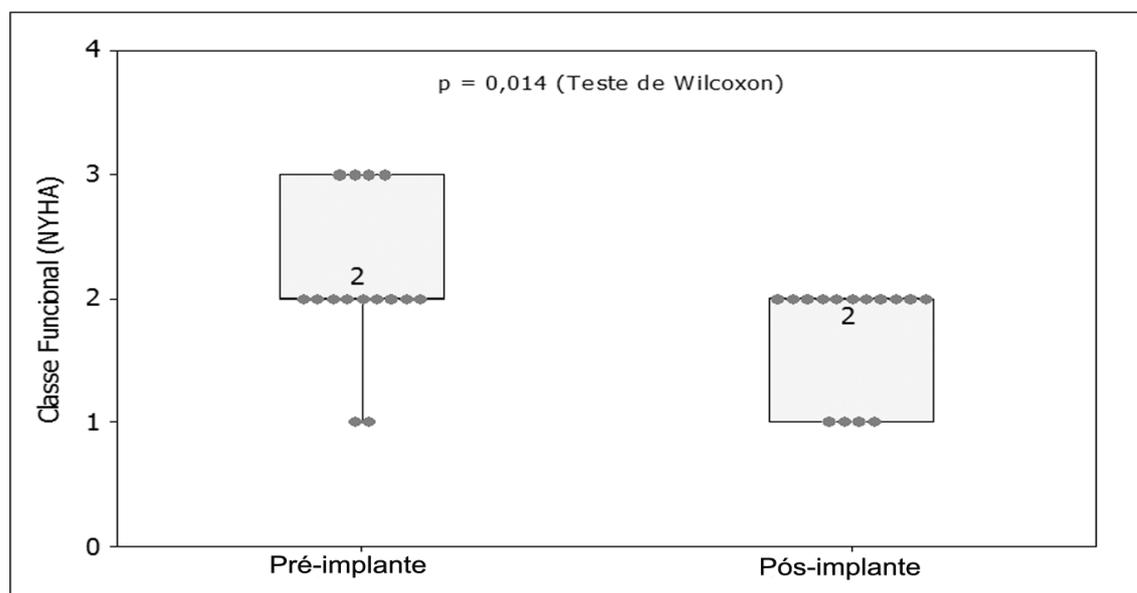


Figura 14 – Distribuição segundo a mediana do escore da classe funcional antes e 4 meses após implante de células-tronco nos pacientes acompanhados no Hospital Universitário Francisca Mendes, Manaus (AM)
NYHA = New York Heart Association.

Outra variável analisada foi a angina. Para essa análise, foi utilizada a classificação da CCS (Quadro 2).

Dos 15 pacientes selecionados para o implante de CT, cinco não referiam angina, e 10 tinham angina refratária à terapia farmacológica. Desse grupo de pacientes, um tinha angina classe 1; oito, angina classe 2; e um, angina classe 3. No seguimento de 4 meses, três pacientes estavam sem queixas de angina; cinco passaram a ter uma angina classe 1; e dois, angina classe 2. Os cinco pacientes que não apresentavam angina permaneceram sem esse sintoma no seguimento de 4 meses.

Na análise da mediana dos escores de classificação de angina, observou-se melhora com significância estatística ($p = 0,006$) (Figura 15).

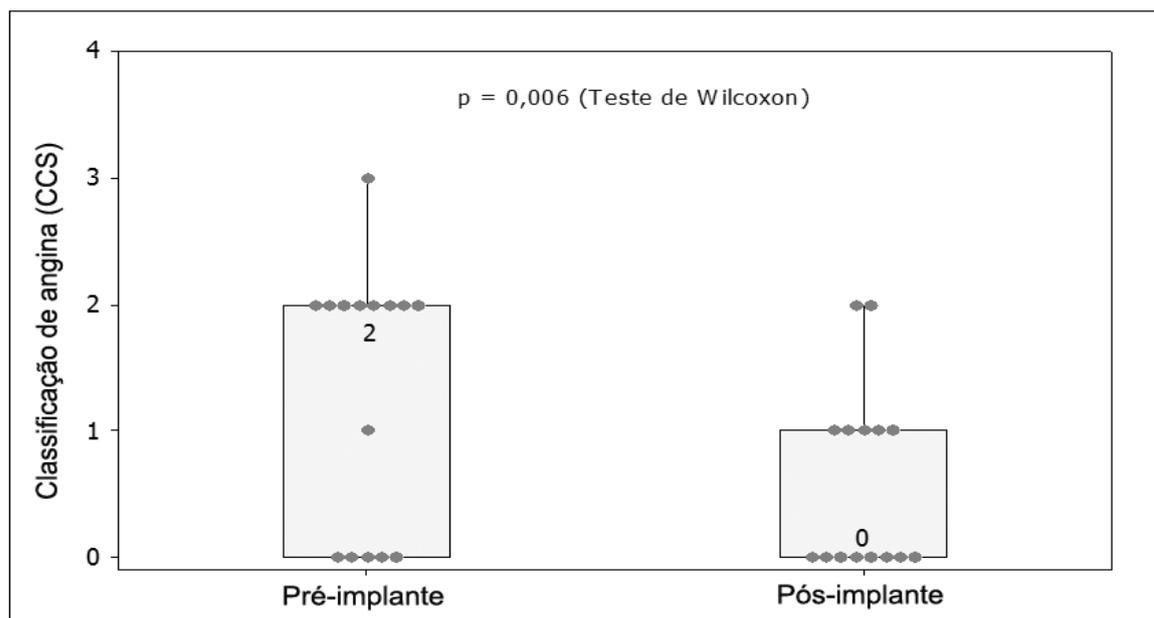


Figura 15 – Distribuição segundo a mediana do escore da classe de angina antes e 4 meses após implante de células-tronco nos pacientes acompanhados no Hospital Universitário Francisca Mendes, Manaus (AM)
CCS = Canadian Cardiovascular Society.

O TC foi realizado pelos 15 pacientes (pré-implante e controle 4 meses após implante de CD34⁺). Na análise da distância percorrida durante 6 minutos, foi observada uma melhora. A média da distância percorrida pré-implante foi de 398,67 metros (intervalo de confiança de 95% – IC95%), enquanto que a média pós-implante foi de 481,67 metros (IC95%), apresentando significância estatística ($p = 0,005$) (Figura 16).

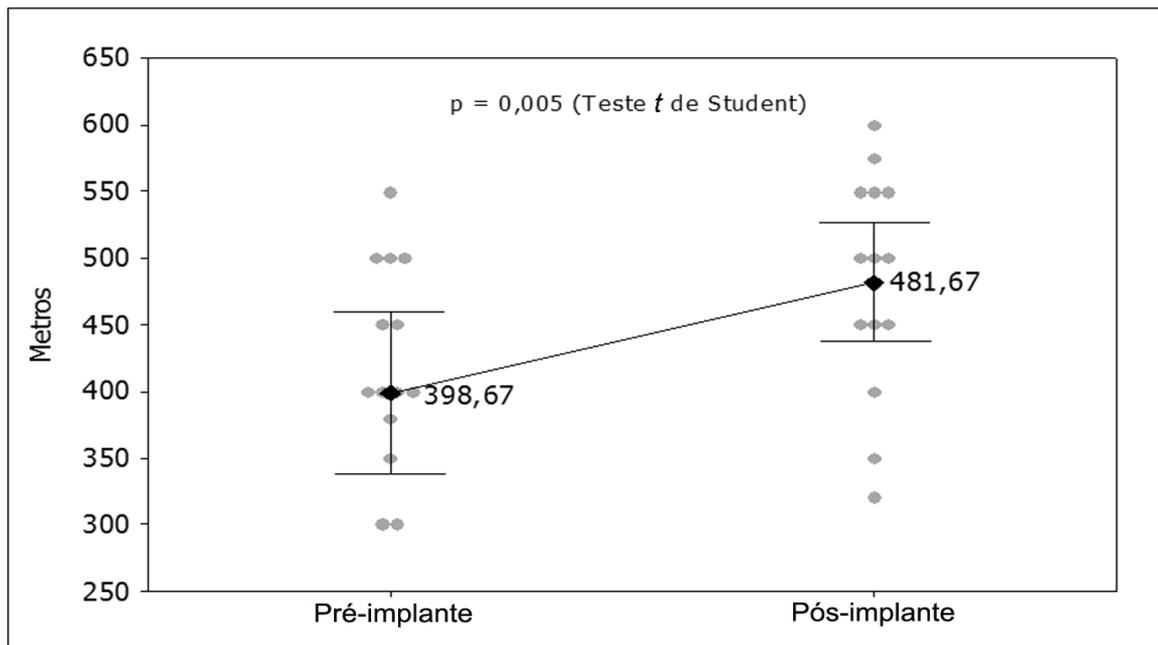


Figura 16 – Distribuição segundo a média e intervalo de confiança de 95% do teste da caminhada de 6 minutos antes e após implante de células-tronco nos pacientes acompanhados no Hospital Universitário Francisca Mendes, Manaus (AM)

Para avaliação da qualidade de vida, foi utilizado o MLHFQ (tradução em português). O preenchimento do QQdv (Apêndice 2) nos permitiu avaliar de que forma a IC afeta o aspecto físico, psíquico e socioeconômico do paciente. Para isso, são realizadas 21 perguntas, com uma pontuação que vai de 0 (não) e 1 (muito pouco) a 5 (demais). Quanto maior a pontuação, pior a qualidade de vida. Na análise da mediana, foi observada uma diminuição da pontuação de 36 para 25 pontos, o qual representa uma melhora de qualidade de vida dos pacientes, com significância estatística ($p = 0,003$) (Figura 17).

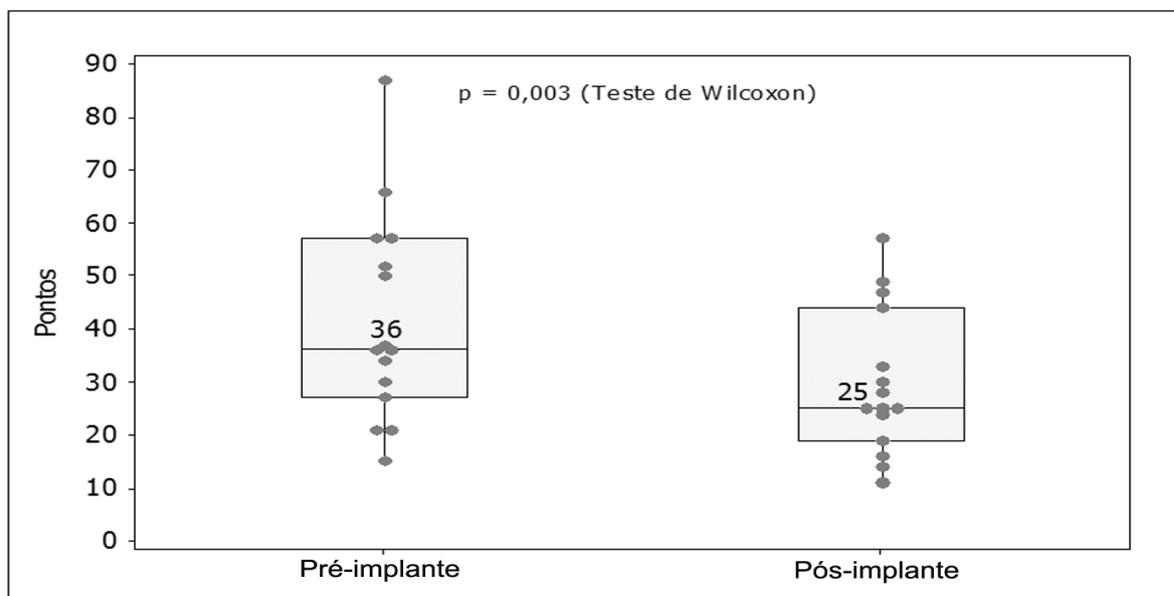


Figura 17 – Distribuição segundo a mediana dos pontos do teste para medir a qualidade de vida antes e 4 meses após implante de células-tronco nos pacientes acompanhados no Hospital Universitário Francisca Mendes, Manaus (AM)

Na análise da função ventricular (FE) e DDFVE, foram utilizados, como métodos de imagem, ECO e RM. Essa avaliação funcional do VE foi realizada apenas em 13 pacientes (os pacientes que foram a óbito não concluíram esses exames). A FE (%) e o DDFVE (mm), avaliados através de ECO e analisados pelo teste *t* Student, mostraram uma melhora da FE (pré = 31,84%; pós = 34,69%) e uma diminuição do DDFVE (pré = 64,15 mm; pós = 62,46 mm), porém sem significância estatística em ambos os parâmetros analisados ($p = 0,062$ e $p = 0,272$, respectivamente) (Figura 18).

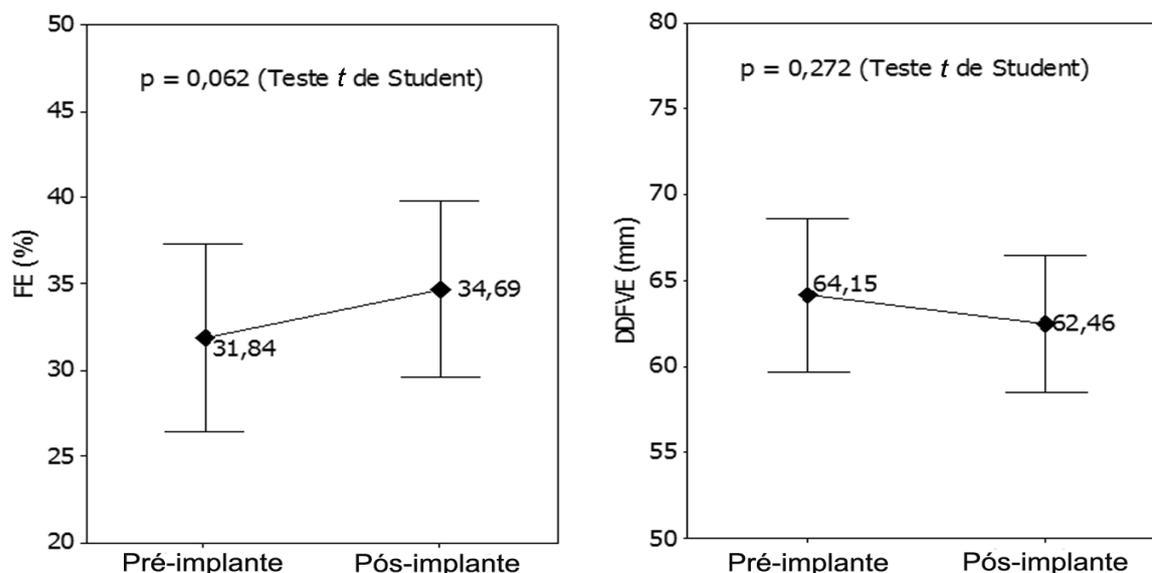


Figura 18 – Distribuição segundo a média e intervalo de confiança de 95% do resultado do ecocardiograma antes e 4 meses após implante de células-tronco nos pacientes acompanhados no Hospital Universitário Francisca Mendes, Manaus (AM)

FE = fração de ejeção do ventrículo esquerdo.

DDFVE = diâmetro diastólico final de ventrículo esquerdo.

Na avaliação dos mesmos parâmetros (FE/DDFVE) realizada através da RM e utilizando a mesma metodologia estatística (teste *t* de Student), foi observada uma discreta melhora na FE (pré = 31,10%; pós = 33,92%), porém sem significância estatística ($p = 0,397$). O DDFVE teve uma discreta diminuição (pré = 62,08 mm; pós = 62,85 mm), porém sem significância estatística ($p = 0,550$) (Figura 19).

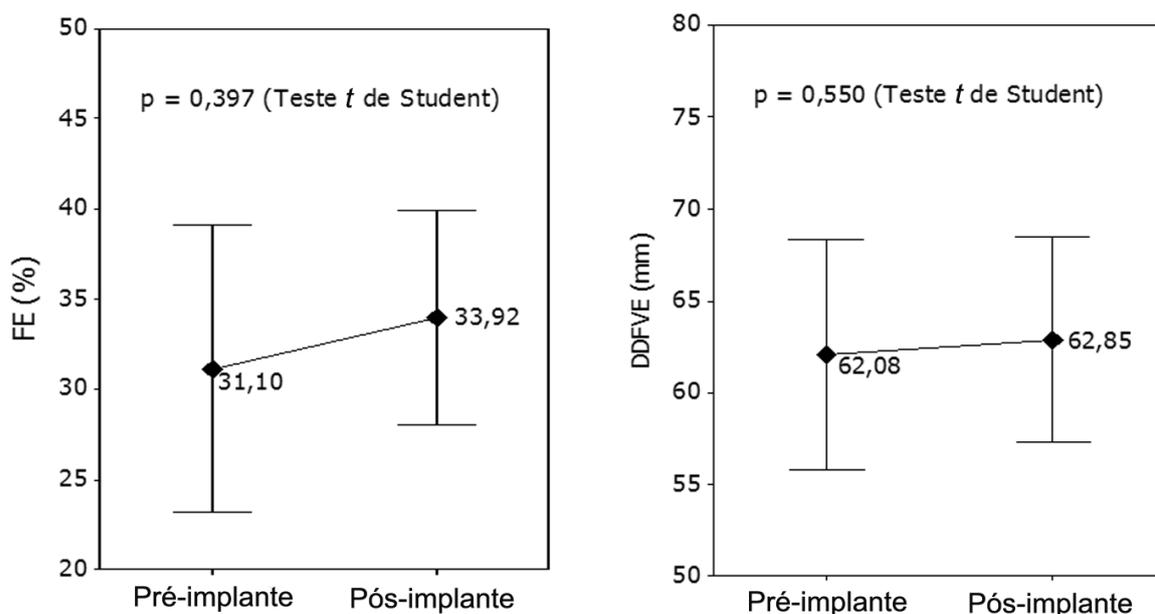


Figura 19 – Distribuição segundo a média e intervalo de confiança de 95% do resultado da ressonância magnética antes e 4 meses após implante de células-tronco nos pacientes acompanhados no Hospital Universitário Francisca Mendes, Manaus (AM)

FE = fração de ejeção do ventrículo esquerdo.

DDFVE = diâmetro diastólico final de ventrículo esquerdo.

Para a avaliação da perfusão do miocárdio, foi utilizada a CM, realizada em 14 pacientes (um dos pacientes que foi a óbito não completou). Através desse exame, foram analisadas cicatriz e viabilidade do VE. Na análise da cicatriz, não foram observadas alterações significativas (pré = 31,92; pós = 32,31) ($p = 0,899$). Na análise de viabilidade, mostrou-se que oito pacientes apresentavam viabilidade pré-implante e 12 tinham VM pós-implante, porém os resultados foram sem significância estatística ($p = 0,390$) (Figura 20). A Figura 21 mostra uma melhora na perfusão de miocárdio após 4 meses de implante em um dos pacientes do protocolo.

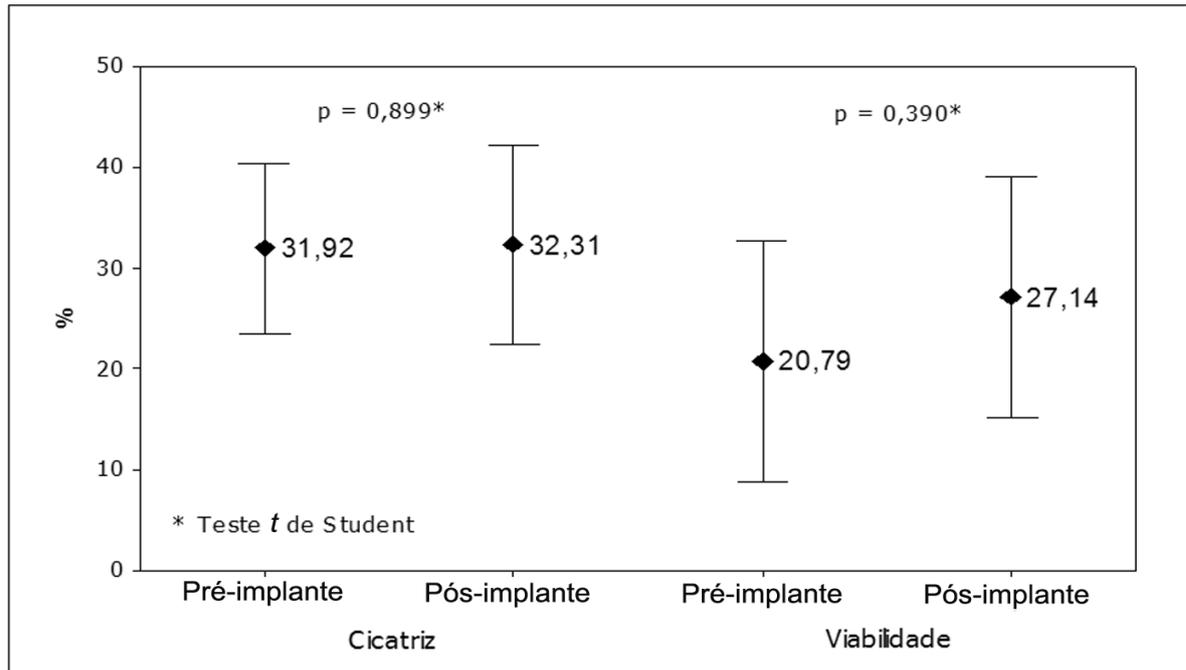


Figura 20 – Distribuição segundo a média e intervalo de confiança de 95% do resultado da cintilografia do miocárdio antes e 4 meses após implante de células-tronco nos pacientes acompanhados no Hospital Universitário Francisca Mendes, Manaus (AM)

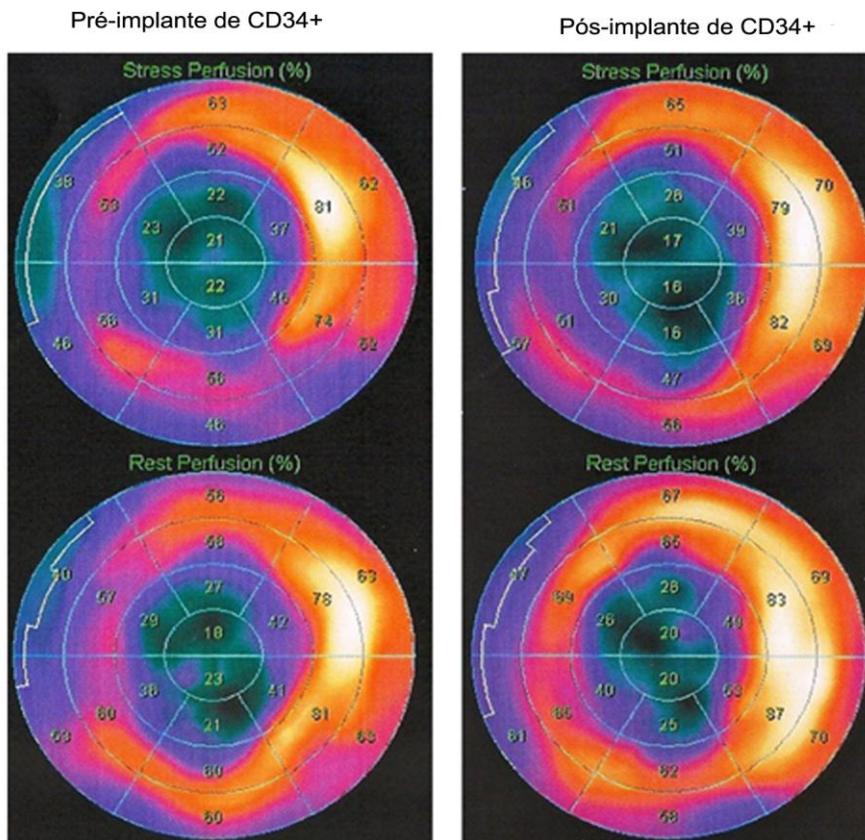


Figura 21 – Cintilografia de miocárdio, imagens de bullseye mostrando uma melhora da perfusão do miocárdio (redução da cicatriz, aumento da viabilidade)

FONTE: Hospital Universitário Francisca Mendes, paciente do protocolo.

A atividade elétrica cardíaca foi outro parâmetro analisado através do mapeamento eletroanatômico e mapa de voltagem (MVolt) do VE. Foram analisados o número de pontos que foram coletados para análise da voltagem do VE e as áreas de baixa voltagem ($< 0,5$ mV - cicatriz) (Figura 10) medidas em cm^2 . O número de pontos válidos coletados representa a quantidade de vezes que o eletrodo esteve em contato com o músculo cardíaco para captar uma atividade elétrica e, dessa forma, montar o MVolt do VE (Figura 22), sendo 407,4 pontos no pré-implante e 451,8 no pós-implante (Figura 22). Esse aumento não foi representativo estatisticamente ($p = 0,219$). Na análise da voltagem, foram medidas unicamente as áreas de baixa voltagem ($< 0,5$ mV; cor cinza da Figura 8), as quais representam a cicatriz. Área de baixa voltagem pré-implante foi de $34,52 \text{ cm}^2$, com aumento no pós-implante para $36,97 \text{ cm}^2$, porém sem significância estatística ($p = 0,767$) (Figura 23).

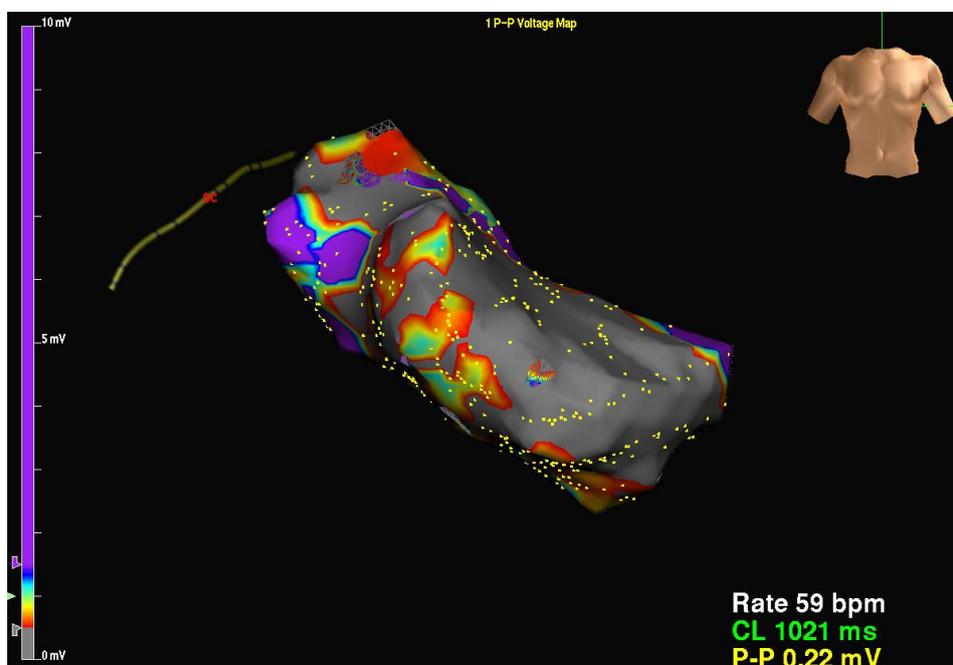


Figura 22 – Mapa de voltagem do ventrículo esquerdo, paciente do protocolo. Pontilhado amarelo: pontos coletados validados; cor cinza: voltagem $< 0,5$ mV (área inativa anteroapical e septal)
FONTE: Paciente do protocolo de pesquisa; controle de 4 meses.

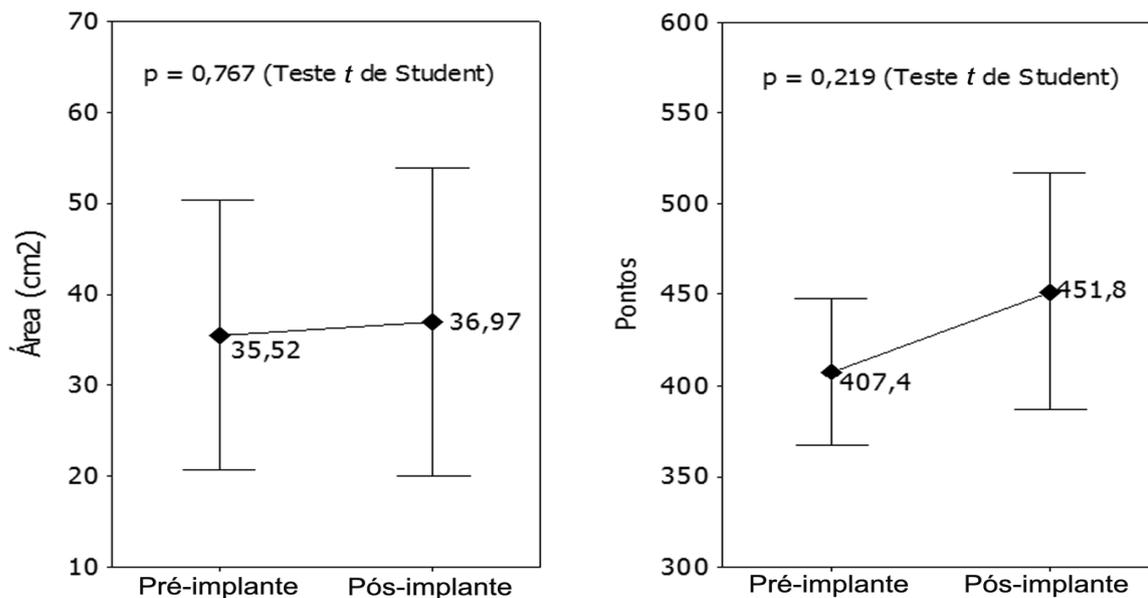


Figura 23 – Distribuição segundo a média e intervalo de confiança de 95% do resultado do mapa de voltagem do miocárdio antes e após implante de células-tronco nos pacientes acompanhados no Hospital Universitário Francisca Mendes, Manaus (AM)

Todos os exames complementares não invasivos foram realizados sem intercorrências e/ou complicações; já o Mvolt, procedimento invasivo, de um total de 30 mapeamentos, tivemos três complicações: uma FV durante manipulação do cateter no VE (revertido através de desfibrilação) e dois eventos embólicos arteriais no membro relacionado à punção da artéria femoral e acesso do cateter, ambos revertidos através de trombectomia, utilizando cateter de Fogarty com posterior anticoagulação oral (cumarínico) durante 3 meses.

4.5 Eventos adversos cardiovasculares

Dos 15 pacientes incluídos no estudo, dois foram a óbito durante o seguimento de 4 meses. Um paciente teve uma morte súbita abortada (durante internação), com posterior óbito por IC e falência de múltiplos órgãos; outro paciente foi a óbito por causa não cardíaca. Um paciente, após 1 semana do implante das CT, evoluiu com angina

progressiva, sendo internado para estabilização do quadro; dois pacientes que realizaram MVolt tiveram trombose arterial aguda (membro inferior direito).

EACV	Nº pacientes
Morte	2
Angina instável	1
Trombose arterial	2
Internação hospitalar	3

Tabela 6 – Eventos adversos cardiovasculares
EACV = eventos adversos cardiovasculares.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo foi realizado para avaliar a segurança e o impacto do implante das CTAHSP sobre a função, perfusão e atividade elétrica cardíaca e a repercussão destes sobre a sintomatologia e a qualidade de vida dos pacientes. Quanto às peculiaridades metodológicas deste estudo, podemos dizer que: 1) é um estudo prospectivo descritivo não randomizado, fase I de intervenção; 2) foram incluídos exclusivamente pacientes com cardiopatia isquêmica crônica grave; 3) buscou-se uma uniformização da amostra no que diz respeito às diversas características demográficas (Tabela 3) dos pacientes; 4) os pacientes são inelegíveis para outras alternativas terapêuticas (cirurgia de revascularização ou angioplastia) e estão com a terapia farmacológica otimizada (Tabela 4); 5) foi utilizado G-CSF para a mobilização das CTMO CD34+; 6) a grande peculiaridade deste estudo, distinguindo-o dos já publicados, é que neste está sendo analisada a atividade elétrica cardíaca através do mapeamento eletroanatômico e são utilizadas duas vias de implante de forma simultânea.

5.1 Segurança e eficácia da terapia

A segurança e eficácia da terapia com G-CSF utilizado para o reparo do infarto induzido foi realizada em uma larga escala de estudos em modelos animais. As pesquisas utilizando modelos animais têm demonstrado os efeitos benéficos do G-CSF na mobilização de CT após infarto de miocárdio, contribuindo para a regeneração do miocárdio por indução da miogênese e angiogênese, além de evitar o remodelamento ventricular (ORLIC *et al*, abr. 2001).

A segurança e eficácia do uso de G-CSF em pacientes com cardiopatia isquêmica ainda são controversas.

O MAGIC Cell, um estudo randomizado, com 20 pacientes pós-infarto do miocárdio e implante de stent, associado à mobilização de CT com G-CSF, mostrou uma alta taxa de reestenose intrastent, motivo pelo qual o estudo foi suspenso precocemente, sendo atribuída essa complicação ao uso de G-CSF. Mesmo assim, os autores puderam concluir que o implante de CT de SP era aparentemente seguro e potencialmente eficaz (KANG *et al*, 2004). Já o estudo FIRSTLINE-AMI, randomizado com 50 pacientes, não mostrou diferença entre os pacientes que receberam G-CSF e o grupo controle em relação às taxas de reestenose intrastent (INCE *et al*, 2005). Em um estudo observacional de 13 pacientes, no qual foi usado G-CSF no quinto dia após infarto agudo de miocárdio (IAM), houve um paciente que apresentou ruptura esplênica espontânea (SUÁREZ DE LESO *et al*, 2005). Hill J.M. *et al*. (2005) reportaram sérios eventos adversos em dois pacientes quando usado G-CSF em pacientes com doença coronariana crônica inelegíveis para revascularização miocárdica, sendo estes: um paciente teve IAM sem supra de ST 8 horas após a quinta dose de G-CSF; o outro paciente teve infarto e óbito 17 dias após o tratamento. No estudo STEMMI, prospectivo, randomizado, duplo-cego, placebo controlado, que incluiu 78 pacientes pós-IAM com supra de ST e angioplastia transluminal coronariana (ATC) primária (com implante de stent), o uso subcutâneo de G-CSF provocou dores osteomusculares em oito dos 39 pacientes que receberam o medicamento (RIPA *et al*, 2006).

No que diz respeito à eficácia e segurança na mobilização, coleta e implante das CT CD34+, no presente estudo, podemos dizer que: 1) G-CSF na dose de 10 µg/kg durante 5 dias originou um aumento significativo da série branca (Figura 12); 2) provocou uma mobilização efetiva de CT, com aumento significativo de CD34+ no quarto dia (dia

do implante – efeito da terceira dose) (Figura 13); 3) um dado relevante nesse segmento do estudo é que em todos os pacientes o pico de CD34+ foi no quarto dia; a análise de viabilidade e quantificação celular para o implante foi adequada; 4) não foram observados nem atribuídos efeitos colaterais ao uso de G-CSF; 5) a aférese foi realizada sem intercorrências mesmo em se tratando de pacientes com FE baixa (média de 31,84%); 6) durante o implante das CT, intercorrências como angina e alteração do segmento ST estão provavelmente relacionadas à oclusão do fluxo sanguíneo retrógrado (oclusão do seio coronariano com cateter balão de Swan-Ganz); após desinsuflar o balão, melhorou a sintomatologia e normalizou o segmento ST.

A FV e o espasmo da artéria coronária são intercorrências já descritas na literatura e estão relacionados à cateterização da artéria coronária, à introdução de guia intracoronariano ou ao próprio contraste. Todas as intercorrências inerentes ao implante foram transitórias e reversíveis intraprocedimento e sem complicações adicionais.

Os efeitos da terapia celular (CD34+), mobilizada previamente com G-CSF em pacientes com cardiopatia isquêmica, não são bem conhecidos. Tentando responder a esta questão, vários estudos com diferentes protocolos foram realizados.

O estudo MAGIC cell, em 6 meses de seguimento dos pacientes, reportou que houve uma melhora na capacidade do exercício, função sistólica e perfusão miocárdica, porém sem significância estatística (KANG *et al*, 2004). O estudo STEM-AMI, randomizado, placebo controlado, com 49 pacientes, reportou que o uso precoce no IAM do G-CSF (< 12h) atenua o remodelamento ventricular e reduz a área de infarto sem alterar a função sistólica e/ou a perfusão do miocárdio (ACHILLI *et al*, 2010).

No FIRSTLINE-AMI, um estudo randomizado, aberto, com 50 pacientes com IAM e supra de ST, submetidos à ATC primária, 25 pacientes receberam G-CSF durante 6 dias; o seguimento de 4 meses e 1 ano após ATC mostrou uma melhora significativa na fração

de ejeção de VE (FEVE) no grupo tratado com G-CSF. Lamentavelmente, esses resultados não foram reproduzidos em subseqüentes estudos randomizados, duplo-cegos e placebos controlados (BEOHAR *et al*, 2010).

Em um estudo não randomizado de Hill *et al* (2005), 16 pacientes com cardiopatia crônica receberam G-CSF (10 µg/kg/dia) por 5 dias; após seguimento de 3 meses, não foram observadas alterações na FEVE, perfusão do miocárdio e motilidade segmentar. Um paciente teve IAM 8 horas após a quinta dose de G-CSF; outro, 17 dias após G-CSF, teve infarto e foi a óbito. Em estudo não randomizado de Wang *et al* (2005), 13 pacientes receberam G-CSF em uma dose de 5 µg/kg/dia durante 6 dias, e no seguimento de 2 meses, foi observada uma melhora na FEVE analisada pela RM e ECO. A perfusão não teve alterações pela CM. A sintomatologia de angina (CCS) teve melhora. Boyle *et al* (2006), em um estudo com cinco pacientes portadores de cardiopatia isquêmica crônica, onde foram implantadas CD34+ previamente mobilizadas com G-CSF (10 µg/kg/dia por 4 dias), via intracoronária, mostraram que no seguimento de 1 ano, foi observada uma melhora significativa na perfusão; a FEVE teve uma melhora, porém sem significância. Houve melhora da angina e do escore de qualidade de vida. Losordo *et al* (2011), em um estudo prospectivo, randomizado, duplo-cego, fase II, com 167 pacientes, mostraram o benefício das CT CD34+ previamente mobilizadas e implantadas via intramiocárdica em pacientes com angina refratária classes III e IV (CCS). No seguimento de 6 meses, foi evidenciada uma melhora significativa da angina e na tolerância ao esforço em comparação ao grupo controle.

No seguimento de 4 meses do presente estudo, foram observados alguns dados interessantes, como: 1) a CF (Tabela 3; Figura 14) teve uma melhora significativa quando comparamos com o pré-implante; 2) os pacientes com sintomatologia de angina (CCS) (Tabela 4; Figura 15) apresentaram uma melhora significativa quando comparados com a

sintomatologia pré-implante; 3) o TC (Figura 16) foi significativamente melhor no seguimento de 4 meses quando comparado com o pré-implante; 4) a pontuação do QQdv (Figura 17) foi significativamente menor quando comparada à pontuação antes do implante das CT. É relevante mencionar que pacientes com cardiopatia isquêmica grave, ineleáveis para alternativa terapêutica convencional, tiveram, através da terapia celular, uma melhora significativa da sintomatologia, resistência ao esforço e qualidade de vida.

Na avaliação da função ventricular analisada através de ECO e RM, foi evidenciada uma melhora da FEVE, porém esta não foi suficientemente significativa. O mesmo aconteceu com a perfusão do miocárdio, onde, no controle de 4 meses, foi observada uma melhora, sem significância estatística, mesmo aumentando a viabilidade de oito para 12 pacientes. Mas, do ponto de vista clínico, provavelmente essa melhora da função e perfusão foi suficientemente “significativa” para esse grupo de pacientes.

Na análise do mapeamento eletroanatômico do VE, a atividade elétrica de baixa voltagem ($< 0,5$ mV), que representa áreas eletricamente inativas ou cicatriz, se manteve praticamente inalterada após controle de 4 meses. Os resultados desse exame (não significância) nos sugere que pode existir uma relação direta entre função, perfusão e atividade elétrica cardíaca, já que os achados desses exames (ECO, RM e MVolt) foram semelhantes.

5.2 Limitações do estudo

O tamanho da amostra foi pequeno, e houve a falta de um grupo controle. Esses fatores impossibilitaram a obtenção de dados mais consistentes quanto ao impacto do tratamento com CT CD34+ mobilizadas com G-CSF. O tempo de seguimento de 4 meses poderia ser outro limitador dos resultados. Um ponto controverso é a melhora significativa

da sintomatologia (CF/angina), resistência ao esforço e qualidade de vida, sem que isso tenha influenciado significativamente na melhora da função, perfusão, nem da atividade elétrica do VE, porém essa discreta melhora desses parâmetros poderia ser o suficiente para originar uma melhora clínica dos pacientes. Provavelmente, a disfunção ventricular severa desses pacientes foi um dos grandes limitadores na melhora da função, perfusão e atividade elétrica ventricular.

5.3 Implicações clínicas

Os resultados apresentados neste estudo não são muito diferentes dos já descritos na literatura; cabe mencionar que este estudo foi direcionado para pacientes com cardiopatia isquêmica grave, diferente dos apresentados na literatura, os quais são pacientes com cardiopatia isquêmica crônica sem disfunção ventricular severa.

A melhora da função e perfusão neste estudo não pode ser claramente definida devido à falta de um grupo controle, porém devemos considerar que a IC é uma doença de evolução progressiva, com deterioração da função ventricular, CF e qualidade de vida. Neste estudo, poderíamos dizer que nos pacientes que receberam CT não foi observada uma deterioração da função ventricular durante o seguimento de 4 meses.

As mortes mencionadas nos EACV (Tabela 8), foram: uma morte súbita de causa arritmogênica (parada cardíaca por FV durante internação hospitalar) e a outra por dissecação da aorta abdominal, não percebida inicialmente antes da inclusão no protocolo de estudo. Ambos os eventos não poderiam ser atribuídos ao uso de G-CSF nem à terapia celular.

A trombose arterial faz parte das intercorrências de procedimentos intervencionistas; ambas complicações foram solucionadas sem maiores intercorrências.

A angina instável é provocada por uma instabilidade da placa ateromatosa intracoronariana; nosso paciente, que apresentou angina instável, foi internado para estabilizar e recebeu alta, não sendo realizado nenhum procedimento, pois sabidamente era um paciente em tratamento clínico.

6 CONCLUSÕES

- 1) Os resultados deste estudo sugerem que a mobilização de CTH da MO com G-CSF é um procedimento seguro e eficaz para a finalidade proposta.
- 2) A utilização de duas vias simultâneas de implante das células CD34+ é um procedimento seguro e viável, porém não há como saber se isso influenciou nos resultados. São necessários estudos comparando diferentes técnicas de implante.
- 3) O implante de células CD34+ mobilizadas de SP em pacientes com cardiopatia isquêmica grave sugere ser benéfico e seguro. Proporciona aos pacientes uma melhora significativa da sintomatologia (CF da NHYA e da angina pela CCS), resistência ao esforço e melhora da qualidade de vida.
- 4) A função e a perfusão do miocárdio tiveram uma melhora não significativa, porém suficientemente necessária para promover uma melhora clínica dos pacientes com cardiopatia grave ineligiáveis para outra alternativa terapêutica.
- 5) O fato de os resultados da análise do mapeamento eletroanatômico serem semelhantes aos do ECO e RM nos sugere que pode existir uma relação direta entre função, perfusão e atividade elétrica cardíaca. Assim, o MVolt pode ser mais uma ferramenta para avaliar o implante das CT no miocárdio.

REFERÊNCIAS

AMERICAN HEART ASSOCIATION. Heart Disease and Stroke Statistics - 2003 Update. Dallas, 2002.

ACHILLI, F., et al. Granulocyte colony-stimulating factor attenuates left ventricular remodeling after acute anterior STEMI: results of the single-blind, randomized, placebo-controlled multicentre STem cEll Mobilization in Acute Myocardial Infarction (STEM-AMI) Trial. *Eur. J. Heart Fail.*, Oxford, v. 12, n. 10, p. 1111-1121, out. 2010.

BARBASH, I. M., et al. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation*, Hagerstown, v. 108, n. 7, p. 863-868, ago. 2003.

BARNETT D., et al. Guideline for the flow cytometric enumeration of CD34+ hematopoietic stem cells. *Clin. Lab. Haematol.*, Oxford, v. 21, n. 5, p. 301-308, out. 1999.

BEOHAR, N., et al. Rebuilding the damaged heart: the potential of cytokines and growth factors in the treatment of ischemic heart disease. *J. Am. Coll. Cardiol.*, New York, v. 56, n. 16, p. 1287-1297, out. 2010.

BETTENCOURT, P., et al. Predictors of prognosis in patients with stable mild to moderate heart failure. *J. Card. Fail.*, Philadelphia, v. 6, n. 4, p. 306-312, dez. 2000

BITTNER, R. E., et al. Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. *Anat. Embryol. (Berl.)*, Berlin, v. 199, n. 5, p. 391-396, maio 1999.

BOCCHI, E. A., et al. III diretriz brasileira de insuficiência cardíaca crônica. *Arq. Bras. Cardiol.*, São Paulo, v. 93, n. 1, supl. 1, 2009.

BOCCHI, E. A., et al. Atualização da diretriz brasileira de insuficiência cardíaca crônica. *Arq. Bras. Cardiol.*, São Paulo, v. 98, n. 1, supl. 1, 2012.

BOYLE, A. J., et al. Intracoronary high-dose CD34+ stem cells in patients with chronic ischemic heart disease: a 12 month follow-up. *Int. J. Cardiol.*, Amsterdam, v. 109, n. 1, p. 21-27, abr. 2006.

BREHM, M.; ZEUS, T.; STRAUER, B. E. Stem cells -- clinical application and perspectives. *Herz.*, s/1, v. 27, n. 7, p. 611-620, nov. 2002.

BRITTO, R. R.; SOUSA, L.A.P., Teste de caminhada de 6 minutos - uma normatização brasileira. *Fisioter. Mov.*, Curitiba, v. 19 n. 4, p. 49-54, out./dez. 2006.

BROXMEYER, H. E., et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, Washington, v. 86, n. 10, p. 3828-3832, maio 1989.

BYDŁOWSKI, S. P., et al. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, São José do Rio Preto, v. 31, supl. 1, p. 25-35, maio 2009.

CAMPEAU, L. Letter: Grading of angina pectoris. *Circulation*, Hagerstown, v. 54, n. 3, p. 522-523, set. 1976

CARVALHO, V. O., et al. Validação da Versão em Português do Minnesota Living with Heart Failure Questionnaire. *Arq. Bras. Cardiol.*, São Paulo, v. 93, n. 1, p 39-44, jul. 2009

COVAS, D. T. Biologia das células-tronco adultas. In: VOLTARELLI, J. C. *Transplante de células-tronco hematopoéticas*. São Paulo, 2009. p. 43-55.

DATASUS. Disponível em: <<http://www.datasus.org.br>>.

DE OLIVEIRA JÚNIOR, M. T., GUIMARÃES, G. V., BARRETTO, A. C.. Teste de 6 minutos em insuficiência cardíaca. *Arq. Bras. Cardiol.*, São Paulo, v. 67, n. 6, dez. 1996.

EVANS, M. J.; KAUFMAN, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, London, v. 292, n. 5819, p. 154-156, jul. 1981.

FISCHBACH, G. D.; FISCHBACH, R. L. Stem cells: science, policy, and ethics. *J. Clin. Invest.*, New Haven, v. 114, n. 10, p. 1364-1370, nov. 2004.

GAJKOWSKA, A., et al. Flow cytometric enumeration of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells in leukapheresis product and bone marrow for clinical transplantation: a comparison of three methods. *Folia Histochem. Cytobiol.*, Warszawa, v. 44, n. 1, p. 53-60, 2006.

GIORDANO, F. J. Retrograde coronary perfusion: a superior route to deliver therapeutics to the heart? *J. Am. Coll. Cardiol.*, New York, v. 42, n. 6, p. 1129-1131, set. 2003.

GIVERTZ, M. M.; COLUCCI, W. S.; BRAUNWALD, E. Aspectos clínicos de insuficiência cardíaca. In: ZIPES, D. P.; LIBBY, P.; BONOW, R. O.; Braunwald, E. Braunwald. *Tratado de Doenças Cardiovasculares*. 7^a ed. São Paulo: Elsevier, 2009. p. 539-568.

GUTENSOHN, K.; MAGENS, M.; KUEHNL, P. Flow cytometry: the standard for monitoring the onset of apheresis and for the evaluation of stem and progenitor cell graft quality. *Vox Sang.*, Basel, v. 78, supl. 2, p. 131-135, 2000.

HILL, J. M., et al. Outcomes and risks of granulocyte colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease. *J. Am. Coll. Cardiol.*, New York, v. 46, n. 9, p. 1643-1648, nov. 2005.

INCE, H., et al. Prevention of left ventricular remodeling with granulocyte colony-stimulating factor after acute myocardial infarction: final 1-year results of the Front-Integrated Revascularization and Stem Cell Liberation in Evolving Acute Myocardial Infarction by Granulocyte Colony-Stimulating Factor (FIRSTLINE-AMI) Trial. *Circulation*, Hagerstown, v. 112, n. 9, supl., p. 173-180, ago. 2005.

KANG, H., et al. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet*, London, v. 363, n. 9411, p. 751-756, mar. 2004.

KAWAMOTO, A., et al. CD34-Positive cells exhibit increased potency and safety for therapeutic neovascularization after myocardial infarction compared with total mononuclear cells. *Circulation*, 2006; 114:2163-2169.

LOSORDO, D. W., et al. Intramyocardial, autologous cd34+ cell therapy for refractory angina. *Circ. Res.*, Baltimore, v. 109, n. 4, p. 428-436, ago. 2011.

MANSUR, A. P. Diretrizes de doença coronariana crônica angina estável. *Arq. Bras. Cardiol.*, São Paulo, v. 83, supl. 2, set. 2004.

MCCREDIE, K. B.; HERSH, E. M.; FREIREICH, E. J. Cell capable of colony formation in the peripheral blood of man. *Science*, Washington, v. 171, n. 3968, p. 293-294, jan. 1971.

MOTA, A. C.; SOARES, M. B.; SANTOS, R. R. Uso de terapia regenerativa com células-tronco da medula óssea em doenças cardiovasculares – perspectiva do hematologista. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, São José do Rio Preto, v. 27, n. 2, p. 126-132, abr./jun. 2005.

MURAD-NETTO, S., et al. Terapia de células-tronco no infarto agudo do miocárdio através de perfusão coronariana retrógrada. Uma nova técnica. *Arq. Bras. Card.*, São Paulo, v. 83, n. 4, p. 349-351, out. 2004.

NAGY, A., et al. Derivation of completely cell culture-derived mice from early passage embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, Washington*, v. 90, n. 18, p. 8424-8428, set. 1993.

OH, H., et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: Homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, Washington*, v. 100, n. 21, p. 12313-12318, out. 2003.

ORLIC, D., et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A, Washington*, v. 98, n. 18, 10344-10349, ago. 2001.

ORLIC, D., et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature, London*, v. 410, n. 6829, p. 701-705, abr. 2001.

ORLIC, D., CANNON, R. O. Hematopoietic stem cells for myocardial regeneration. In: PENN, M. S. *Contemporary cardiology: stem cells and myocardial regeneration*. Totowa: Humana Press Inc., 2007. v. 1, p. 9-27.

PARAJÓN, T., et al. Aplicación en España del cuestionario sobre calidad de vida “Minnesota Living With Heart Failure” para la insuficiencia cardíaca. *Rev. Esp. Cardiol.*, Madrid, v. 57, n. 2, p. 155-60, fev. 2004.

PEREIRA, Lda. V. Importância do uso das células-tronco para a saúde pública. *Cienc. Saude Colet.*, Rio de Janeiro, v. 13, n. 1, p. 7-17, jan./fev. 2008.

PERIN, E. C., et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation, Hagerstown*, v. 107, n. 18, p. 2294-2302, April 2003.

PRESTON, S. L., et al. The new stem cell biology: something for everyone. *Mol. Pathol.*, London, v. 56, n. 2, p. 86-96, abr. 2003.

RIPA, R. S., et al. Stem cell mobilization induced by subcutaneous granulocyte-colony stimulating factor to improve cardiac regeneration after acute St-elevation myocardial infarction: result of the double-blind, randomized, placebo-controlled stem cells in myocardial infarction (STEMMI) trial. *Circulation*, Hagerstown, v. 113, n. 16, p. 1983-1992, abr. 2006.

ROSSI NETO, J. M. A dimensão do problema da insuficiência cardíaca do Brasil e do mundo. *Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo*, São Paulo, v. 14, n. 1, p. 1-10, jan./fev. 2004.

SANGANALMATH, S. K., et al. Hematopoietic cytokines for cardiac repair: mobilization of bone marrow cells and beyond. *Basic Res. Cardiol.*, Darmstadt, v. 106, n. 5, p. 709-733, set. 2011.

SOUZA, C. A.; MARQUES, J. F. C.; BOUZAS, L. F. S. Fonte mobilização e coleta de células-tronco hematopoéticas para transplante. In: VOLTARELLI, J. C. *Transplante de células-tronco hematopoéticas*. São Paulo: Atheneu, 2009. p. 565-588.

STRAUER, B. E., et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation*, Hagerstown, v. 106, n. 15, p. 1913-1918, out. 2002.

STRAUER, B. E.; KORNOWSKI, R. Stem cell therapy in perspective. *Circulation*, Hagerstown, v. 107, n. 7, p. 929-934, fev. 2003.

STRAUER, B. E.; STEINHOFF, G. 10 years of intracoronary and intramyocardial bone marrow stem cell therapy of the heart. *J. Am. Coll. Cardiol.*, New York, v. 58, n. 11, p. 1095-1104, set. 2011.

SUÁREZ DE LEZO J., et al. Effects of the stem cell mobilization with recombinant human granulocyte colony stimulating factor in patients with percutaneously revascularized acute anterior myocardial infarction. *Rev. Esp. Cardiol.*, Madrid, v. 58, n. 3, p. 253-261, mar. 2005.

SUTHERLAND, D. R., et al. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. *J. Hematother.*, New York, v. 5, n. 3, p. 213-226, jun. 1996.

SZMITKO, P. E., et al. Endothelial progenitor cells: new hope for a broken heart. *Circulation*, Hagerstown, v. 107, n. 24, p. 3093-3100, jun. 2003.

THOMSON, J. A., et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, New York, v. 282, n. 5391, p. 1145-1147, nov. 1998.

TOMITA, S., et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation*, Hagerstown, v. 100, n. 19, supl. II, p. II-247-II-256, nov. 1999.

VOLTARELLI, J. C. Applications of flow cytometry to hematopoietic stem cell transplantation. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 95, n. 3, p. 403-414, maio/jun. 2000.

WANG, Y., et al. Effect of mobilization of bone marrow stem cell by granulocyte colony stimulating factor on clinical symptoms, left ventricular perfusion and function in patients with severe chronic ischemic heart disease. *Int. J. Cardiol.*, Amsterdam, v. 100, n. 3, p. 477-483, abr. 2005.

WOLLERT, K. C.; DREXLER, H. Clinical applications of stem cells for the heart. *Circ. Res.*, Baltimore, v. 96, n. 2, p. 151-163, fev. 2005.

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DO ESTUDO:

“Protocolo de pesquisa: implante de células-tronco em pacientes com cardiopatia isquêmica grave”

Primeiramente, deve ficar claro que o(a) _____ está sendo convidado(a) a participar de um estudo que vai testar a segurança e a eficácia da colocação de células-tronco no coração. Este estudo irá contribuir para o desenvolvimento de um novo tratamento para infarto do coração e poderá ajudar a melhorar a sua qualidade de vida.

O objetivo deste estudo é a utilização de células-tronco (células jovens) que ficam dentro dos ossos e podem sair para o sangue quando a pessoa é tratada com um medicamento que faz seu organismo produzir mais células para o sangue e é chamado granulocina. Para se conseguir a quantidade necessária dessas células, você receberá um tratamento durante 5 dias com esse medicamento. Você ficará internado no Hospital Francisca Mendes durante todo o tratamento até o implante das células-tronco no seu coração e, para sua segurança, só será liberado quando a equipe médica achar que você já está bem. Durante o tratamento, você poderá sentir dores musculares pelo corpo ou nos ossos. Problemas mais graves, causados por esse remédio, dificilmente acontecem. Depois do tratamento, você passará pelo procedimento de retirada dessas células do seu sangue. Para isso, nós utilizaremos uma máquina que coleta sangue, chamada aférese, assim como é feito quando uma pessoa vai doar sangue de forma especial. Essa retirada pode durar de 2 a 4 horas. Você permanecerá deitado, e uma agulha será colocada na veia do seu braço para a retirada do sangue. O sangue será retirado e passará por essa máquina, que separa as células que nós precisamos para colocar no coração, e o restante do sangue (células vermelhas e todos os outros componentes) irá voltar para o seu corpo. Como esse processo é demorado (2-4 horas), você poderá sentir calafrios, tontura e dormência nos lábios. Se isso acontecer, você deverá falar com o médico que estiver te acompanhando, e ele te dará o medicamento necessário para passar os sintomas. Sempre haverá um médico ao seu lado, acompanhando todos os passos do seu tratamento. Em seguida, nós levaremos as células retiradas do seu sangue para um laboratório, que irá ver se conseguimos a

quantidade necessária de células-tronco para o implante no coração. Todos os testes de segurança serão feitos com essas células para não causar nenhum problema à sua saúde. Em seguida nossa equipe irá colocar as células-tronco no seu coração, usando um cateter. Você receberá uma leve anestesia, que raramente poderá provocar fraqueza do músculo do coração, aspiração de líquidos do estômago e dificuldade de respirar. O cateter utilizado é semelhante ao que é feito no exame de cateterismo que você já fez anteriormente. O cateter será colocado dentro da artéria e/ou veia da coxa, sendo inserido até alcançar as artérias e veias do coração, onde as células serão colocadas. As células serão colocadas bem dentro do coração, o mais perto possível do local onde existe o problema; e para que estas células não saiam rapidamente do coração, nós iremos injetar as células-tronco pela artéria e pela veia do coração ao mesmo tempo. Esse procedimento é semelhante ao cateterismo ou a uma angioplastia com balão. Portanto, o risco de acontecer alguma coisa grave com você é muito pequeno e dificilmente ocorre. Algumas complicações podem raramente acontecer, como o local onde o cateter foi colocado ficar roxo, lesão no cérebro, infarto ou aumento de sangue ao redor do coração, e em último caso, a pessoa pode morrer. Tudo isso está mais relacionado com pacientes que têm insuficiência cardíaca grave. Mas como esse tratamento com células-tronco ainda é muito novo, nós não podemos garantir que você ficará curado do seu problema no coração. Você provavelmente continuará tomando as medicações que tomava anteriormente e, para verificar possíveis complicações relacionadas à colocação das células-tronco, será submetido aos vários exames após o tratamento. Em caso de morte, procedimentos de rotina do hospital serão feitos, como a avaliação da causa da morte, que poderá ou não estar relacionada à terapia com as células-tronco.

O benefício que pode surgir deste estudo é recuperar, através da colocação das células-tronco, as partes do coração danificadas pelo infarto, melhorando, assim, sua qualidade de vida. Você poderá apresentar mais resistência física após o tratamento, facilitando sua caminhada e sua respiração, diminuindo a sensação de cansaço, falta de ar, inchaço nas pernas e outros. Além disso, você estará contribuindo para maiores conhecimentos para o tratamento de outros pacientes com doenças do coração parecidas com a sua.

Você será acompanhado(a) por enfermeiros do hospital 24 horas por dia e receberá tratamento assistencial, com todos os exames necessários, por 12 meses, sem nenhum gasto de dinheiro, e sempre que necessário receberá esclarecimentos de dúvidas,

acompanhamento clínico e laboratorial, podendo entrar em contato com o Dr. Jaime Arnez Maldonado – médico cardiologista, telefone (92) 81122530 – ou com a Dra. Adriana Malheiro – coordenadora do projeto, Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), telefones (92) 655-0111 e 91149478. Sempre que necessário, será prestada orientação médica adequada ou encaminhamentos, feitos pela equipe médica do Hospital Francisca Mendes. Após esses 12 meses do projeto, você continuará sendo atendido pelo Hospital Francisca Mendes pelo tempo necessário, como já acontece de rotina. Além disso, exames complementares diversos, se necessários, serão feitos, sem nenhum ônus ao seu tratamento.

Sua participação neste estudo é inteiramente voluntária. Durante o estudo, o(a) senhor(a) deve sentir-se livre para questionar o que desejar e, caso não se considere suficientemente esclarecido(a) pelo profissional que o(a) estiver atendendo, poderá solicitar informações diretamente com o investigador responsável pelo estudo. Uma vez participando deste estudo, o(a) senhor(a) deverá sentir-se livre para abandoná-lo a qualquer momento do curso deste, sem que isso afete o seu cuidado ou tratamento futuro neste hospital. O seu médico também poderá retirá-lo do estudo a qualquer momento se julgar necessário para o seu bem-estar. É importante ficar claro que isso não afetará o seu atendimento no Hospital Francisca Mendes. Após os 12 meses do estudo, você continuará recebendo assistência médica de rotina no hospital por tempo indeterminado, indicado pelo seu médico, e em caso de dúvidas, poderá ainda procurar a equipe responsável pelo estudo em que você participou. Os dados pessoais referentes à sua participação neste estudo permanecerão confidenciais, não sendo divulgados de forma a declarar sua identidade. Para eventuais danos decorrentes da pesquisa, o HEMOAM e o Hospital Francisca Mendes se comprometem a ressarcir qualquer dano que possa ocorrer decorrente do protocolo de pesquisa, sem ônus para o paciente.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Após ter recebido informações claras, eu concordo em participar do estudo em questão.

(Assinatura do participante)

(Testemunha)

(Assinatura do pesquisador)

(Assinatura do pesquisador)



Manaus, ___/___/____ (Impressão dactiloscópica)

Manaus, ___/___/____

APÊNDICE B - PROTOCOLO de TERAPIA CELULAR – ISQUÊMICO

1. Nome: _____

2. Idade: _____ 3. Sexo: 1(M); 2(F) 4. Grupo sanguíneo: _____

Telefone: _____ Endereço: _____

4. ANTECEDENTES (//)

- 4.1 - HAS 1. S 2. N
- 4.2 - Diabetes melito 1. S 2. N
- 4.3 - Dislipidemia 1. S 2. N
- 4.4 - Tabagismo 1. S 2. N
- 4.5 - Antecedentes familiares 1. S 2. N
- 4.6 - Infarto prévio 1. S 2. N
- 4.7 - RMI prévia 1. S 2. N Pontes:
- 4.8 - ATC 1. S 2. N
- 4.8 - Outros 1. S 2. N

5. SINTOMATOLOGIA

- 5.1 - Assintomático 1. S 2. N
- 5.2 - Oligossintomático 1. S 2. N
- 5.3 - Dispneia 1. S 2. N
- 5.4 - Angina 1. S 2. N 5.4.4.1 (I) - 2 (II) - 3 (III) - 4 (IV)
- 5.5 - Outros 1. S 2. N

6. EXAME FÍSICO

- 6.1 Peso: - 6.2 Altura: - 6.3 IMC: - 6.4 PA: - 6.5 FC:
- 6.6 Cardiovascular (sopro mitral): 1. S 2. N
- 6.7 Respiratório (estertores): 1. S 2. N
- 6.8 Abdômen (hepatomegalia) 1. S 2. N
- 6.9 Edema MMII: 1. S 2. N

7. CLASSE FUNCIONAL – NYHA

- 1. CF I () - 2. CF II ()
- 3. CF III () - 4. CF IV ()

8. TESTE DE CAMINHADA DE 6 MINUTOS (//)

Pré-teste: 8.1a PA 8.1b FC 8.1c FR

Pós-teste: 8.2a PA 8.2b FC 8.2c FR

a) 8.3 Distância percorrida: _____ metros

b) 8.3 Sintomas associados:

1) 8.4a Assintomático 1. S 2. N

2) 8.4b Cansaço leve 1. S 2. N

3) 8.4c Cansaço moderado 1. S 2. N

4) 8.4d Cansaço importante 1. S 2. N

5) 8.4e Ofegante 1. S 2. N

6) 8.4f Angina 1. S 2. N

8.4f 1: 1. (I); 2. (II); 3. (III); 4. (IV); 0. (não)

Quantos metros:

c) Comentários:

EXAMES COMPLEMENTARES

9. ELETROCARDIOGRAMA (//)

9.1 Ritmo sinusal; 9.2 Freq: ppm; 9.3 PR: ms; 9.4 QRS: ms;

9.5 Eixo: °; 9.6 ESV: ; 9.7 EV: → S (1) N (2)

9.8: Parede inativa: 1. Anterior - 2. Lateral - 3. Inferior - 4. Septal

Comentários:

10. HOLTER 24 HORAS

10.1 Ritmo sinusal; 10.2 Freq. média: ppm

10.5 EV → 1. Isoladas; 2. Pareadas; 3. TVns; 4. Monomof.; 5. Polimor; 0. (n)

10.6 ESV → 1. Isoladas; 2. Pareadas; 3. TSVns; 4. TSV; 0. (n)

10.7 Pausas > 2,5 segundos S (1) N (2)

Comentários

11. RAIOS X DE TORAX

1. ICT:

12. ECO-DOPPLER COLORIDO PRÉ-IMPLANTE DE CT (//)

12.1 AE: mm; 12.2 DDVE: mm; 12.3 DSVE: mm; 12.4 VDVE: ml;

12.5 VSVE: ml; 12.6 FE Simpson: %;

12.7 Disfunção sistólica:

12.7.1 Global S (1) N (2)

12.7.2 Segmentar: S (1) N (2)

12.7.3 Hipocinesia; ----- 0. Ausência de alteração nesse segmento;

1. Anterior basal; 2. Anterior médio; 3. Anterior distal;
4. Lateral basal; 5. Lateral médio; 6. Lateral distal;
7. Inferior basal; 8. Inferior médio; 9. Inferior distal;
10. Posterior basal; 11. Posterior médio; 12. Posterior distal;
13. Septal basal; 14. Septal médio; 15. Septal apical;
16. Apical

12.7.4 Acinesia ----- 0. Ausência de alteração nesse segmento;

1. Anterior basal; 2. Anterior médio; 3. Anterior distal;
4. Lateral basal; 5. Lateral médio; 6. Lateral distal;
7. Inferior basal; 8. Inferior médio; 9. Inferior distal;
10. Posterior basal; 11. Posterior médio; 12. Posterior distal;
13. Septal basal; 14. Septal médio; 15. Septal apical;
16. Apical

12.7.5 Discinesia ----- 0. Ausência de alteração nesse segmento;

1. Anterior basal; 2. Anterior médio; 3. Anterior distal;
4. Lateral basal; 5. Lateral médio; 6. Lateral distal;
7. Inferior basal; 8. Inferior médio; 9. Inferior distal;
10. Posterior basal; 11. Posterior médio; 12. Posterior distal;
13. Septal basal; 14. Septal médio; 15. Septal apical;
16. Apical

Comentários:

14. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA CARDÍACA – FUNÇÃO (/ /)

13.1 Débito: l/min; 13.2 DDVE: mm; 13.3 DSVE: mm; 13.4 VDVE: ml

13.5 VSVE: ml; 13.6 Septo: mm; 13.7 Parede post.: mm

13.8 FE: %; 13.9 Delta: %

13.10 Disfunção sistólica

13.10.1 Global

13.10.2 Segmentar: 1. Hipocinesia; 2. Acinesia; 3. Discinesia; 4. Normal

13.10.2.1 Anterior: 1 → 1/3 proximal ; 2 → 1/3 médio ; 3 → 1/3 distal

13.10.2.2 Lateral: 1 → 1/3 proximal ; 2 → 1/3 médio ; 3 → 1/3 distal

13.10.2.3 Inferior: 1 → 1/3 proximal ; 2 → 1/3 médio ; 3 → 1/3 distal

13.10.2.4 Septo: 1 → 1/3 proximal ; 2 → 1/3 médio ; 3 → 1/3 distal

13.10.2.5 Apical: 1 → 1/3 proximal ; 2 → 1/3 médio ; 3 → 1/3 distal

Comentários:

14. CINTILOGRAFIA DE MIOCÁRDIO: PERFUSÃO (MIBI-TÁLIO) (/ /)

Captação do radiofármaco: 1. Normal; 2. Hipocaptação transitória

3. Hipocaptação persistente

- 15.1 Anterior ()
- 15.2 Inferior ()
- 15.3 Lateral ()
- 15.4 Septal ()
- 15.5 Apical ()
- 15.6 Cicatriz _____% paredes
- 15.7 Viabilidade _____% paredes

15. CINECORONARIOGRAFIA (/ /)

- 1. TCE: lesão %
- 2. A-DA: lesão %
- 3. A-CX: lesão %
- 4. A-CD: lesão %
- 5. Dominância: 1. A-DA () 2. A-CX () 3. A-CD ()

Comentários:

16. MAPEAMENTO ELETROANATÔMICO – VOLTAGEM DO VE (/ /)

- Escala:*
- 1) < 0,5 mV → Fibrose
 - 2) 0,5 a 1,5 mV → Área de transição
 - 3) > 1,5 mV → Músculo normal

16.1 Fibrose ----- 0. Ausência de alteração nesse segmento;

- 1. Anterior basal; 2. Anterior médio; 3. Anterior distal;
- 4. Lateral basal; 5. Lateral médio; 6. Lateral distal;
- 7. Inferior basal; 8. Inferior médio; 9. Inferior distal;
- 10. Posterior basal; 11. Posterior médio; 12. Posterior distal;
- 13. Septal basal; 14. Septal médio; 15. Septal apical;
- 16. Apical

16.2 Transição ----- 0. Ausência de alteração nesse segmento;

- 1. Anterior basal; 2. Anterior médio; 3. Anterior distal;
- 4. Lateral basal; 5. Lateral médio; 6. Lateral distal;
- 7. Inferior basal; 8. Inferior médio; 9. Inferior distal;
- 10. Posterior basal; 11. Posterior médio; 12. Posterior distal;
- 13. Septal basal; 14. Septal médio; 15. Septal apical;
- 16. Apical

16.3 Músculo normal ----- 0. Ausência de alteração nesse segmento;

- 1. Anterior basal; 2. Anterior médio; 3. Anterior distal;
- 4. Lateral basal; 5. Lateral médio; 6. Lateral distal;
- 7. Inferior basal; 8. Inferior médio; 9. Inferior distal;
- 10. Posterior basal; 11. Posterior médio; 12. Posterior distal;
- 13. Septal basal; 14. Septal médio; 15. Septal apical;
- 16. Apical

16.4 Número de pontos coletados _____; Tempo de geometria: _____; TRx _____;

Tempo total do procedimento: _____; Fibrose – Área _____ cm²

17. EXAMES DE LABORATÓRIO PRÉ E PÓS G-CSF

Hemograma

Data	Pré G-CSF	2º dia	3º dia	IMPLANTE	5º dia	15º dia
HM						
HB						
HT						
LC						
BS						
EO						
ML						
MT						
BT						
SEG						
LF						
MN						
PLA						
Na						
K						
Ureia						
Ac. úrico						
Cr						
TGO						
TGP						
F alcalina						
DHL						
Glicemia						
CPK						
CKMB						

18. ADMINISTRAÇÃO DE G-CSF

Data	Hora	Dose 10 µg/kgdia	Lote	N de Serie do Frasco
	08:00			
	08:00			
	08:00			
	08:00			
	08:00			

19. EFEITOS COLATERAIS À ADMINISTRAÇÃO DE G-CSF

S (1) N (2)

- 20.1 - Assintomático ()
- 20.2 - Dor musculoesquelética ()
- 20.3 - Disúria ()

- 20.4 - Hipotensão ()
- 20.5 - Outros ()

Comentários:

20. CONTROLE DE CITOMETRIA DE FLUXO

(G-CSF) SC 10 µg/kg por 5 dias → CD34+ x 10³

Data	1º dia G-CSF	2º dia G-CSF	3º dia G-CSF	Implante	5º dia G-CSF
CD34+					
Outros					

* **Nota:** O controle da citometria de 2 dias corresponde ao efeito da primeira dose do G-CSF, e assim sucessivamente.

Comentários:

21. AFÉRESE (/ /) 5º dia (efeito da terceira dose de G-CSF)

	PAS	PAD	PAM	Ciclos	Volume	Duração
Início						
Fim						

Intercorrências:

Comentários:

22. IMPLANTE DE CD34+ (/ /)

Nº de células CD34+ implantadas x ml	
--------------------------------------	--

23. Implante anterógrado

Volume total	20 ml	Nota
24.1 = A-DA		
24.2 = A-CX		
24.3 = A-CD		

24. Implante retrógrado

Volume total	40 ml	Nota
VC média		
VC posterior		
VC posterolateral		

VC lateral		
Grande veia cardíaca		
VC anterolateral		

Comentários e intercorrências durante o implante

25. TERAPIA FARMACOLÓGICA

S (1) N (2)

Data	PRÉ-IMPL.	PÓS-IMPL.	4 MESES	8 MESES	12 MESES
25.1 = Digital					
25.2 = B. bloqueador					
25.3 = IECA					
25.4 = ARA 2					
25.5 = Nitrato					
25.6 = espironolactona					
25.7 = Diuréticos alça					
25.8 = HCT					
25.9 = Hipolipemiante					
25.10 = Hipoglicemiante					
25.11 = AAS					
25.12 = Clopidogrel					
25.13 = Outros					

26. QUESTIONÁRIO DE QUALIDADE DE VIDA

(Minnesota Living with Heart Failure Questionnaire validado ao português)

Durante o último mês, seu problema cardíaco o impediu de viver como queria? Por quê?
 Não (0); Muito pouco (1); Pouco (2); Mais ou menos (3); Muito (4); Demais (5)

DATA	PRÉ	4m	12m
1) Causando inchaço em seus tornozelos e pernas			
2) Obrigando-o a sentar ou deitar para descansar durante o dia			
3) Tornando sua caminhada e subida de escadas difíceis			
4) Tornando seu trabalho doméstico difícil			
5) Tornando suas saídas de casa difíceis			
6) Tornando difícil dormir à noite			
7) Tornando seus relacionamentos ou atividades com familiares e amigos difíceis			
8) Tornando seu trabalho para ganhar a vida difícil			
9) Tornando seus passatempos, esportes e diversão difíceis			
10) Tornando sua atividade sexual difícil			
11) Fazendo-o comer menos as comidas que você gosta			
12) Causando falta de ar			

13) Deixando-o cansado, fatigado ou com pouca energia			
14) Obrigando-o a ficar hospitalizado			
15) Fazendo-o gastar dinheiro com cuidados médicos			
16) Causando efeitos colaterais das medicações			
17) Fazendo-o sentir-se um peso para familiares e amigos			
18) Fazendo-o sentir uma falta de autocontrole na sua família			
19) Fazendo-o se preocupar			
20) Tornando difícil concentrar-se ou lembrar-se das coisas			
21) Fazendo-o sentir-se deprimido			

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Adriana Malheiro, pelo esforço e perseverança, tornando este projeto uma realidade, e pela cuidadosa orientação na tese.

Ao Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho, pela oportunidade que me concedeu de ingressar na pós-graduação e por acreditar na terapia celular.

Ao Prof. Dr. José Wilson Cavalcante, pelos conselhos sempre válidos e sábios.

Ao Dr. Rodrigo Castro, pela cuidadosa e criteriosa análise dos pacientes, cinecoronariografias e implante das células.

Ao Dr. Gustavo Aguiar, pelas ideias, sugestões, realização e análise da ressonância magnética cardíaca.

Ao Dr. João Marcos Bemfica, pela paciência na realização e análise da ecocardiografia.

Ao Dr. Fernando Mattos e Dr. Igor Coelho, por todo esse apoio incondicional e pela realização e análise da cintilografia de miocárdio.

À Dra. Andréa M. Tarragô e à Dra. Nadja P. Garcia, pela cuidadosa dedicação à parte mais nobre deste projeto: as células-tronco.

À minha esposa Karina, por ter me proporcionado minha maior inspiração: nossa filha Michelle.

Aos meus colaboradores Sra. Vilma Lopes, Rosangela Costa, Hernou Oliveira e André Gomes, pela presença constante no dia-a-dia.

Às instituições Hospital Universitário Francisca Mendes (HUFM), Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Hospital Santa Júlia (HSJ), PRODIMAGEM e Centro de Medicina Nuclear (CENUSA).