

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANO MENDES DE SOUZA

**IMPLANTAÇÃO DO CENTRO DE PESQUISAS EM TRANSPLANTE DE
CÉLULAS-TRONCO E INÍCIO DA APLICAÇÃO CLÍNICA PARA TRATAMENTO
DAS MIOCARDIOPATIAS**


**CURITIBA
2009**



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA
NÍVEIS: MESTRADO E DOUTORADO

Ata do julgamento da 333ª dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, referente ao aluno **JULIANO MENDES DE SOUZA** com o título **IMPLANTAÇÃO DO CENTRO DE PESQUISAS EM TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO E INÍCIO DA APLICAÇÃO CLÍNICA PARA O TRATAMENTO DAS MIOCARDIOPATIAS**, na **Linha de Pesquisa:** Avaliação Anátomo-Funcional dos Transplantes de Órgãos Sólidos e Tecidos na **Área de Concentração:** Clínica Cirúrgica tendo como orientador Prof. Dr. Henrique Jorge Stahlke Júnior.

Às sete horas e trinta minutos do dia dezessete de fevereiro de dois mil e nove, no auditório do 7º andar do prédio central sala 701 do Hospital de Clínicas, reuniu-se, em sessão pública, a Banca Examinadora de Avaliação composta pelos Professores Doutores Luiz Fernando Kubrusly, Leonardo de Andrade Mulinari e Roberto Gomes de Carvalho sendo este último Presidente da Banca. Aberta a sessão, foi apresentada pelo Prof. Dr. Antonio Carlos L. Campos, Coordenador do Programa, a documentação probatória do cumprimento pelo candidato das exigências legais que lhe facultam submeter-se à avaliação da dissertação como última etapa à sua titulação no Programa. A seguir o Presidente da Banca Examinadora convidou o candidato a apresentar oralmente resumo de sua dissertação no prazo máximo de trinta minutos para demonstração de sua capacidade didática e para melhor conhecimento do tema por parte da audiência composta de professores, médicos, alunos, familiares e demais interessados. Seguiu-se a arguição e imediata resposta pelo candidato, sucessivamente pelos componentes da Banca Examinadora. Obedecido o tempo máximo de vinte minutos para a arguição e igual tempo para cada resposta. Terminada a etapa de arguição, reuniu-se a Banca Examinadora em sala reservada para atribuição das notas, dos conceitos e lavratura do Parecer Conjunto. O candidato foi considerado **APROVADO** considerando-se os parâmetros vigentes estabelecidos pelo programa e regidos pela legislação pertinente da instituição. Voltando à sala de sessão, o Senhor Presidente da Banca Examinadora leu os conceitos do Parecer Conjunto e deu por encerrada a sessão. E para que tudo conste, foi lavrada a presente Ata, que será assinada pelos seguintes componentes da Banca Examinadora de Avaliação.


Luiz Fernando Kubrusly


Leonardo de Andrade Mulinari


Roberto Gomes de Carvalho

JULIANO MENDES DE SOUZA

**IMPLANTAÇÃO DO CENTRO DE PESQUISAS EM TRANSPLANTE DE
CÉLULAS-TRONCO E INÍCIO DA APLICAÇÃO CLÍNICA PARA TRATAMENTO
DAS MIOCARDIOPATIAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Clínica Cirúrgica

Orientador: Prof. Dr. Henrique Jorge Stahlke Júnior

Co-orientador: Prof. Dr. Danton Richlin da Rocha
Loures

Coordenador: Prof. Dr. Antônio Carlos Ligocki
Campos

**CURITIBA
2009**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS. BIBLIOTECA CENTRAL.
COORDENAÇÃO DE PROCESSOS TÉCNICOS.
Ficha catalográfica

- S729 Souza, Juliano Mendes de, 1978-
Implantação do Centro de Pesquisas em Transplante de Células-tronco e início da aplicação clínica para tratamento das miocardiopatias / Juliano Mendes de Souza. - Curitiba, PR, 2009.
85f. : il.; gráfs., tabs.
- Orientador: Henrique Jorge Stahlke Júnior
Co-orientador: Danton Richlin da Rocha Loures
Dissertação(mestrado)- Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica.
Defesa: Curitiba, 2009.
Inclui bibliografia
1. Insuficiência cardíaca. 2. Enfarte do miocárdio – Teses. 3. Células-tronco. 4. Centro de Pesquisas em Transplante de Células-tronco.
I. Stahlke Júnior, Henrique Jorge. II. Loures, Danton Richlin da Rocha.
III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica. IV. Título.

CDD 22.ed. 616.1237

Aos meus pais, pelo apoio e dedicação.
Por sempre conduzirem-me no caminho da
retidão.

À minha esposa, pelo seu eterno e
incondicional amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida e por sua constante proteção.

Ao Prof. Dr. Henrique Jorge Stahlke Junior, pelas orientações e ajudas fundamentais para concretização desta dissertação.

Ao Prof. Dr. Danton Richlin da Rocha Loures, pela amizade e pelo inabalável entusiasmo, mesmo nas grandes provações.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Ligocki Campos, pela coordenação do programa de pós-graduação e aceitação desta dissertação.

Ao Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias, pelas sugestões metodológicas para enriquecimento desta dissertação.

Ao Governo do Estado do Paraná e Secretaria de Estado de Ciência e Tecnologia pelo suporte financeiro para implantação do Centro de Pesquisas.

À FUNPAR, pela administração dos recursos financeiros e esforços no sentido de procurar ao máximo acelerar os processos de compras para o projeto.

À Prof^a Noemi Farah Pereira, pela condução dos trabalhos no laboratório de Imunogenética.

À Prof^a Maria Felicitas Niedfeld Rodriguez, pela condução dos trabalhos no laboratório de Cultura Celular.

Às Prof^{as} Mariester Malvezzi e Miriam P. Beltrami, pela condução dos trabalhos no laboratório de Imunofenotipagem.

À Tamara Borgonovo, Alexandra Cristina Senegaglia, Carmen Lucia Kuniyoshi Rebelatto e Ana Paula Azambuja pelo imprescindível trabalho laboratorial no preparo e caracterização das células-tronco.

Ao Dr. Ricardo João Westphal, pela abdicação de suas atividades para poder dedicar-se a execução dos ecocardiogramas e acompanhamento dos pacientes.

À Dra. Gláucia Tabora Francisco, pela grande cooperação no laboratório de medicina nuclear e acompanhamento ambulatorial dos pacientes.

À Dra. Oáidia Adelina Nocetti Sermann, pela ativa participação no acompanhamento e tratamento dos pacientes do projeto.

Ao Dr. Lauro Ervilha e Dr. Luis Carlos Wollner, pela obstinação em realizar os exames de Cintilografia Miocárdica com qualidade.

Às anestesistas Caroline Biral Klas, Grazyna Maria Asenko da Costa e Cláudia Gissi, por terem buscado ao máximo o conforto e a segurança dos pacientes nas cirurgias realizadas.

Ao Dr. Carlos Eduardo Valesi pelo valioso auxílio na revisão da editoração.

Aos Especializandos, Secretárias, Enfermeiras, Técnicos de Laboratório e demais funcionários, pelo trabalho fundamental na assistência aos pacientes.

Procurando o bem para o nosso
semelhante, encontramos o nosso.

Platão

RESUMO

Desde o ano 1900, as doenças cardiovasculares são a principal causa de óbitos na população geral. A insuficiência cardíaca é reconhecida como um grave problema de saúde pública. Em cinco anos, metade dos pacientes com insuficiência cardíaca morrem. O transplante cardíaco é o tratamento de eleição nos casos de insuficiência cardíaca em estágio final. O número de doadores é insuficiente e 20% dos pacientes em fila de espera morrem a cada ano. A principal causa de desenvolvimento de insuficiência cardíaca é o infarto do miocárdio. O mecanismo pelo qual ocorre a insuficiência cardíaca após o infarto chama-se remodelamento ventricular. Para que ocorra a reversão do remodelamento ventricular, busca-se obter regeneração dos cardiomiócitos e desenvolvimento de neovascularização nas áreas de infarto. As células-tronco podem ser capazes de reverter o remodelamento e restabelecer a capacidade contrátil do miocárdio. Para realizar pesquisas para tratamento das miocardiopatias, criou-se o Centro de Pesquisas em Transplante de Células-Tronco. Definiram-se os protocolos para seleção de pacientes, coleta de medula óssea para obtenção de células-tronco, separação das células mononucleares, caracterização fenotípica e aplicação intramiocárdica das células-tronco. Iniciou-se a aplicação clínica em cinco pacientes portadores de miocardiopatia isquêmica. Houve um óbito entre os cinco pacientes tratados. Os pacientes apresentaram melhora funcional. O resultado da terapia celular sobre a contratilidade e perfusão segmentar foi heterogêneo. O Centro de Pesquisas em Transplante de Células-tronco foi criado e os protocolos definidos foram aplicados em cinco pacientes portadores de miocardiopatia isquêmica.

Palavras-chave: Laboratórios. Insuficiência cardíaca. Infarto do miocárdio. Transplante de células-tronco.

ABSTRACT

Since the year 1900, cardiovascular diseases are the leading cause of death in general population. Cardiac failure is known as a serious public health problem. In five years, half of patients with cardiac failure die. Cardiac transplantation is the elected treatment in patients with end-stage cardiac failure, but organs donors are not sufficient and 20% of patients die while on the waiting list every year. The main cause of cardiac failure development is the myocardial infarction. The mechanism that causes cardiac failure after myocardial infarction is called ventricular remodeling. To revert ventricular remodeling, cardiomyocyte regeneration and neovascularization of infarcted areas must occur. The stem cells might be able to revert remodeling and re-establish myocardium contractile capacity. In order to make researches to treat myocardial pathies, it was created the Stem Cells Transplantation Research Center. Protocols to patients selection, bone marrow aspiration to obtain stem cells, mononuclear cells separation, phenotypic characterization and intramyocardial stem cells injection were defined. Clinical application was done in patients with ischemic myocardial pathy. There was one death in five treated patients. Patients increased functional class. The cell therapy results demonstrated that contractile and segmental perfusion were heterogeneous. The Stem Cells Transplantation Research Center was created and the defined protocols were applied in five patients with ischemic myocardial pathy.

Keywords: Laboratories. Cardiac failure. Myocardial infarction. Stem cells transplantation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

QUADRO 1	- CLASSIFICAÇÃO FUNCIONAL DA NEW YORK HEART ASSOCIATION	16
QUADRO 2	- PERÍODOS DE REALIZAÇÃO DOS EXAMES COMPLEMENTARES	39
PLANTA 1	- PLANTA DO NOVO LABORATÓRIO DE CULTIVO CELULAR ..	41
QUADRO 3	- INFORMAÇÕES CLÍNICAS, CIRÚRGICAS E LABORATORIAIS DO PRIMEIRO PACIENTE OPERADO	45
GRÁFICO 1	- IMUNOFENOTIPAGEM DO ASPIRADO DE MEDULA ÓSSEA DO PRIMEIRO PACIENTE OPERADO.....	46
QUADRO 4	- INFORMAÇÕES CLÍNICAS, CIRÚRGICAS E LABORATORIAIS DO SEGUNDO PACIENTE OPERADO	49
GRÁFICO 2	- IMUNOFENOTIPAGEM DO ASPIRADO DE MEDULA ÓSSEA DO SEGUNDO PACIENTE OPERADO.....	50
QUADRO 5	- INFORMAÇÕES CLÍNICAS, CIRÚRGICAS E LABORATORIAIS DO TERCEIRO PACIENTE OPERADO	53
GRÁFICO 3	- IMUNOFENOTIPAGEM DO ASPIRADO DE MEDULA ÓSSEA DO TERCEIRO PACIENTE OPERADO.....	54
QUADRO 6	- INFORMAÇÕES CLÍNICAS, CIRÚRGICAS E LABORATORIAIS DO QUARTO PACIENTE OPERADO	57
GRÁFICO 4	- IMUNOFENOTIPAGEM DO ASPIRADO DE MEDULA ÓSSEA DO QUARTO PACIENTE OPERADO.....	58
QUADRO 7	- INFORMAÇÕES CLÍNICAS, CIRÚRGICAS E LABORATORIAIS DO QUINTO PACIENTE OPERADO	61
GRÁFICO 5	- IMUNOFENOTIPAGEM DO ASPIRADO DE MEDULA ÓSSEA DO QUINTO PACIENTE OPERADO.....	62

.LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- AVALIAÇÃO FUNCIONAL E PERFUSÃO MIOCÁRDICA DO PRIMEIRO PACIENTE OPERADO	47
TABELA 2	- AVALIAÇÃO FUNCIONAL E PERFUSÃO MIOCÁRDICA DO SEGUNDO PACIENTE OPERADO	51
TABELA 3	- AVALIAÇÃO FUNCIONAL E PERFUSÃO MIOCÁRDICA DO TERCEIRO PACIENTE OPERADO	55
TABELA 4	- AVALIAÇÃO FUNCIONAL E PERFUSÃO MIOCÁRDICA DO QUARTO PACIENTE OPERADO	59
TABELA 5	- AVALIAÇÃO FUNCIONAL E PERFUSÃO MIOCÁRDICA DO QUINTO PACIENTE OPERADO	63

LISTA DE SIGLAS

ABNT	- Associação Brasileira de Normas Técnicas
AHA	- American Heart Association
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APC	- Alophycerythrin
BANPESQ	- Banco de Pesquisas da Universidade Federal do Paraná
CD	- Cluster of Differentiation
CEC	- Circulação Extra-Corpórea
CONEP	- Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CPK	- Creatine Phosphokinase
CPK-Mb	- Creatine Phosphokinase Myocardium Band
EDTA	- Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
EV	- Endovenosa
FITC	- Fluorescein isothiocyanate
FUNPAR	- Fundação da Universidade Federal do Paraná
G-CSF	- Granulocyte-Colony Stimulating Factor
HC-UFPR	- Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná
IEMP	- Índice do Escore de Motilidade das Paredes
ISHAGE	- International Society Hematotherapy and Graft Engineering
MO	- Medula Óssea
NYHA	- New York Heart Association
PECy-5	- Phycoerythrin Cyano Dye 5
PVPI	- Polivinilpirrolidona-iodo
RPMI Medium	- Roswell Park Memorial Institute Medium
SPECT	- Single Photon Emission Computer Tomography
TAP	- Tempo de Atividade da Protrombina
TSH	- Tyreostimulant Hormon
T4	- Tetraiodotironina
UTI	- Unidade de Terapia Intensiva
VD	- Ventrículo Direito
VE	- Ventrículo Esquerdo
WMSI	- Wall Motion Score Index

LISTA DE ABREVIATURAS

Dr. - Doutor
Prof. - Professor

LISTA DE SÍMBOLOS

et al	E outros (as)
G	Força da Gravidade
F	French
°C	Graus Celsius
®	Marca Registrada
m ²	Metro quadrado
μl	Microlitro
μm	Micrômetro
ml	Mililitro
mW	Miliwatt
nm	Nanômetro
%	Porcento
UI	Unidades Internacionais

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 OBJETIVOS	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 A INSUFICIÊNCIA CARDÍACA	16
2.1.1 Panorama da Insuficiência Cardíaca no Brasil e no Mundo	17
2.1.2 O Remodelamento Ventricular	17
2.1.3 Tratamento Cirúrgico da Insuficiência Cardíaca	18
2.2 AS CÉLULAS-TRONCO	20
2.2.1 As Células-Tronco Embrionárias	20
2.2.2 As Células-Tronco Adultas	21
2.3 BASE EXPERIMENTAL DO TRATAMENTO DA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA ISQUÊMICA COM CÉLULAS-TRONCO	22
2.4 APLICAÇÃO CLÍNICA DAS CÉLULAS-TRONCO NA DOENÇA CARDÍACA ISQUÊMICA	24
2.5 USO DE CÉLULAS-TRONCO DA MEDULA ÓSSEA E REVASCULARIZAÇÃO CIRÚRGICA DO MIOCÁRDIO NO TRATAMENTO DA MIOCARDIOPATIA ISQUÊMICA	26
3 CASUÍSTICA E MÉTODO	28
3.1 IMPLANTAÇÃO DO CENTRO DE PESQUISAS EM CÉLULAS-TRONCO	28
3.1.1 Constituição da Equipe Multidisciplinar	28
3.1.2 Construção do Laboratório e Aquisição de Equipamentos	29
3.1.3 Criação dos Protocolos de Pesquisa	30
3.1.3.1 Protocolo para Seleção dos Pacientes	31
3.1.3.2 Protocolo para Coleta da Medula Óssea	32
3.1.3.3 Protocolo para Separação das Células Mononucleares	33
3.1.3.4 Protocolo de Marcadores para Identificação das Populações Celulares	35
3.1.3.5 Protocolo para Implante Celular Intramiocárdico	36
3.2 APLICAÇÃO CLÍNICA	37
4 RESULTADOS	40
4.1 IMPLANTAÇÃO DO CENTRO DE PESQUISAS EM CÉLULAS-TRONCO....	40
4.2 APLICAÇÃO CLÍNICA	42
4.2.1 O Primeiro Paciente Operado	44
4.2.2 O Segundo Paciente Operado	48
4.2.3 O Terceiro Paciente Operado	52
4.2.4 O Quarto Paciente Operado	56
4.2.5 O Quinto Paciente Operado	60
5 DISCUSSÃO	64
5.1 IMPLANTAÇÃO DO CENTRO DE PESQUISAS EM CÉLULAS-TRONCO....	64
5.2 APLICAÇÃO CLÍNICA	67
5.2.1 O Primeiro Paciente Operado	67
5.2.2 O Segundo Paciente Operado	68
5.2.3 O Terceiro Paciente Operado	70
5.2.4 O Quarto Paciente Operado	71
5.2.5 O Quinto Paciente Operado	71
5.3 ANÁLISE CRÍTICA DOS RESULTADOS	73

5.4 PERSPECTIVAS FUTURAS	74
6 CONCLUSÕES	75
REFERÊNCIAS	76
DOCUMENTOS CONSULTADOS	81
APÊNDICES	82
ANEXO	86

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares representam aproximadamente 35% do total de óbitos ocorridos nos Estados Unidos por ano. Desde o ano 1900, são a principal causa de óbitos na população geral (AHA, 2009). A miocardiopatia isquêmica é a maior causa de desenvolvimento de insuficiência cardíaca congestiva e apresenta uma mortalidade de 50% em cinco anos (SUTTON, 1990).

No Brasil, 34% dos óbitos ocorridos na população acima de 40 anos são devidos a doenças do aparelho circulatório. Dentre estes óbitos, 30% decorrem de doenças isquêmicas do coração. Nesta população acima dos 40 anos de idade, 23,5% dos internamentos realizados no Sistema Único de Saúde são motivados por doenças do aparelho circulatório (DATASUS, 2005).

Muitos avanços ocorreram na terapia medicamentosa, nos variados procedimentos de cardiologia intervencionista e na cirurgia cardíaca. Com o intuito de tratar as miocardiopatias, são terapias utilizadas: o transplante cardíaco, a cardiomioplastia com retalho de músculo grande dorsal, a correção da esfericidade do ventrículo esquerdo, a ressincronização ventricular e a assistência ventricular mecânica. Mesmo com todos estes avanços, ainda há pacientes não tratados ou convivendo com os inconvenientes de cada terapia (BRAILE, 2005).

O mecanismo pelo qual ocorre o desenvolvimento de insuficiência cardíaca após o infarto agudo do miocárdio é conhecido por remodelamento ventricular. Este fenômeno ocorre por alterações agudas e crônicas tanto na área infartada quanto no tecido não necrótico ao redor do infarto (PFEFFER, 1990).

Para que ocorra a reversão do remodelamento ventricular, busca-se obter regeneração dos cardiomiócitos e desenvolvimento de neovascularização na área infartada (JAIN, 2001).

Foi sugerido por estudos experimentais em animais que células-tronco derivadas da medula óssea e do sangue periférico podem, depois de purificadas e separadas *in vitro*, ser implantadas em áreas de fibrose do miocárdio consequente

ao infarto e levar à regeneração destas áreas, sendo capazes de recuperar parcialmente a capacidade contrátil (ORLIC, 2001).

Nesta pesquisa buscou-se adequar a estrutura do Hospital de Clínicas (HC) e Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná (UFPR) para que pudessem ocorrer as pesquisas com células-tronco nas miocardiopatias. Foram estabelecidos protocolos para selecionar pacientes, obter e identificar as células-tronco e implantar as células no miocárdio. A funcionalidade do Centro de Pesquisas foi observada com o início da aplicação clínica.

1.1 OBJETIVOS

Os objetivos desta dissertação foram:

- a) Implantar o Centro de Pesquisas em Transplante de Células-Tronco na Universidade Federal do Paraná;
- b) Definir os protocolos de pesquisa com células-tronco adultas de medula óssea;
- c) Iniciar a aplicação clínica das células-tronco para tratamento das miocardiopatias, primeiramente a isquêmica, demonstrando os resultados obtidos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

A Insuficiência Cardíaca é uma síndrome que pode ser definida como uma desordem estrutural ou funcional do coração que conduz à diminuição da capacidade de ejeção ventricular. Esta característica pode, ou não, estar associada a pressões de enchimento ventricular acima das fisiológicas (FELKER, 2003).

Os indícios de reconhecimento e tratamento da Insuficiência Cardíaca datam do final do século XVIII. Os trabalhos de William Withering, em Birmingham na Inglaterra, foram os primeiros a descrever o uso de digital no tratamento da síndrome que cursava com hidropsia e anasarca (KOUCHOUKOS, 2003).

Os pacientes portadores de insuficiência cardíaca podem, ou não, ser sintomáticos. Uma das classificações funcionais dos pacientes portadores desta síndrome foi formulada pela New York Heart Association (NYHA) em 1928. Esta classificação passou por atualizações e a que atualmente está em uso encontra-se descrita no QUADRO 1 (AHA, 1994).

Classe I. Pacientes com doença cardíaca, mas sem resultar em limitação da atividade física. Atividade física de rotina não causa fadiga, palpitação, dispnéia ou dor anginosa.
Classe II. Pacientes com doença cardíaca que resulta em limitação leve da atividade física. Pacientes confortáveis no repouso. Atividade física de rotina resulta em fadiga, palpitação dispnéia ou dor anginosa.
Classe III. Pacientes com doença cardíaca que resulta em limitação franca da atividade física. Pacientes confortáveis no repouso. Atividades menores que as de rotina causam fadiga, palpitação, dispnéia ou dor anginosa.
Classe IV. Pacientes com doença cardíaca que resulta na incapacidade de realizar qualquer atividade física sem que ocorra desconforto. Sintomas de insuficiência cardíaca ou de síndrome anginosa podem estar presentes inclusive no repouso. Se qualquer atividade física é realizada, o desconforto aumenta.

QUADRO 1 - CLASSIFICAÇÃO FUNCIONAL DA NEW YORK HEART ASSOCIATION

FONTE: AHA (1994)

2.1.1 Panorama da Insuficiência Cardíaca no Brasil e no Mundo

A Insuficiência Cardíaca é reconhecida como um grave problema de saúde pública. Em virtude do envelhecimento da população e da maior expectativa de vida, estima-se que cerca de 1 a 2% da população geral de países desenvolvidos seja portadora de Insuficiência Cardíaca (ROSSI NETO, 2004).

Mudanças nos hábitos alimentares, fumo, sedentarismo e obesidade são fatores de risco no desenvolvimento de Hipertensão Arterial Sistêmica, Diabetes e Doença Coronariana. A Insuficiência Cardíaca acaba estando no último estágio da evolução destas e de outras doenças (ROSSI NETO, 2004).

Mesmo sendo o Brasil um país em transição epidemiológica, os fatores de risco para o desenvolvimento da Insuficiência Cardíaca se assemelham aos do restante do mundo (PIEGAS, 2003).

A etiologia mais freqüente da Insuficiência Cardíaca no Brasil é a Miocardiopatia Isquêmica, correspondendo a 33% dos casos. A segunda etiologia mais freqüente é a Miocardiopatia Dilatada (26%), seguida pela etiologia Reumática (22%), Hipertensiva (7%) e pela Chagásica (6%) (MENDEZ, 2001).

2.1.2 O Remodelamento Ventricular

Imediatamente após o infarto do miocárdio, complexas alterações da arquitetura ventricular ocorrem tanto na zona infartada quanto em áreas não infartadas. Além da necrose das miofibrilas, há desintegração do colágeno interfibrilar, tornando a região mais propensa a deformações (ZORNOFF, 2002).

Diminuição da espessura e alongamento da parede ventricular infartada, dilatação e hipertrofia excêntrica de regiões ventriculares viáveis estão inevitavelmente presentes. As alterações geométricas e contráteis regionais do ventrículo esquerdo secundárias ao infarto alteram a eficiência mecânica do coração. Este conjunto de alterações é conhecido por Remodelamento Ventricular. A

função ventricular e o prognóstico do paciente estão diretamente relacionados à extensão deste remodelamento (PFEFFER, 1990).

No processo de remodelamento, cronicamente ocorrem alterações da expressão gênica, bioquímicas e estruturais que levam a disfunção ventricular progressiva (ZORNOFF, 2002).

Vários fatores podem influenciar a extensão e a evolução do remodelamento. Fatores mecânicos como a sobrecarga hemodinâmica (pressórica e volumétrica) e a extensão da área do infarto estão envolvidos (ZORNOFF, 2002).

Expressão de formas imaturas de proteínas contráteis, alterações da funcionalidade dos canais de cálcio, modificações na resposta local a estímulos adrenérgicos, desestruturação do citoesqueleto e da matriz extracelular estão profundamente envolvidos no processo de remodelamento (ZORNOFF, 2002).

2.1.3 O Tratamento Cirúrgico da Insuficiência Cardíaca

O Tratamento de eleição para a Insuficiência Cardíaca em estágio final e refratária ao tratamento clínico é o transplante cardíaco. Ele está indicado quando a estimativa de sobrevida e de qualidade de vida do paciente com Insuficiência Cardíaca é inferior àquela obtida com o transplante (KOUCHOUKOS, 2003).

Em virtude da carência de doadores, cerca de 20% dos pacientes em fila de espera para transplante cardíaco em países desenvolvidos morrem a cada ano (HOSENPUD, 2000).

Como alternativas ao transplante cardíaco, novas técnicas cirúrgicas e releituras de técnicas consagradas passaram a ser utilizadas (KOUCHOUKOS, 2003).

A Cirurgia de Revascularização do Miocárdio em pacientes com grave comprometimento da função ventricular esquerda é utilizada, contanto que a fração de ejeção seja superior a 20% (HAUSMANN, 1997; KOUCHOUKOS, 2003).

O Tratamento das Doenças Valvares, particularmente a Insuficiência Mitral, que decorrem do remodelamento ventricular e da dilatação do ventrículo esquerdo também é realizado. Pacientes com doença valvar Aórtica e com comprometimento importante da função ventricular esquerda podem ser tratados com a substituição valvar, obtendo melhora dos sintomas de insuficiência cardíaca (KOUCHOUKOS, 2003).

A Ventriculectomia Parcial Esquerda descrita por Batista (1997), baseada na lei de Laplace, busca diminuir a tensão na parede ventricular com a redução do raio do ventrículo esquerdo. A força de contração miocárdica é otimizada com a diminuição do estresse da parede ventricular. Com indicação em pacientes selecionados, esta técnica traz benefícios.

A exclusão de zonas de fibrose do miocárdio e a ressecção de aneurismas ventriculares podem ser utilizadas também com o intuito de restabelecer a geometria original elipsóide do ventrículo esquerdo. A exclusão destes segmentos não funcionantes acaba por otimizar a eficiência mecânica do ventrículo esquerdo (DOR, 1998).

Baseados no mesmo princípio de restaurar a forma original e ideal do ventrículo esquerdo, também foram desenvolvidas malhas artificiais que recobrem o coração e constringem o ventrículo esquerdo. Até o momento, poucos pacientes foram tratados com esta técnica (KONERTZ, 2001).

Sistemas de assistência mecânica também foram desenvolvidos. Eles podem auxiliar no aumento do débito cardíaco por: compressão direta dos ventrículos; como bombas circulatórias parcialmente implantáveis ou externas, de fluxo pulsátil ou contínuo; ou então por compressão de segmentos específicos da aorta torácica (OZ, 2002; FRANCO, 2001).

Também com o princípio de auxiliar a contração miocárdica externamente, a cardiomioplastia dinâmica utilizando um retalho do músculo grande dorsal pode ser utilizada. O retalho muscular envolve o coração e a sincronia da contração ocorre através de eletroestimulação com marcapasso artificial. O desenvolvimento de

arritmias ventriculares graves e a falência do músculo esquelético são problemas desta técnica, estando esta técnica em desuso (CHACHQUES, 1989; KOUCHOUKOS, 2003).

Recentemente foi demonstrado que os pacientes com insuficiência cardíaca e que apresentam bloqueio do ramo esquerdo do feixe de Hiss podem apresentar dissincronia de contração de regiões específicas do ventrículo esquerdo. Este fenômeno ocasiona movimento paradoxal do septo interventricular e piora da insuficiência mitral e do débito cardíaco. O prolongamento do intervalo PR, com contração atrial precoce, também pode estar relacionado com a regurgitação mitral e diminuição do volume de enchimento ventricular. O uso da estimulação elétrica biventricular busca corrigir esta dissincronia atrioventricular e interventricular, otimizando a função do VE (AURICCHIO, 2002; KOUCHOUKOS, 2003).

2.2 AS CÉLULAS-TRONCO

As células-tronco são células indiferenciadas que têm a capacidade de gerar uma linhagem de células altamente especializadas e, ao mesmo tempo, manterem-se no estado indiferenciado (MOTA, 2005; OETTGEN, 2006).

Conforme a forma de obtenção, podem ser divididas em dois tipos essenciais: as Células-Tronco Embrionárias e as Células-Tronco Adultas (OETTGEN, 2006).

2.2.1 As Células-Tronco Embrionárias

As Células-Tronco Embrionárias são obtidas através da aspiração da massa celular interna do blastocisto. Possuem a capacidade pluripotencial de se diferenciar em células de qualquer um dos três folhetos embrionários (endoderma, ectoderma e mesoderma). Incorporam também a capacidade praticamente infinita de autorrenovação (MOTA, 2005; OETTGEN, 2006).

A sua utilização implica no confronto de conceitos éticos e religiosos, visto

haver a destruição do embrião para que ocorra a sua extração para posterior utilização (MOTA, 2005).

Estudos com Células-Tronco Embrionárias humanas estão em curso no campo das experimentações *in vitro* e em animais. O maior potencial já sabido da ocorrência de problemas com o seu uso está na formação de teratomas. Estas células podem apresentar diferenciação desorganizada quando são submetidas a cultura (MOTA, 2005).

A utilização em humanos das células-tronco embrionárias implica inevitavelmente em imunossupressão ou uso em pacientes isogênicos (MCGLAVE, 2000; OETTGEN, 2006).

2.2.2 As Células-Tronco Adultas

As Células-Tronco Adultas em uso para terapia celular cardíaca são aquelas derivadas da Medula Óssea, os Mioblastos Esqueléticos e as Células-Tronco Cardíacas Residentes (OETTGEN, 2006).

Vários tipos de Células-Tronco podem ser isoladas da medula óssea, visto haver várias subpopulações com diferenciações específicas como: Células-Tronco Hematopoiéticas, Células Progenitoras Endoteliais e as Células-Tronco Mesenquimais (OETTGEN, 2006).

As Células-Tronco Hematopoiéticas expressam o marcador CD 34 (antígeno precursor hematopoiético). Estão em maior número e correspondem entre 1 a 2% da população celular da medula óssea. As células mononucleares expressam o marcador CD 45 (antígeno comum dos leucócitos). Entre estas células cerca de 4 a 5% são células-tronco CD 34 (VERFAILLIE, 2000).

As Células Progenitoras Endoteliais e as Células-Tronco Mesenquimais estão presentes em número muito menor, em torno de 0,01%. Necessitam de cultura e expansão *in vitro* para que seu efeito na terapia celular possa ser estudado (JAIN, 2005; VERFAILLIE, 2000; OETTGEN, 2006).

As Células Mioblásticas Esqueléticas são uma população de células progenitoras que podem ser isoladas de biópsias de músculos esqueléticos expandidas *in vitro*. Estas células, quando aplicadas no miocárdio, podem se diferenciar em células com miotúbulos contráteis. Elas também podem prover efeito parácrino sobre os cardiomiócitos, levando à melhora da função ventricular esquerda. Entretanto, existem evidências de que estas células podem não se acoplar eletricamente com os cardiomiócitos, levando ao desenvolvimento de arritmias ventriculares, na dependência do tipo de meio utilizado na sua cultura (CHIU, 1995; OETTGEN, 2006; MENASCHÉ, 2008).

Já as Células-Tronco Cardíacas Residentes podem ser obtidas por biópsias do miocárdio ou através de explantes cardíacos. Estas células possuem a capacidade de se diferenciarem em cardiomiócitos e, quando injetadas em áreas de infarto do miocárdio, podem melhorar a capacidade contrátil. Em virtude da dificuldade de obtenção e da necessidade de cultura prolongada *in vitro*, seu uso é restrito (OETTGEN, 2006).

2.3 BASE EXPERIMENTAL DO TRATAMENTO DA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA ISQUÊMICA COM CÉLULAS-TRONCO

Foi sugerido por estudos experimentais em animais que células-tronco derivadas da medula óssea e do sangue periférico podem, depois de purificadas e separadas *in vitro*, ser implantadas em áreas de fibrose do miocárdio consequente ao infarto e levar à regeneração destas áreas de miocárdio infartado (ORLIC, 2001).

No estudo pioneiro de Orlic (2001) foram utilizados ratos Wistar nos quais uma artéria coronária foi ligada cirurgicamente, reproduzindo um infarto agudo do miocárdio. Após cessar a contratilidade miocárdica na região irrigada pela coronária ligada, foi injetada na borda do tecido infartado solução de células-tronco de medula óssea marcadas. Nove dias após o implante, em análise histológica, havia miocárdio ocupando 68% da área infartada, em média.

Foi constatado por Fuchs (2001) que células-tronco de medula óssea também podem estimular o desenvolvimento de neovascularização em áreas de miocárdio isquêmico. Neste estudo foram utilizados 14 porcos (sete no grupo estudo e sete no grupo controle) que também foram submetidos a ligadura de uma artéria coronária, provocando o infarto agudo do miocárdio. Quatro semanas após o infarto, os animais do grupo estudo receberam células-tronco por via transmiocárdica. Dois meses após o implante, os porcos do grupo estudo obtiveram maior aumento do fluxo sanguíneo colateral e aumento da contratilidade ventricular esquerda quando comparados ao grupo controle.

Kawamoto (2001) e Kocher (2001) obtiveram resultados positivos em experimentos em animais com relação a evidências de neovascularização das áreas infartadas.

Kawamoto demonstrou que Células Progenitoras Endoteliais obtidas do sangue periférico de humanos migram para áreas de infarto agudo do miocárdio de ratos, quando injetadas na circulação periférica. Apesar do pequeno número de animais neste experimento, ele concluiu ter havido neovascularização e melhora da função contrátil do ventrículo esquerdo.

Kocher também demonstrou haver angiogênese, vasculogênese e retardo do remodelamento ventricular quando utilizou Células Progenitoras Endoteliais (hemangioblastos) no tratamento de áreas ventriculares isquêmicas.

Foi possível provar com análises imuno-histoquímicas o desenvolvimento de neovascularização e repopulação de cardiomiócitos. Constatou-se também melhora da função ventricular esquerda medida pela Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo por ecocardiografia (ORLIC, 2001 e FUCHS, 2001).

2.4 APLICAÇÃO CLÍNICA DAS CÉLULAS-TRONCO NA DOENÇA CARDÍACA ISQUÊMICA

A utilização desta técnica em humanos foi descrita inicialmente com o estudo pioneiro de Menasché na França. Em um paciente foram implantadas células mioblásticas de músculos esqueléticos em uma área de infarto do miocárdio durante a cirurgia de revascularização do miocárdio. Neste primeiro caso, não houve complicações e o paciente obteve melhora tanto da função ventricular esquerda quanto da classe funcional da insuficiência cardíaca (MENASCHE, 2001).

Dois anos após este estudo, Menasché publica uma série de dez casos (não randomizados e não controlados) com este tipo celular. Ele obteve desenvolvimento de arritmias ventriculares do tipo taquicardia ventricular sustentada em quatro pacientes. Onze meses após o implante das células durante a cirurgia de revascularização do miocárdio, todos os pacientes obtiveram melhora da classe funcional pela New York Heart Association e da função ventricular esquerda pela ecocardiografia. Houve um óbito após um ano do estudo como consequência de um Acidente Vascular Encefálico Isquêmico. Este episódio não foi relacionado ao implante celular segundo os autores (MENASCHE, 2003).

Além da via intramiocárdica transoperatória, foi utilizada a via intracoronária por cateterismo percutâneo pioneiramente por Strauer (2002), seguido por Assmus (2002), Chen (2004) e por Wollert (2004).

Strauer (2002) realizou estudo com 20 pacientes: dez no grupo Estudo e dez em um grupo Controle Histórico. Foram incluídos pacientes na fase aguda do infarto do miocárdio submetidos a angioplastia transluminal coronariana e implante de células-tronco de medula óssea. Os resultados foram obtidos após três meses do implante celular com a realização do ecocardiograma bidimensional e cintilografia. Não houve relato de complicações e houve melhora da contratilidade da área infartada, melhora da perfusão miocárdica, diminuição do volume sistólico final e diminuição da área do infarto (STRAUER, 2002).

Assmus (2002) comparou em um estudo piloto não randomizado 20 pacientes tratados na fase aguda do infarto do miocárdio submetidos a angioplastia transluminal coronariana. Dez pacientes receberam, após a angioplastia, solução de células-tronco de medula óssea e dez receberam células-tronco de sangue periférico. Após seguimento de quatro meses, houve melhora da fração de ejeção do ventrículo esquerdo, contratilidade segmentar e diminuição dos volumes sistólicos e diastólicos finais do ventrículo esquerdo avaliados por ecocardiograma em ambos os grupos. Não foram documentados efeitos adversos.

Chen (2004) conduziu estudo randomizado controlado por placebo e duplo cego distribuindo 69 pacientes em grupos estudo e controle. Pacientes encontravam-se na fase aguda do infarto do miocárdio e foram randomizados para receber células-tronco de medula óssea ou solução salina após a angioplastia transluminal coronariana. Após o seguimento de três a seis meses, houve melhora da fração de ejeção do ventrículo esquerdo, perfusão segmentar e contratilidade segmentar tanto no grupo estudo quanto no grupo controle, mas a melhora foi maior no grupo estudo. Não houve relatos de efeitos adversos.

Wollert (2004) conduziu estudo randomizado controlado por placebo em 60 pacientes. Trinta pacientes receberam o tratamento tradicional (angioplastia transluminal coronariana) mais placebo. Os outros 30 pacientes receberam a angioplastia e o tratamento novo (células-tronco da medula óssea). Os pacientes estavam na fase aguda do infarto do miocárdio e o seguimento foi de seis meses. Houve melhora da fração de ejeção do ventrículo esquerdo nos dois grupos, mas esta melhora foi mais acentuada em relação aos exames pré-operatórios no grupo estudo. Também não houve efeitos adversos documentados.

O implante de Células-Tronco pela via endomiocárdica guiada por mapeamento eletromecânico do ventrículo esquerdo, também por cateterismo percutâneo, foi inicialmente publicada em 2003 por Smiths, Tse e Perin.

Perin (2003) realizou um estudo prospectivo não randomizado com 21 pacientes portadores de miocardiopatia isquêmica. Utilizou células-tronco autólogas

de medula óssea. Realizou 15 injeções endocárdicas em áreas de miocárdio hibernante, diagnosticadas pelo cateter Noga. Obteve melhora da fração de ejeção, diminuição do diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo e melhora da classe funcional quando comparado ao grupo controle. Houve um óbito em cada grupo no período de acompanhamento por morte súbita.

Foi também recentemente estabelecido melhora da reserva de fluxo coronário (indicativo de normalização do fluxo sanguíneo na microcirculação coronariana). Para esta constatação utilizou-se Doppler Intracoronário em pacientes que receberam células-tronco de medula óssea na fase aguda do infarto. A via de aplicação de Células-Tronco foi a intracoronariana por cateterismo percutâneo (SCHÄCHINGER, 2006).

2.5 USO DE CÉLULAS-TRONCO DE MEDULA ÓSSEA E REVASCULARIZAÇÃO CIRÚRGICA DO MIOCÁRDIO NO TRATAMENTO DA MIOCARDIOPATIA ISQUÊMICA

A cirurgia de revascularização do miocárdio é o procedimento utilizado nos casos de doença coronariana que não possa ser tratada clinicamente ou que a angioplastia transluminal coronariana traga resultados menos efetivos (AHA, 2004).

O grande problema é que a revascularização do miocárdio não impede a evolução do remodelamento ventricular na região que sofreu o infarto e que não exista sobre esta área artéria coronária que possa receber enxerto cirúrgico. Sobre esta região não há, até o momento, procedimento intervencionista que possa trazer benefícios (PFEFFER, 1990; KOUCHOUKOS, 2003).

A utilização de células-tronco de medula óssea por via intramiocárdica durante a cirurgia de revascularização do miocárdio realizada após a fase aguda do infarto foi realizada primeiramente por Hamano (2001). Foram estudados cinco pacientes consecutivos. Estes pacientes possuíam doença coronariana com indicação cirúrgica. Os pacientes também possuíam uma área do miocárdio que

sofreu infarto, mas sobre esta região, não havia artéria coronária que pudesse receber um enxerto. Neste segmento ventricular, durante a cirurgia de revascularização do miocárdio, foram implantadas células-tronco de medula óssea. O seguimento foi de um ano e, como resultado, três dos cinco pacientes estudados obtiveram melhora da perfusão miocárdica da área que recebeu as células-tronco, avaliada por cintilografia.

Stamm (2003) estudou 12 pacientes consecutivos com implante de células-tronco de medula óssea durante a cirurgia de revascularização do miocárdio. Ele obteve melhora da função ventricular esquerda (Fração de Ejeção) medida por ecocardiografia e por Tomografia por Emissão de Fóton Simples (SPECT) em oito dos 12 pacientes e melhor perfusão miocárdica em dez dos 12 pacientes avaliados por cintilografia.

Resultados semelhantes também foram obtidos por Ozbaran (2004). Ele comprovou melhora da classe funcional de insuficiência cardíaca (NYHA) e aumento da fração de ejeção do ventrículo esquerdo por ecocardiografia e SPECT. Foi estudada uma série de seis pacientes que receberam células-tronco do sangue periférico mobilizadas da medula óssea com o uso de G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor). O implante celular foi concomitante à cirurgia de revascularização do miocárdio.

3 CASUÍSTICA E MÉTODO

A implantação do Centro de Pesquisas em Transplante de Células Tronco foi dividida em três etapas que ocorreram concomitantemente: identificação e constituição da equipe multidisciplinar; construção do laboratório e aquisição de equipamentos para manipulação e preparo das Células-Tronco; criação dos Protocolos de Pesquisa.

Para o início da Aplicação Clínica para o tratamento das Miocardiopatias, selecionaram-se pacientes portadores de Miocardiopatia Isquêmica com indicação de tratamento cirúrgico de revascularização do miocárdio. Para este grupo de pacientes foram desenvolvidos protocolos clínicos específicos.

3.1 IMPLANTAÇÃO DO CENTRO DE PESQUISAS EM CÉLULAS-TRONCO

3.1.1 Constituição da Equipe Multidisciplinar

Para a criação e implantação do Centro de Pesquisas em Transplante de Células-Tronco foi necessária a integração de diversas áreas estanques do Hospital de Clínicas (HC) e do Setor de Ciências da Saúde da UFPR.

A equipe médica das disciplinas de Cirurgia Torácica e Cardiovascular, Cardiologia, Hematologia e Anestesiologia foi responsável pela identificação dos procedimentos clínicos necessários para as pesquisas. Foram discutidas as formas de seleção dos pacientes para os estudos, os exames pré e pós-operatórios necessários, a forma de implante das células-tronco, a forma de obtenção da medula óssea e o tipo de anestesia que seria utilizado.

A equipe do Laboratório de Análises Clínicas, divisão de Cultura Celular, foi responsável pela definição dos equipamentos e materiais de consumo necessários para o preparo das células-tronco. Também foram definidas as características do espaço físico para a construção do laboratório.

O grupo de engenharia e administrativo (Reitoria, Setor de Ciências da Saúde, Hospital de Clínicas e FUNPAR) foi responsável pela definição do espaço físico (dimensões e localização), características técnicas do laboratório de preparo das células-tronco e gestão dos recursos financeiros.

3.1.2 Construção do Laboratório e Aquisição de Equipamentos

Tendo como base a literatura científica, as resoluções e normas técnicas publicadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pela Agência Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), estabeleceram-se os procedimentos que teriam que ser realizados para caracterizar, construir e equipar o laboratório.

A construção contemplou uma Sala Limpa com uma antessala para paramentação. Esta sala possui características que minimizam a possibilidade de contaminação de tecidos biológicos. Essencialmente é caracterizada por um ambiente fechado no qual a pressão atmosférica no seu interior é ligeiramente superior ao ambiente externo. Isto é conseguido através do sistema de climatização. Assim sendo, o ar da Sala Limpa só é renovado através do climatizador que possui filtros bacteriológicos (BRASIL, 2004; ABNT, 2005).

Equipamentos foram adquiridos para que pudesse ser manipulado o aspirado de medula óssea com o mínimo risco de contaminação. Bancada com fluxo laminar vertical, sistema de climatização da sala com filtro de micropartículas e biológico e sistema de esterilização com Raios Ultravioleta foram adquiridos e instalados. Balança digital com precisão de centigramas, centrífugas de bancada e citológica, freezer, refrigerador, pipetadores e seladora de plásticos também foram adquiridos e instalados.

3.1.3 Criação dos Protocolos de Pesquisa

Os Protocolos de pesquisa foram desenvolvidos segundo as publicações dos centros mundiais que realizaram pioneiramente este tipo de procedimento. Houve necessidade de adequação destes protocolos para a população atendida no Hospital de Clínicas.

Estabeleceram-se os protocolos: seleção dos pacientes, coleta de medula óssea para obtenção das células-tronco, separação das células mononucleares, marcadores para identificação das populações celulares e implante celular intramiocárdico.

O Protocolo de Seleção dos Pacientes foi desenvolvido pela disciplina de Cardiologia e Cirurgia Torácica e Cardiovascular do HC-UFPR em conjunto com o Serviço de Métodos Cardiológicos. Foi necessário definir como os pacientes do Estado do Paraná chegariam ao HC-UFPR pelo Sistema Único de Saúde.

O Protocolo de Coleta da Medula Óssea foi o mesmo utilizado pelo Serviço de Transplante de Medula Óssea do HC-UFPR, que há 30 anos realiza este procedimento para o tratamento das doenças hematológicas. Com relação aos volumes aspirados, baseou-se nos métodos específicos sobre o uso de células tronco de medula óssea para tratamento das miocardiopatias (RYAN, 2000; PERIN, 2003; STRAUER 2002; JAIN, 2005; VILLAS-BOAS, 2006).

Tanto o Protocolo para Separação das Células Mononucleares quanto o de Identificação das Populações Celulares com a definição dos antígenos de superfície a serem marcados foram formulados segundo as publicações dos centros pioneiros na pesquisa com células-tronco de medula óssea para tratamento de doenças do coração. Os materiais utilizados neste protocolo estão listados no Anexo (BÖYUM, 1968; FRESHNEY, 1987; SUTHERLAND, 1996; STRAUER, 2002; PERIN, 2003; STAMM, 2003; STAMM, 2004; SAM, 2005; HAIDER, 2005; VILLAS-BOAS, 2006; ASSMUS, 2006; SEEGER, 2007).

O Protocolo de Implante Intramiocárdico Transoperatório foi criado com base

nas pesquisas que utilizaram esta via de implante como sendo a de eleição para tratamento de pacientes que necessitam da cirurgia de revascularização do miocárdio (HAMANO, 2001; STAMM, 2004; OZBARAN, 2004).

3.1.3.1 Protocolo para Seleção de Pacientes

- Os pacientes para estudo são encaminhados para o Hospital de Clínicas pelo seu próprio Cardiologista através da Central de Marcação de Consultas do Sistema Único de Saúde;
- Realiza-se uma primeira consulta no Ambulatório de Cardiologia – Triagem do HC-UFPR onde são conferidos os critérios de Inclusão e Exclusão do estudo; caso o paciente esteja internado no HC-UFPR, é solicitada a avaliação pela equipe de Cirurgia Cardiovascular;
- Encaminha-se o paciente para o Ambulatório de Células-Tronco onde são solicitadas as avaliações pré-operatórias: Classe Funcional (NYHA) por anamnese, Radiografia de tórax, Eletrocardiograma de 12 derivações, Cineangiocoronariografia, e os seguintes exames laboratoriais de análises clínicas: Hemograma, Sódio, Potássio, Cálcio, TAP (Tempo de Ativação da Protrombina), Uréia, Creatinina sérica, Glicemia de jejum, CPK (Creatine Phosphokinase), CPK-Mb (Creatine Phosphokinase Myocardial Band), TSH (Tyreostimulant Hormon) e T4 (Tetraiodotironina) livre;
- Solicitam-se os exames de avaliação da nova técnica: Ecocardiograma Bidimensional com avaliação da contratilidade segmentar, fração de ejeção do VE pelo método de Simpson, quantificação do WMSI – IEMP (Wall Motion Score Índice – Índice do Escore de Motilidade das Paredes) e a Cintilografia Miocárdica (SPECT);
- Explicação e Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
- Programa-se a Data da Cirurgia com a Autorização para Internação Hospitalar já auditada.

3.1.3.2 Protocolo para Coleta da Medula Óssea

- O Paciente deve permanecer em jejum por pelo menos seis horas;
- A Coleta deve ser realizada no Centro Cirúrgico do HC-UFPR;
- Admissão do paciente na Sala de Preparo do Centro Cirúrgico pela equipe de enfermagem;
- Conferência do jejum e aferição dos dados vitais. Se adequados, encaminhar o paciente para a Sala de Cirurgia;
- Paciente posto em decúbito dorsal;
- Punção de um acesso venoso periférico com Abocath® 16;
- Paciente posto em posição sentada, com as pernas dispostas ao lado direito da mesa cirúrgica;
- Antissepsia da região lombar;
- Anestesia local em topografia de 4ª ou 5ª vértebras lombares;
- Anestesia peridural conforme técnica habitual;
- Monitorização contínua de Eletrocardiografia, Oximetria de Pulso e Pressão arterial não invasiva;
- Sedação com midazolam EV;
- Coleta de 30 ml de sangue periférico em tubos sem anticoagulante para obtenção de soro autólogo;
- Paciente posto em decúbito ventral com coxim subabdominal;
- Degermação com PVPI da região lombar até o sacro, estendendo-se lateralmente aos flancos;
- Paramentação asséptica da equipe cirúrgica;
- Antissepsia tópica com PVPI e colocação de campos estéreis;
- Punções da crista ilíaca com agulha descartável específica para medula óssea acoplada à seringa plástica de 20 ml. Cada punção deve ser realizada em região distinta da crista ilíaca e obter 5 ml de medula óssea por punção;

- Realizar 20 punções (dez em cada crista ilíaca) para obter o total de 100 ml de medula óssea;
- Entre cada punção, lavar a seringa e a agulha com solução de Heparina Sódica a 10 UI/ml;
- A medula óssea aspirada deve ser transferida para frascos plásticos de 50 ml que devem conter 10 ml do meio RPMI 1640[®] com 50 UI/ml de Heparina Sódica;
- Em cada frasco adiciona-se 10 ml de medula óssea (deve ser mantida a proporção de 10ml de medula óssea e 10 ml de meio);
- No caso de coleta em sistema fechado (com bolsa de coleta), adicionar 100 ml do meio RPMI a bolsa. Acrescentar 5000 UI de Heparina Sódica. Completar com medula óssea até atingir o volume total de 200 ml (meio + medula óssea);
- Finalizadas as punções, realizar curativo compressivo com gazes e esparadrapo;
- Encaminhar o paciente para a sala de recuperação pós-anestésica;
- Encaminhar os frascos ou a bolsa de coleta em caixa térmica para o laboratório de cultura celular.

3.1.3.3 Protocolo para Separação das Células Mononucleares

- Em câmara de fluxo laminar, transferir todo o volume coletado nos dez frascos (100ml de medula óssea, 100 ml do meio RPMI 1640[®] e 50 UI/ml de heparina sódica) para um frasco de 400 ml;
- Filtrar a solução para a retirada de coágulos e espículas ósseas nos casos de coleta aberta. No caso de coleta fechada, esta etapa é dispensada, por já haver a filtragem na bolsa de coleta;
- Coletar amostras da solução para controle microbiológico (1000 µl) em frascos de hemocultura, contagem de células (300 µl), análise de viabilidade

celular (300 μ l) e para a caracterização da população celular por citometria de fluxo (500 μ l);

- Adicionar o meio RPMI 1640[®] até obter uma diluição final de 1:2 (Medula Óssea : Meio);
- Separar os mononucleares utilizando gradiente de densidade 1.077 de Ficoll-Hypaque[®]. Em tubos de 50 ml contendo 10 ml de Ficoll-Hypaque[®], adicionar lentamente 25 ml da medula óssea diluída na razão 1:2 em RPMI (aproximadamente 16 tubos). A concentração celular da medula óssea não deve ser superior a 1×10^7 células/ml de Ficoll-Hypaque[®] e a razão entre a medula óssea diluída e o Ficoll deve ser de no máximo 3:1;
- Centrifugar durante 30 minutos a 400 G, sem freio, entre 18 e 22° C;
- Utilizando pipetas descartáveis de 10 ml retirar o anel de mononucleares que se forma na interfase entre o Ficoll[®] e o plasma diluído. Transferir os anéis de mononucleares para tubos de 50 ml (um anel em cada tubo). Adicionar RPMI a cada tubo, até o volume final de 35 a 40 ml;
- Centrifugar durante 10 minutos a 400 G, entre 18 e 22° C, sem freio para maximizar a remoção de plaquetas;
- Lavar os anéis de mononucleares com RPMI 1640[®], reduzindo-se o número de tubos (aproximadamente oito tubos);
- Lavar os anéis de mononucleares por mais uma vez com solução salina suplementada com 10% de soro autólogo (4 ml de soro + 36 ml de solução salina), reduzindo-se o número de tubos (2 tubos);
- Centrifugar durante 10 minutos a 400 G, entre 18 e 22 ° C;
- Ressuspender o fundo do frasco em 10 ml de solução salina suplementada com 20% de soro autólogo. (Preparar 20 ml de soro autólogo, caso seja necessário elevar o volume final para 20 ml: 4 ml soro + 16 ml de solução salina);
- Contar as células em contador automático de células e verificar a viabilidade celular com azul de Tripano em câmara de Neubauer;

- Filtrar a suspensão celular usando filtros de Nylon[®] de 100 µm (Cell strainer) para retirar possíveis grumos;
- Ajustar o volume final em solução salina suplementada com 20% de soro autólogo para atingir 8 ml de solução de 150 a 500 X 10⁶ células mononucleares, então distribuídas em oito seringas contendo 1 ml de solução cada;
- Coletar amostras para controle microbiológico (1000 µl), imunofenotipagem (500 µl) e contagem celular (300 µl).

3.1.3.4 Protocolo de Marcadores para Identificação das Populações Celulares

- Utilização de 500 µl do aspirado da medula óssea e 500 µl da solução final de células mononucleares em frasco com anticoagulante EDTA;
- Painel de anticorpos monoclonais e de calibração para imunofenotipagem no citômetro de fluxo:
 - CD45 ligados ao isotiocianato de fluoresceína (FITC);
 - CD34 ligados a aloficoeritrina (APC);
 - CD45 ligado a ficoeritrina-cianina 5 (PECy-5);
 - Anticorpos Becton Dickinson (BD Biosciences, San Jose, California, EUA).
- Utilizado o citômetro de fluxo de quatro cores FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, California, EUA). Aquisição das imagens feita através do programa CELLQuest[®]. Análise gráfica realizada pelo programa Paint-A Gate Pro (BD Biosciences, San Jose, California, EUA).

3.1.3.5 Protocolo para Implante Celular Intramiocárdico

- Punciona-se dois acessos venosos periféricos com Abocath[®] 14 ou 16 e punciona-se a artéria radial com Abocath[®] 18 para aferição contínua da pressão arterial;
- Induz-se a anestesia geral habitual;
- Punciona-se um acesso venoso central em veia jugular interna ou veia subclávia com cateter de duplo lúmen 7 F;
- Realiza-se a sondagem vesical de demora com sonda de silicone número 14 ou 16;
- Procede-se a degermação com PVPI do Tórax, pescoço, abdome, membros inferiores e região genital;
- Antissepsia tópica com PVPI e colocação de campos estéreis;
- Realiza-se a esternotomia mediana;
- Dissecção do(s) enxerto(s) arterial(is) ou venoso(s) conforme o número de coronárias a ser revascularizado;
- Prepara-se o coração para a instituição da circulação extracorpórea (CEC);
- Realizam-se as anastomoses distais (enxerto-coronária) por técnica convencional;
- Tendo já sido realizada a revascularização do miocárdio, ainda em circulação extracorpórea e com o coração batendo, o cirurgião recebe oito seringas com agulha (13 x 0,45 mm) contendo 1 ml de solução de células-tronco;
- São realizadas injeções sucessivas de 0,2 ml da solução de células-tronco equitativamente distribuídas na zona de transição entre a área acinética ou hipocinética do ventrículo esquerdo e o miocárdio sadio - local diferente de onde foi(ram) anastomosado(s) o(s) enxerto(s) arterial(is) ou venoso(s);
- Descontinua-se a circulação extracorpórea;
- Revisa-se rigorosamente a hemostasia;

- Procedem-se a drenagem tubular do mediastino e pleuras caso tenham sido abertas;
- Mantém-se dois fios de marca-passo temporários epimiocárdicos em ventrículo direito (VD);
- Realiza-se a síntese dos planos abertos e aplicam-se os curativos estéreis nas incisões cirúrgicas;
- O paciente é encaminhado ainda sob efeito anestésico para a Unidade de Terapia Intensiva;
- O paciente deve permanecer no mínimo um dia em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) e em torno de sete dias em enfermaria conforme sua recuperação.

3.2 APLICAÇÃO CLÍNICA

Este estudo para aplicação clínica das células-tronco de medula óssea para tratamento das miocardiopatias foi aprovado em reunião departamental, registrado no BANPESQ sob número 2006019148 e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR (ANEXO).

Os pesquisadores envolvidos neste estudo seguiram a legislação brasileira para a pesquisa que envolva seres humanos e cumpriram na sua integralidade a Resolução 196/96. Assegurou-se neste estudo que o caráter anônimo dos pacientes foi mantido e que suas identidades estão protegidas de terceiros não autorizados. Todos os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (BRASIL, 1996).

Nesta fase, tratou-se de um estudo descritivo para aplicação clínica da metodologia proposta no centro de pesquisas criado e demonstração dos resultados obtidos.

Foram recrutados para o estudo cinco pacientes adultos consecutivos portadores de miocardiopatia isquêmica com indicação formal de cirurgia de

revascularização do miocárdio conforme as diretrizes da American Heart Association (AHA, 2004). Pacientes originados dos ambulatórios de Cardiologia e de Cirurgia Torácica e Cardiovascular do HC – UFPR e que cumpriram todos os critérios de inclusão no estudo.

Como critérios de inclusão foram definidos: idade acima de 18 anos; apresentar-se lúcido e capaz; apresentar doença coronariana de indicação cirúrgica; apresentar área de acinesia ou hipocinesia do ventrículo esquerdo e que não tenha sobre esta região artéria coronária tratável; insuficiência cardíaca definida como fração de ejeção pelo ecocardiograma bidimensional abaixo de 35%.

Os critérios para exclusão do estudo foram: presença de doença crônica reumatológica; neoplasia maligna diagnosticada; episódios de hemorragia digestiva; insuficiência renal aguda e crônica; ter sido submetido à transfusão sanguínea nos últimos seis meses; ter apresentado infarto agudo do miocárdio nos últimos três meses; presença de qualquer doença que possa diminuir a expectativa de vida em curto prazo; uso conhecido de substâncias entorpecentes; presença de doença cardíaca congênita ou doença valvar cardíaca moderada ou grave.

Foram realizadas avaliações clínicas e laboratoriais pré-operatórias conforme o Protocolo de Seleção de Pacientes. Foram obtidos a Classe Funcional de Insuficiência Cardíaca (NYHA) por anamnese, Radiografia de tórax, Eletrocardiograma de 12 derivações, Cineangiocoronariografia, e os seguintes exames laboratoriais de análises clínicas: Hemograma, Sódio, Potássio, Cálcio, TAP, Uréia, Creatinina, Glicemia de jejum, CPK, CPK-Mb, TSH e T4 livre. Estes exames de análises clínicas também foram realizados no quinto dia de pós-operatório.

Para avaliação da contratilidade segmentar e da função global do ventrículo esquerdo, foi realizado o ecocardiograma bidimensional com o aparelho HP Sonos 5500[®]. A Cintilografia Miocárdica do tipo SPECT foi utilizada para avaliação da perfusão miocárdica.

Com o ecocardiograma foram avaliadas as variáveis: Fração de Ejeção do VE pelo método bidimensional Modificado de Simpson (em porcentagem) e contratilidade segmentar. Quanto à contratilidade segmentar, definiu-se como: 1-Normal, 2-Hipocinético, 3-Acinético e 4-Discinético. A média simples da contratilidade segmentar dos 17 segmentos do ventrículo esquerdo fornece o Wall Motion Score Index (WMSI – IEMP). Segundo este índice, quanto mais próximo a “um” ele for, melhor a contratilidade ventricular (FOLLAND, 1979; SHILLER, 1989).

Com a SPECT foi avaliada a reversibilidade de defeito de captação do marcador Tálío 201, indicativo da perfusão miocárdica em cada segmento do ventrículo esquerdo. Foram realizadas injeções em repouso, esforço e redistribuição de 24 horas. Obtiveram-se como resultados áreas normais, isquêmicas ou com fibrose (SAHA, 1996).

A época da realização dos exames está descrita no QUADRO 2.

PRÉ-OPERATÓRIO	5 DIAS APÓS A CIRURGIA	TRÊS MESES APÓS A CIRURGIA
Classe funcional NYHA	Laboratoriais de Análises Clínicas	Classe funcional NYHA
Laboratoriais de Análises Clínicas	Radiografia de Tórax	Ecocardiograma
Radiografia de Tórax	Eletrocardiograma	SPECT
Eletrocardiograma		
Cateterismo Cardíaco		
Ecocardiograma		
SPECT		

QUADRO 2 - PERÍODOS DE REALIZAÇÃO DOS EXAMES COMPLEMENTARES.

FONTE: O autor (2009)

4 RESULTADOS

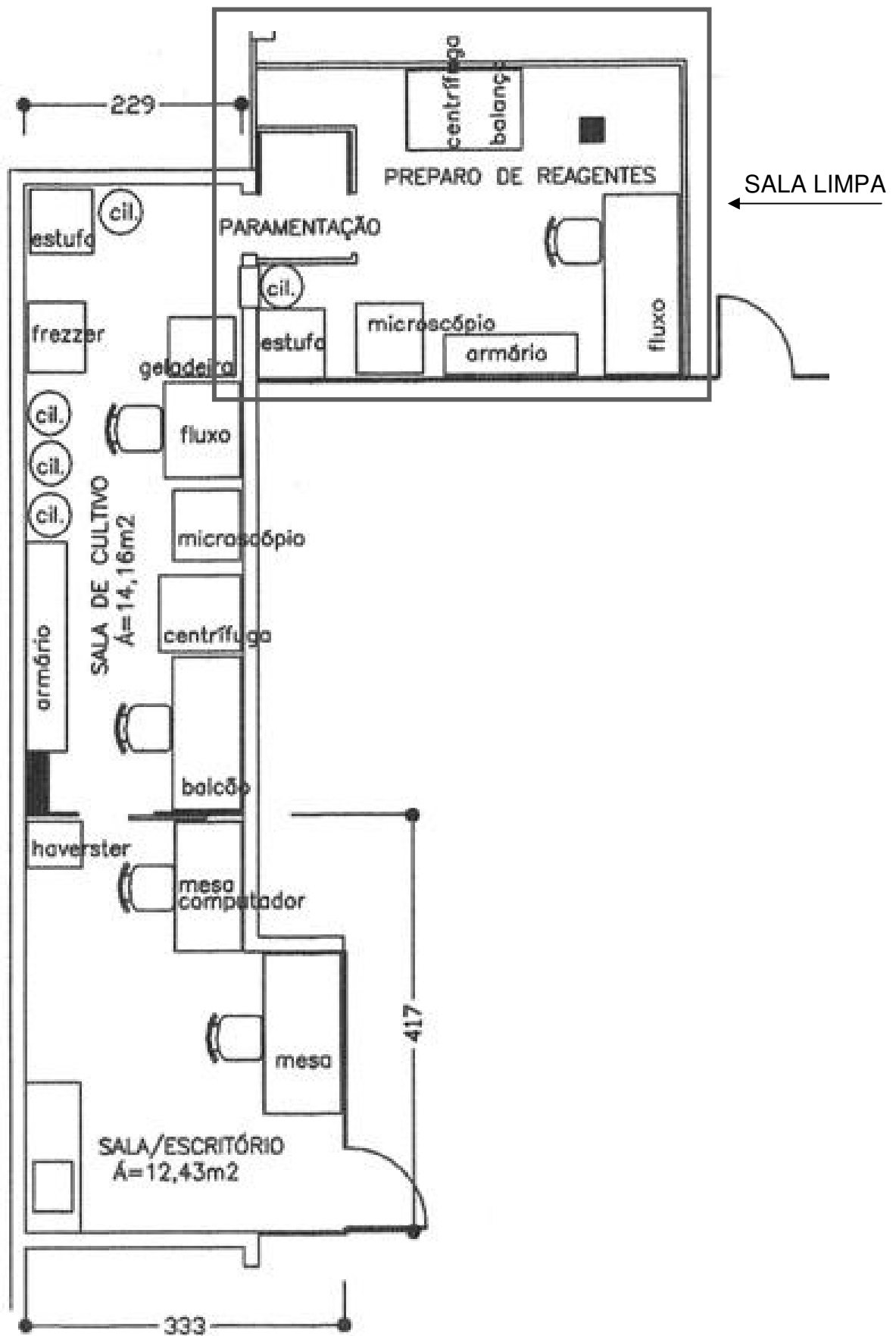
4.1 IMPLANTAÇÃO DO CENTRO DE PESQUISAS EM CÉLULAS-TRONCO

A equipe multidisciplinar constituída para a criação, implantação e atuação no Centro de Pesquisas encontra-se descrita nos Apêndices.

O início da construção da Sala Limpa com adequação do Laboratório de Cultura Celular foi em Junho de 2006 após extensa negociação entre o Setor de Ciências da Saúde, Reitoria e Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná. Sua conclusão foi em Junho de 2007.

Este novo Laboratório de Cultura Celular passou a conter uma Sala Limpa independente e uma antessala para paramentação. A Sala Limpa contém uma cabina para manipulação de tecidos biológicos com fluxo laminar vertical, uma centrífuga digital com temperatura controlada, uma balança de precisão, um sistema de ar climatizado com filtro de micropartículas e microbiológico, um sistema de esterilização por radiação ultravioleta e pipetadores automáticos. Nesta sala encontram-se também os materiais de consumo como pipetas, ponteiras para as pipetas, filtros de partículas, tubos para centrífuga e as soluções para separação celular. Anexo à Sala Limpa encontra-se a bancada com microscopia ótica para realização das análises de viabilidade celular (PLANTA 1).

Anexo a este laboratório, encontra-se o Laboratório de Imunofenotipagem, onde são feitas as caracterizações das populações celulares com o Citômetro de Fluxo FACSCalibur® com Laser de Argônio. Neste laboratório foram instaladas a nova centrífuga de bancada não refrigerada e a citocentrífuga.



PLANTA 1. PLANTA DO NOVO LABORATÓRIO DE CULTIVO CELULAR.

Fonte: HC-UFPR (2006)

4.2 APLICAÇÃO CLÍNICA

Foram tratados cinco pacientes consecutivos portadores de miocardiopatia isquêmica submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio. Todos os pacientes receberam o tratamento tradicional de cirurgia de revascularização do miocárdio com o implante de pelo menos um enxerto arterial ou venoso, com o uso de Circulação Extracorpórea.

Os pacientes na manhã do dia da operação tiveram aspirados 100 ml de medula óssea da crista íliaca posterior sob anestesia peridural e sedação com Midazolam conforme técnica descrita no Protocolo de Obtenção da Medula Óssea (3.1.3.2). Realizaram-se dez punções em cada crista íliaca com aspiração de 5 ml de medula óssea em cada punção para obter a quantidade necessária de medula para o estudo.

Os aspirados de medula óssea foram processados conforme o Protocolo 3.1.3.3 no novo Laboratório de Cultura Celular do HC-UFPR para obtenção do concentrado celular no total de 150 a 500 X 10⁶ células mononucleares através do isolamento por gradiente de densidade (Ficoll 400 – Amersham Bioscience®). As células mononucleares obtidas foram lavadas com solução salina contendo 5% de albumina humana (Meio RPMI 1640 – GIBCO®) e filtradas através de uma peneira de Nylon® de 100 µm (BD-Labware®). Foram solubilizadas novamente com solução salina contendo 5% de albumina e preparadas para posterior injeção em um volume total de 8ml. Uma amostra da solução antes e após o processamento foi adquirida para caracterização da população celular que continha o subgrupo CD45⁺CD34⁺ que caracteriza as células-tronco. A caracterização das populações foi feita por Citometria de Fluxo marcando-se os antígenos de superfície CD34 e CD45 conforme o Protocolo 3.1.3.4.

Para o implante das Células-Tronco, seguiu-se o Protocolo de Implante Celular Intramiocárdico. No momento da operação, tendo já sido realizada a revascularização do miocárdio, com o coração batendo, o cirurgião recebeu oito

seringas contendo 1 ml de solução de células-tronco. Foram realizadas injeções sucessivas de 0,2 ml da solução equitativamente distribuídas na zona de transição entre a área acinética ou hipocinética do ventrículo esquerdo e o miocárdio sadio. No caso de hipocinesia difusa, as células foram implantadas nas regiões do ventrículo esquerdo diversas daquelas onde houve a revascularização cirúrgica. (STAMM, 2004)

Finalizada a operação, os pacientes permaneceram no mínimo dois dias em UTI e até sete dias em enfermaria sem apresentar nenhuma complicação pós-operatória imediata. Os pacientes foram submetidos à nova avaliação clínica, ecocardiográfica e a nova cintilografia após três meses da operação.

4.2.1 O Primeiro Paciente Operado

O primeiro paciente, de iniciais S.S.M., do sexo masculino, possuía 53 anos na data da operação. Ele havia sofrido um infarto agudo do miocárdio três meses antes da cirurgia e na época foi optado por tratamento clínico. A cineangiocoronariografia evidenciava uma lesão de 70% comprometendo o início da artéria interventricular anterior e uma lesão de 90% comprometendo o início do primeiro ramo diagonal; o ramo marginal da artéria circunflexa estava ocluído. O paciente encontrava-se em classe funcional III da NYHA e possuía uma fração de ejeção do ventrículo esquerdo pelo ecocardiograma bidimensional de 27,5%.

Em 20 de agosto de 2007 ele foi submetido a aspiração da medula óssea do ilíaco, na altura das espinhas ilíacas póstero-superiores sob anestesia peridural. Obteve-se o volume de 100 ml de medula óssea que foi diluído a 100 ml do meio RPMI.

Após o processamento da medula óssea, obtiveram-se $50,2 \times 10^6$ células mononucleares que foram diluídas em um volume total de 8 ml, com 97,6% das células sendo viáveis. Dentre estas células, 4,53% eram células-tronco CD 34+ ($2,27 \times 10^6$ células) (GRÁFICO 1; QUADRO 2). A duração do procedimento de isolamento das células mononucleares (que incluem as células-tronco) foi de cinco horas. Pelo controle microbiológico, não houve desenvolvimento de bactérias nas amostras pré e pós-processamento.

Este paciente foi então submetido à cirurgia de revascularização do miocárdio com uso de circulação extracorpórea. Foram anastomosados um enxerto de artéria torácica interna esquerda para o ramo interventricular anterior e um enxerto de veia safena magna para o ramo diagonal. Foram implantadas células-tronco nas paredes inferior e ínfero-lateral do ventrículo esquerdo (QUADRO 3).

Os resultados clínicos, do ecocardiograma e da cintilografia de perfusão miocárdica estão descritos na TABELA 1. Constatam os dados pré e pós-operatórios.

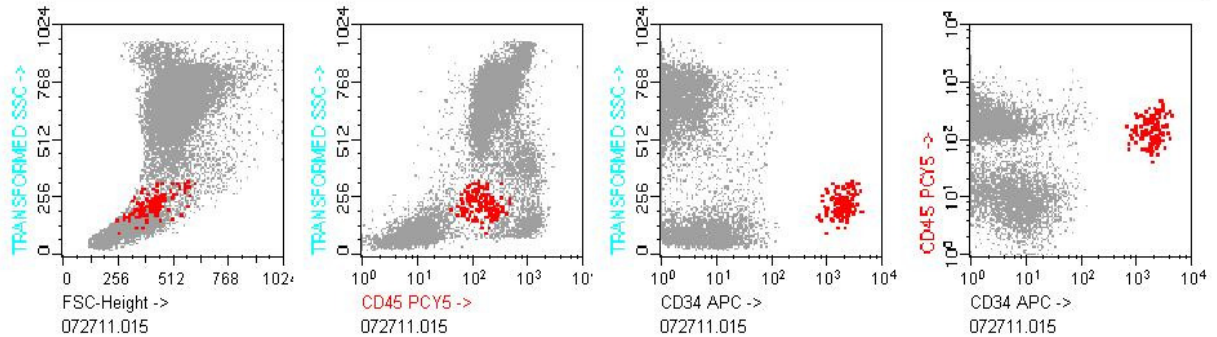
Paciente	S.S.M.
Idade	53 anos
Sexo	Masculino
Cateterismo	Lesão de 70% no início da Artéria Interventricular Anterior , lesão de 90% no início do Primeiro ramo Diagonal e oclusão do ramo Marginal da artéria circunflexa.
Data da Cirurgia	20/08/2007
Cirurgia Realizada	Enxerto de Artéria Torácica Interna Esquerda para ramo Interventricular Anterior e Veia Safena Magna para o primeiro ramo Diagonal com CEC
Local de Implante de Células-Tronco	Paredes inferior e ínfero-lateral do VE
Sistema de Coleta da Medula Óssea	Fechado
Volume	100 ml MO + 100 ml RPMI
Citologia Diferencial	Celularidade: diminuída na extensão examinada Megacariócitos: não visualizados Série branca: basófilos, eosinófilos, metamielócitos, bastonetes, segmentados, linfócitos e monócitos Série vermelha: não visualizados Material compatível com sangue periférico
Contagem Total de Células	Amostra pré-processamento: $13,48 \times 10^6$ células / ml em 200 ml Amostra pós-processamento: $10,04 \times 10^6$ células / ml em 5 ml
Contagem de Células-Tronco CD 34+	Amostra pré-processamento: $0,067 \times 10^6$ células / ml em 200 ml Amostra pós-processamento: $0,454 \times 10^6$ células / ml em 5 ml
Controle microbiológico	Amostra pré-processamento: sem desenvolvimento de bactérias Amostra pós-processamento: sem desenvolvimento de bactérias
Duração do procedimento	5 horas
Viabilidade celular	97,6%
Número de células Mononucleares infundidas	$50,2 \times 10^6$ células diluídas para 8 ml
Número de Células-Tronco CD 34+ infundidas	$2,27 \times 10^6$ células diluídas para 8 ml

QUADRO 3. INFORMAÇÕES CLÍNICAS, CIRÚRGICAS E LABORATORIAIS DO PRIMEIRO PACIENTE OPERADO.

FONTE: O autor (2009)

PACIENTE: S.S.M. - CÉLULAS CD 34+

PRÉ: 0,5% do total e 4,65% das células mononucleares



PÓS: 1,0% do total e 4,53% das células mononucleares

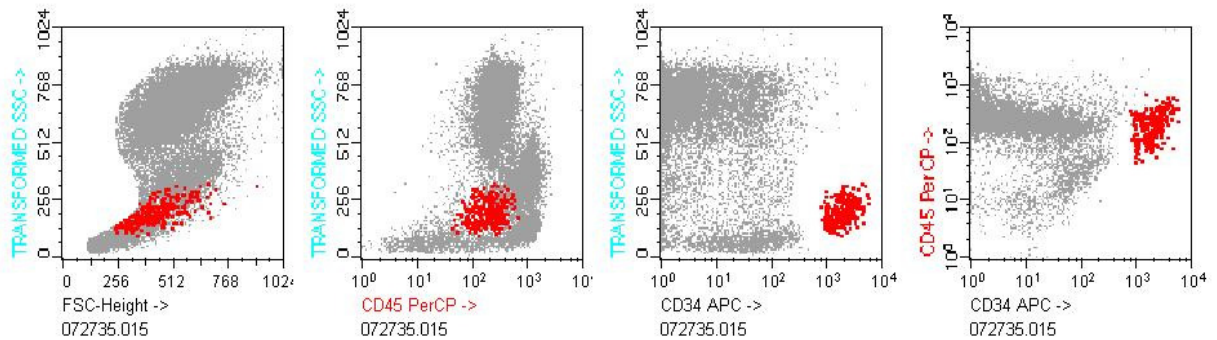


GRÁFICO 1. IMUNOFENOTIPAGEM DO ASPIRADO DE MEDULA ÓSSEA DO PRIMEIRO PACIENTE OPERADO.

FONTE: O autor (2009)

TABELA 1. AVALIAÇÃO FUNCIONAL E PERFUSÃO MIOCÁRDICA DO PRIMEIRO PACIENTE OPERADO

PRÉ-OPERATÓRIO					PÓS-OPERATÓRIO (3 MESES)		
CLASSE FUNCIONAL	III				II		
FRAÇÃO DE EJEÇÃO (SIMPSON)	27,5%				32%		
SEGMENTO DO VE	Parede	CONTRATILIDADE	ESCORE	PERFUSÃO	CONTRATILIDADE	ESCORE	PERFUSÃO
Anterior	Basal	Hipocinesia	2	Normal	Normocinesia	1	Normal
	Média	Hipocinesia	2	Normal	Normocinesia	1	Normal
	Apical	Hipocinesia	2	Fibrose	Normocinesia	1	Fibrose
Antero Lateral	Basal	Hipocinesia	2	Normal	Normocinesia	1	Normal
	Média	Hipocinesia	2	Normal	Normocinesia	1	Normal
Lateral	Apical	Hipocinesia	2	Fibrose	Normocinesia	1	Fibrose
Ínfero-Lateral	Basal	Hipocinesia	2	Fibrose	Hipocinesia	2	Fibrose
	Média	Acinesia	3	Fibrose	Hipocinesia	2	Fibrose
Inferior	Basal	Hipocinesia	2	Fibrose	Hipocinesia	2	Isquemia
	Média	Hipocinesia	2	Fibrose	Hipocinesia	2	Isquemia
	Apical	Normocinesia	1	Normal	Normocinesia	1	Isquemia
Septal Inferior	Basal	Normocinesia	1	Normal	Normocinesia	1	Normal
	Média	Normocinesia	1	Normal	Normocinesia	1	Normal
Septal Anterior	Basal	Normocinesia	1	Normal	Normocinesia	1	Normal
	Média	Normocinesia	1	Normal	Normocinesia	1	Normal
Septal	Apical	Normocinesia	1	Normal	Normocinesia	1	Isquemia
Ápice		Discinesia	4	Fibrose	Discinesia	4	Fibrose
IEMP – WMSI	1,82			1,41			

FONTE: O autor (2009)

4.2.2 O Segundo Paciente Operado

O segundo paciente, de iniciais R.R.C., do sexo feminino, possuía 58 anos na data da operação. Ele havia sofrido um infarto agudo do miocárdio, com oclusão a artéria interventricular anterior, cerca de quatro meses antes da cirurgia e na época foi optado por angioplastia, mas não obteve-se sucesso. A cineangiocoronariografia evidenciava oclusão da artéria interventricular anterior, lesão de 70% no início do ramo ventricular posterior e lesão de 70% no tronco da artéria coronária esquerda. O paciente encontrava-se em classe funcional III da NYHA e possuía uma fração de ejeção do ventrículo esquerdo pelo ecocardiograma bidimensional de 35%.

Em 11 de outubro de 2007 ela foi submetida à aspiração da medula óssea do ilíaco, na altura das espinhas ilíacas póstero-superiores sob anestesia peridural. Obteve-se o volume de 110 ml de medula óssea que foi diluído a 120 ml do meio RPMI.

Após o processamento da medula óssea, obtiveram-se $92,8 \times 10^6$ células mononucleares que foram diluídas em um volume total de 8 ml, com 96,7% das células sendo viáveis. Dentre estas células, 1,5% eram células-tronco CD 34+ ($1,39 \times 10^6$ células) (GRÁFICO 2; QUADRO 4). A duração do procedimento de isolamento das células mononucleares foi de quatro horas. Pelo controle microbiológico, não houve desenvolvimento de bactérias nas amostras pré e pós-processamento.

Esta paciente foi então submetida a cirurgia de revascularização do miocárdio com uso de circulação extracorpórea. Foram anastomosados um enxerto de veia safena magna para o ramo ventricular posterior e outro enxerto de veia safena magna para o ramo marginal da circunflexa. Foram implantadas células-tronco nas paredes anterior, lateral e apical do ventrículo esquerdo (QUADRO 4).

Os resultados clínicos, do ecocardiograma e da cintilografia de perfusão miocárdica estão descritos na TABELA 2. Constam os dados pré e pós-operatórios.

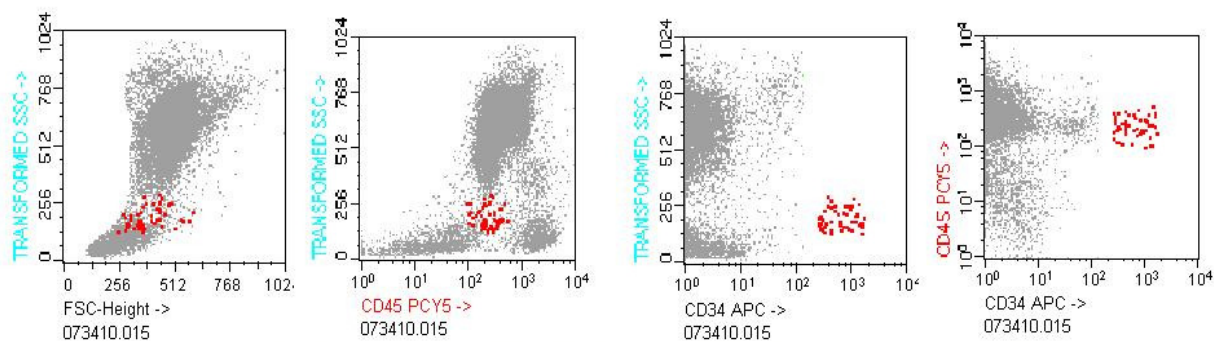
Paciente	R.R.C.
Idade	58 anos
Sexo	Feminino
Cateterismo	Oclusão da Artéria Interventricular Anterior, lesão de 70% no início do ramo Ventricular Posterior e lesão de 70% no Tronco da Artéria Coronária Esquerda
Data da Cirurgia	11/10/2007
Cirurgia Realizada	Enxerto de Veia Safena Magna para o ramo Marginal Esquerdo e para o ramo Ventricular Posterior com CEC
Local de Implante de Células-Tronco	Paredes Anterior, Lateral e Apical do VE
Sistema de Coleta da Medula Óssea	Aberto
Volume	110 ml MO + 120 ml RPMI
Citologia Diferencial	Celularidade: diminuída na extensão examinada Megacariócitos: não visualizados Série branca: mielócitos, metamielócitos, bastonetes e segmentados Série vermelha: eritroblastos Material compatível com Medula Óssea
Contagem Total de Células	Amostra pré-processamento: $10,52 \times 10^6$ células / ml em 230 ml Amostra pós-processamento: $18,56 \times 10^6$ células / ml em 5 ml
Contagem de Células-Tronco CD 34+	Amostra pré-processamento: $0,025 \times 10^6$ células / ml em 230 ml Amostra pós-processamento: $0,278 \times 10^6$ células / ml em 5 ml
Controle microbiológico	Amostra pré-processamento: sem desenvolvimento de bactérias Amostra pós-processamento: sem desenvolvimento de bactérias
Duração do procedimento	4 horas
Viabilidade celular	96,7 %
Número de células Mononucleares infundidas	$92,8 \times 10^6$ células diluídas para 8 ml
Número de Células-Tronco CD 34+ infundidas	$1,39 \times 10^6$ células diluídas para 8 ml

QUADRO 4. INFORMAÇÕES CLÍNICAS, CIRÚRGICAS E LABORATORIAIS DO SEGUNDO PACIENTE OPERADO.

FONTE: O autor (2009)

PACIENTE: R.R.C. - CÉLULAS CD 34+

PRÉ: 0,24% do total e 2,51% das células mononucleares



PÓS: 0,62% do total e 1,5% das células mononucleares

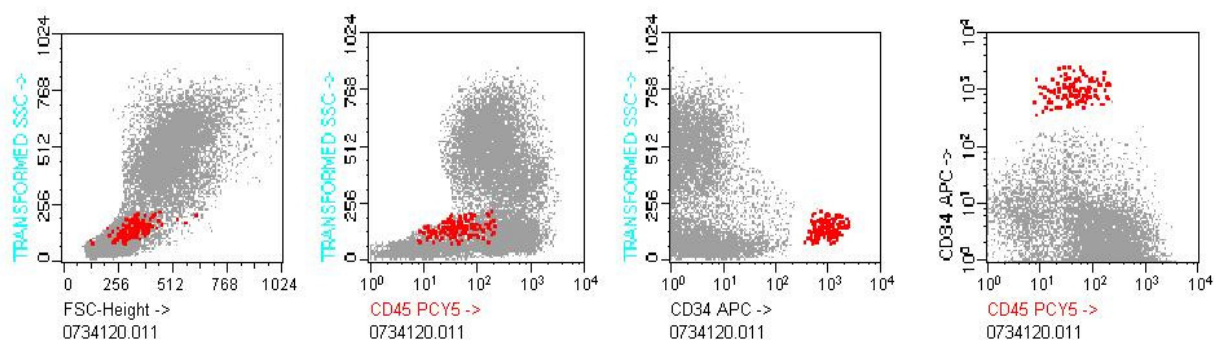


GRÁFICO 2. IMUNOFENOTIPAGEM DO ASPIRADO DE MEDULA ÓSSEA DO SEGUNDO PACIENTE OPERADO.

FONTE: O autor (2009)

TABELA 2. AVALIAÇÃO FUNCIONAL E PERFUSÃO MIOCÁRDICA DO SEGUNDO PACIENTE OPERADO

PRÉ-OPERATÓRIO					PÓS-OPERATÓRIO (3 MESES)		
CLASSE FUNCIONAL	III				I		
FRAÇÃO DE EJEÇÃO (SIMPSON)	35%				38,5%		
SEGMENTO DO VE	Parede	CONTRATILIDADE	ESCORE	PERFUSÃO	CONTRATILIDADE	ESCORE	PERFUSÃO
Anterior	Basal	Normocinesia	1	Normal	Normocinesia	1	Fibrose
	Média	Hipocinesia	2	Fibrose	Normocinesia	1	Fibrose
	Apical	Hipocinesia	2	Fibrose	Hipocinesia	2	Fibrose
Antero Lateral	Basal	Normocinesia	1	Normal	Normocinesia	1	Normal
	Média	Hipocinesia	2	Normal	Normocinesia	1	Normal
Lateral	Apical	Hipocinesia	2	Normal	Hipocinesia	2	Normal
Ífero-Lateral	Basal	Normocinesia	1	Normal	Normocinesia	1	Fibrose
	Média	Normocinesia	1	Normal	Normocinesia	1	Fibrose
Inferior	Basal	Normocinesia	1	Normal	Normocinesia	1	Normal
	Média	Normocinesia	1	Normal	Normocinesia	1	Normal
	Apical	Normocinesia	1	Normal	Hipocinesia	2	Normal
Septal Inferior	Basal	Normocinesia	1	Normal	Normocinesia	1	Normal
	Média	Hipocinesia	2	Normal	Hipocinesia	2	Normal
Septal Anterior	Basal	Hipocinesia	2	Normal	Hipocinesia	2	Fibrose
	Média	Hipocinesia	2	Fibrose	Acinesia	3	Fibrose
Septal	Apical	Hipocinesia	2	Fibrose	Hipocinesia	2	Fibrose
Ápice		Discinesia	4	Fibrose	Acinesia	3	Fibrose
IEMP – WMSI	1,64				1,58		

FONTE: O autor (2009)

4.2.3 O Terceiro Paciente Operado

O terceiro paciente, com iniciais D.D.T., do sexo masculino, possuía 67 anos na data da operação. A cineangiocoronariografia evidenciava uma lesão de 70% no início da artéria interventricular anterior e uma lesão de 70% comprometendo o óstio do primeiro ramo diagonal. O paciente encontrava-se em classe funcional III da NYHA e possuía uma fração de ejeção do ventrículo esquerdo pelo ecocardiograma bidimensional de 32,5%.

Em sete de novembro de 2007 ele foi submetido à aspiração da medula óssea do íliaco, na altura das espinhas ilíacas póstero-superiores sob anestesia peridural. Obteve-se o volume de 100 ml de medula óssea que foi diluído em 100 ml do meio RPMI.

Após o processamento da medula óssea, obtiveram-se $272,25 \times 10^6$ células mononucleares que foram diluídas em um volume total de 8 ml, com 98% das células sendo viáveis. Dentre estas células, 5,02% eram células-tronco CD 34+ ($13,6 \times 10^6$ células) (GRÁFICO 3; QUADRO 5). A duração do procedimento de isolamento das células mononucleares foi de três horas e cinquenta minutos. Pelo controle microbiológico, não houve desenvolvimento de bactérias nas amostras pré e pós-processamento.

Este paciente foi então submetido à cirurgia de revascularização do miocárdio com uso de circulação extracorpórea. Foram anastomosados um enxerto de artéria torácica interna esquerda para o ramo interventricular anterior e um enxerto de veia safena para o primeiro ramo diagonal. Foram implantadas células-tronco nas paredes lateral, inferior e ínfero-lateral do ventrículo esquerdo (QUADRO 5).

Os resultados clínicos, do ecocardiograma e da cintilografia de perfusão miocárdica estão descritos na TABELA 3. Constam os dados pré e pós-operatórios.

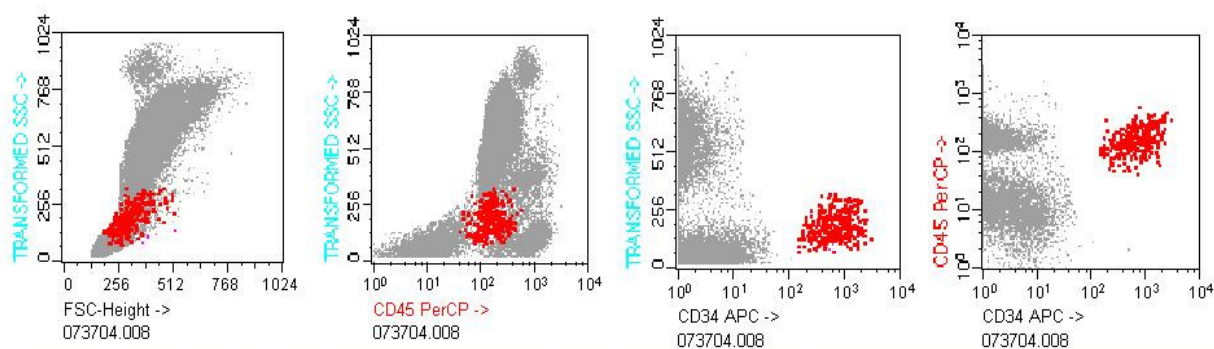
Paciente	D.D.T.
Idade	67 anos
Sexo	Masculino
Cateterismo	Lesão de 70% no início da Artéria Descendente Anterior e lesão de 70% no óstio do Primeiro ramo Diagonal
Data da Cirurgia	07/11/2007
Cirurgia Realizada	Enxerto de Artéria Torácica Interna Esquerda para ramo Interventricular Anterior e Veia Safena para o primeiro ramo Diagonal com CEC
Local de Implante de Células-Tronco	Paredes Lateral, Inferior e Ínfero-lateral do VE
Sistema de Coleta da Medula Óssea	Aberto
Volume	100 ml MO + 100 ml RPMI
Citologia Diferencial	Celularidade: diminuída na extensão examinada Megacariócitos: não visualizados Série branca: mielócitos, metamielócitos, bastonetes e segmentados Série vermelha: eritroblastos Material compatível com Medula Óssea
Contagem Total de Células	Amostra pré-processamento: $10,52 \times 10^6$ células / ml em 200 ml Amostra pós-processamento: $54,45 \times 10^6$ células / ml em 5 ml
Contagem de Células-Tronco CD 34+	Amostra pré-processamento: $0,069 \times 10^6$ células / ml em 200 ml Amostra pós-processamento: $2,733 \times 10^6$ células / ml em 5 ml
Controle microbiológico	Amostra pré-processamento: sem desenvolvimento de bactérias Amostra pós-processamento: sem desenvolvimento de bactérias
Duração do procedimento	3 horas e 50 minutos
Viabilidade celular	98%
Número de células Mononucleares infundidas	$272,2 \times 10^6$ células diluídas para 8 ml
Número de Células-Tronco CD 34+ infundidas	$13,6 \times 10^6$ células diluídas para 8 ml

QUADRO 5. INFORMAÇÕES CLÍNICAS, CIRÚRGICAS E LABORATORIAIS DO TERCEIRO PACIENTE OPERADO.

FONTE: O autor (2009)

PACIENTE: D.D.T. - CÉLULAS CD 34+

PRÉ: 0,66% do total e 4,48% das células mononucleares



PÓS: 1,17% do total e 5,02% das células mononucleares

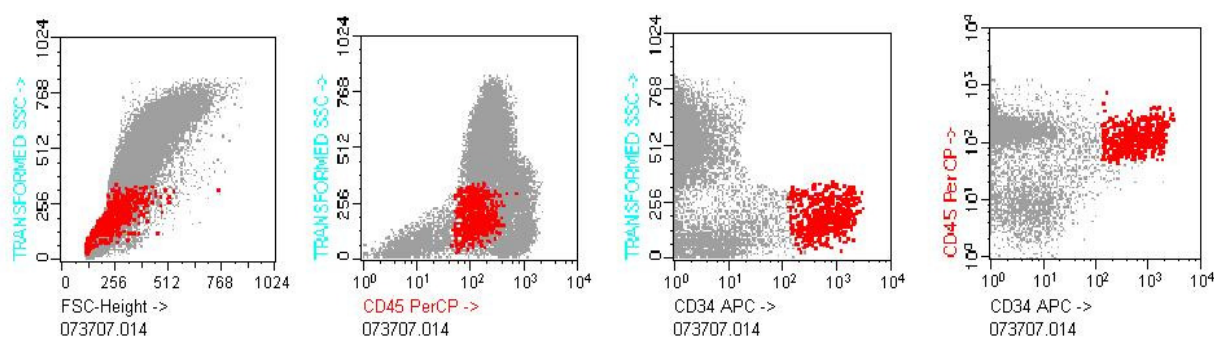


GRÁFICO 3. IMUNOFENOTIPAGEM DO ASPIRADO DE MEDULA ÓSSEA DO TERCEIRO PACIENTE OPERADO.

FONTE: O autor (2009)

TABELA 3. AVALIAÇÃO FUNCIONAL E PERFUSÃO MIOCÁRDICA DO TERCEIRO PACIENTE OPERADO

PRÉ-OPERATÓRIO					PÓS-OPERATÓRIO (3 MESES)		
CLASSE FUNCIONAL	III				I		
FRAÇÃO DE EJEÇÃO (SIMPSON)	32,5%				32%		
SEGMENTO DO VE	Parede	CONTRATILIDADE	ESCORE	PERFUSÃO	CONTRATILIDADE	ESCORE	PERFUSÃO
Anterior	Basal	Hipocinesia	2	Normal	Normocinesia	1	Normal
	Média	Hipocinesia	2	Isquemia	Normocinesia	1	Isquemia
	Apical	Hipocinesia	2	Isquemia	Normocinesia	1	Isquemia
Antero Lateral	Basal	Hipocinesia	2	Normal	Normocinesia	1	Normal
	Média	Hipocinesia	2	Normal	Normocinesia	1	Normal
Lateral	Apical	Hipocinesia	2	Normal	Normocinesia	1	Normal
Ífero-Lateral	Basal	Hipocinesia	2	Normal	Normocinesia	1	Normal
	Média	Hipocinesia	2	Normal	Normocinesia	1	Normal
Inferior	Basal	Hipocinesia	2	Normal	Hipocinesia	2	Normal
	Média	Hipocinesia	2	Isquemia	Hipocinesia	2	Isquemia
	Apical	Hipocinesia	2	Isquemia	Hipocinesia	2	Isquemia
Septal Inferior	Basal	Hipocinesia	2	Normal	Hipocinesia	2	Normal
	Média	Hipocinesia	2	Normal	Hipocinesia	2	Normal
Septal Anterior	Basal	Hipocinesia	2	Normal	Hipocinesia	2	Normal
	Média	Hipocinesia	2	Isquemia	Hipocinesia	2	Isquemia
Septal	Apical	Hipocinesia	2	Isquemia	Hipocinesia	2	Isquemia
Apice		Hipocinesia	2	Normal	Hipocinesia	2	Normal
IEMP – WMSI	2				1,52		

FONTE: O autor (2009)

4.2.4 O Quarto Paciente Operado

O quarto paciente, de iniciais L.G.M., do sexo masculino, possuía 62 anos na data da operação. A cineangiocoronariografia evidenciava uma lesão de 70% comprometendo o terço médio da artéria interventricular anterior e lesões de 70% comprometendo o início do segundo e terceiro ramos marginais da artéria circunflexa. O paciente encontrava-se em classe funcional III da NYHA e possuía uma fração de ejeção do ventrículo esquerdo pelo ecocardiograma bidimensional de 30%.

Em três de dezembro de 2007 ele foi submetido à aspiração da medula óssea do íliaco, na altura das espinhas íliacas póstero-superiores sob anestesia peridural. Obteve-se o volume de 100 ml de medula óssea que foi diluído a 100 ml do meio RPMI.

Após o processamento da medula óssea, obtiveram-se $370,2 \times 10^6$ células mononucleares que foram diluídas em um volume total de 8ml, com 99% das células sendo viáveis. Dentre estas células, 3,03% eram células-tronco CD 34+ ($11,2 \times 10^6$ células) (GRÁFICO 4; QUADRO 6). A duração do procedimento de isolamento das células mononucleares foi de três horas e quarenta minutos. Pelo controle microbiológico, não houve desenvolvimento de bactérias nas amostras pré e pós-processamento.

Este paciente foi então submetido à cirurgia de revascularização do miocárdio com uso de circulação extracorpórea. Foi anastomosado um enxerto de artéria torácica interna esquerda para o ramo interventricular anterior. Foram implantadas células-tronco nas paredes lateral, inferior e ínfero-lateral do ventrículo esquerdo (QUADRO 6).

Os resultados clínicos, do ecocardiograma e da cintilografia de perfusão miocárdica pré-operatórios estão descritos na TABELA 1. Este paciente faleceu no 32º dia de pós-operatório, em casa, durante o sono. Não foi encaminhado a serviço de saúde nem à necropsia.

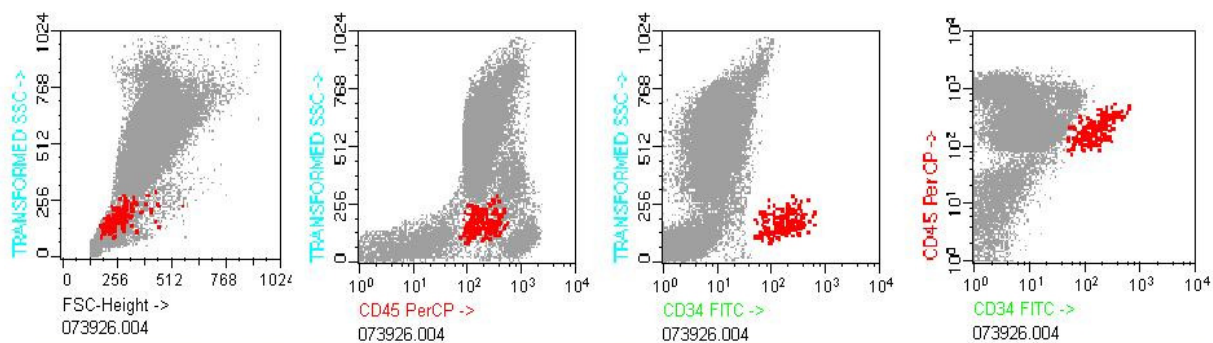
Paciente	L.G.M.
Idade	62 anos
Sexo	Masculino
Cateterismo	Lesão de 70% no Terço Médio da Artéria Interventricular Anterior e lesões de 70% no 2º e 3º ramos Marginais Esquerdos
Data da Cirurgia	03/12/2007
Cirurgia Realizada	Enxerto de Artéria Torácica Interna Esquerda para o ramo Interventricular Anterior com CEC
Local de Implante de Células-Tronco	Paredes Lateral, Inferior e Ífero-lateral do VE
Sistema de Coleta da Medula Óssea	Aberto
Volume	100 ml MO + 100 ml RPMI
Citologia Diferencial	Celularidade: diminuída na extensão examinada Megacariócitos: não visualizados Série branca: mielócitos, metamielócitos, bastonetes e segmentados Série vermelha: eritroblastos Material compatível com Medula Óssea
Contagem Total de Células	Amostra pré-processamento: $11,09 \times 10^6$ células / ml em 200 ml Amostra pós-processamento: $61,70 \times 10^6$ células / ml em 6 ml
Contagem de Células-Tronco CD 34+	Amostra pré-processamento: $0,048 \times 10^6$ células / ml em 200 ml Amostra pós-processamento: $1,869 \times 10^6$ células / ml em 6 ml
Controle microbiológico	Amostra pré-processamento: sem desenvolvimento de bactérias Amostra pós-processamento: sem desenvolvimento de bactérias
Duração do procedimento	3 horas e 40 minutos
Viabilidade celular	99%
Número de células Mononucleares infundidas	$370,2 \times 10^6$ células diluídas para 8 ml
Número de Células-Tronco CD 34+ infundidas	$11,2 \times 10^6$ células diluídas para 8 ml

QUADRO 6. INFORMAÇÕES CLÍNICAS, CIRÚRGICAS E LABORATORIAIS DO QUARTO PACIENTE OPERADO.

FONTE: O autor (2009)

PACIENTE: L.G.M. - CÉLULAS CD 34+

PRÉ: 0,44% do total e 3,79% das células mononucleares



PÓS: 0,77% do total e 3,03% das células mononucleares

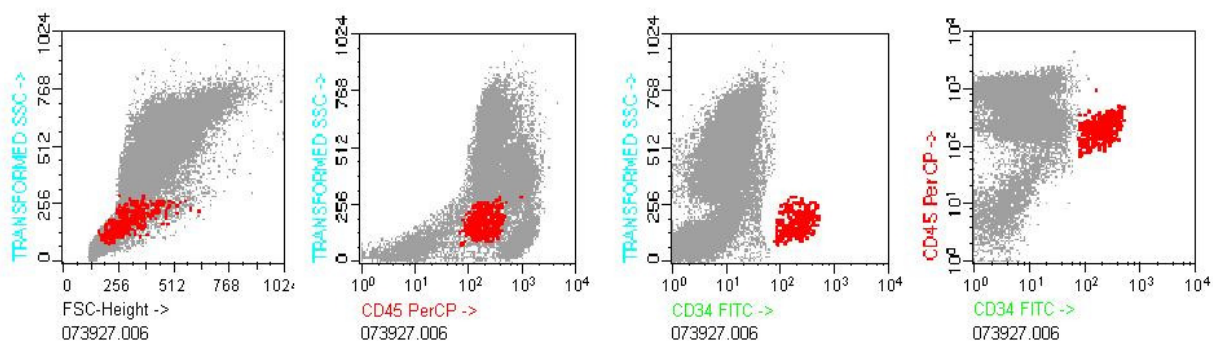


GRÁFICO 4. IMUNOFENOTIPAGEM DO ASPIRADO DE MEDULA ÓSSEA DO QUARTO PACIENTE OPERADO.

FONTE: O autor (2009)

TABELA 4. AVALIAÇÃO FUNCIONAL E PERFUSÃO MIOCÁRDICA DO QUARTO PACIENTE OPERADO

PRÉ-OPERATÓRIO				PÓS-OPERATÓRIO (3 MESES)			
CLASSE FUNCIONAL	III			ÓBITO (32º PO) (MORTE SÚBITA)			
FRAÇÃO DE EJEÇÃO (SIMPSON)	30%						
SEGMENTO DO VE	Parede	CONTRATILIDADE	ESCORE	PERFUSÃO	CONTRATILIDADE	ESCORE	PERFUSÃO
Anterior	Basal	Hipocinesia	2	Normal	-	-	-
	Média	Hipocinesia	2	Isquemia	-	-	-
	Apical	Hipocinesia	2	Isquemia	-	-	-
Antero Lateral	Basal	Hipocinesia	2	Normal	-	-	-
	Média	Hipocinesia	2	Normal	-	-	-
Lateral	Apical	Hipocinesia	2	Normal	-	-	-
Infero-Lateral	Basal	Hipocinesia	2	Isquemia	-	-	-
	Média	Hipocinesia	2	Isquemia	-	-	-
Inferior	Basal	Hipocinesia	2	Normal	-	-	-
	Média	Hipocinesia	2	Normal	-	-	-
	Apical	Hipocinesia	2	Normal	-	-	-
Septal Inferior	Basal	Hipocinesia	2	Normal	-	-	-
	Média	Hipocinesia	2	Normal	-	-	-
Septal Anterior	Basal	Hipocinesia	2	Normal	-	-	-
	Média	Hipocinesia	2	Isquemia	-	-	-
Septal	Apical	Hipocinesia	2	Isquemia	-	-	-
Ápice		Hipocinesia	2	Normal	-	-	-
IEMP – WMSI			2,00			-	

FONTE: O autor (2009)

4.2.5 O Quinto Paciente Operado

O quinto paciente, com iniciais S.D.F., do sexo masculino, possuía 68 anos na data da operação. O paciente havia sofrido um infarto agudo do miocárdio com recanalização espontânea três meses antes da operação. A cineangiocoronariografia evidenciava uma lesão crítica no início da artéria interventricular anterior. O paciente encontrava-se em classe funcional III da NYHA e possuía uma fração de ejeção do ventrículo esquerdo pelo ecocardiograma bidimensional de 28%.

Em 11 de dezembro de 2007 ele foi submetido à aspiração da medula óssea do íliaco, na altura das espinhas ilíacas póstero-superiores sob anestesia peridural. Obteve-se o volume de 100 ml de medula óssea que foi diluído em 100 ml do meio RPMI.

Após o processamento da medula óssea, obtiveram-se $224,45 \times 10^6$ células mononucleares que foram diluídas em um volume total de 8 ml, com 79% das células sendo viáveis. Dentre estas células, 3,11% eram células-tronco CD 34+ ($6,98 \times 10^6$ células) (GRÁFICO 5; QUADRO 7). A duração do procedimento de isolamento das células mononucleares foi de quatro horas. Pelo controle microbiológico, não houve desenvolvimento de bactérias nas amostras pré e pós-processamento.

Este paciente foi então submetido à cirurgia de revascularização do miocárdio com uso de circulação extracorpórea. Foi anastomosado um enxerto de artéria torácica interna esquerda para o ramo interventricular anterior. Foram implantadas células-tronco nas paredes lateral, inferior e ínfero-lateral do ventrículo esquerdo (QUADRO 7).

Os resultados clínicos, do ecocardiograma e da cintilografia de perfusão miocárdica estão descritos na TABELA 5. Constam os dados pré e pós-operatórios.

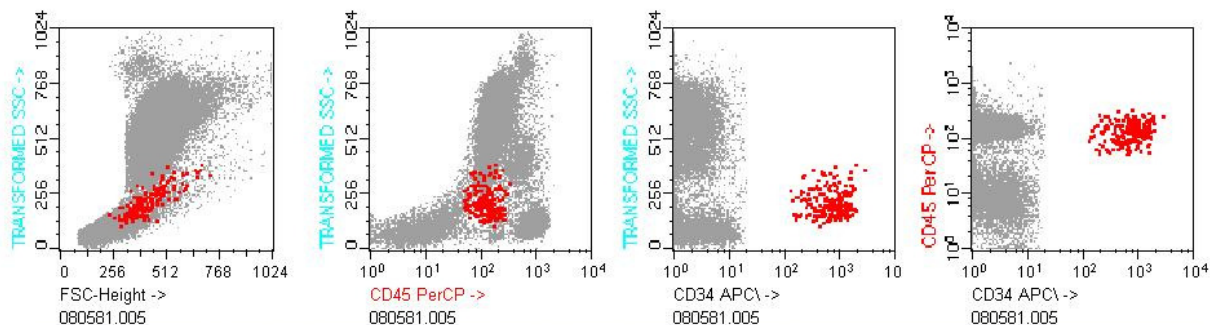
Paciente	S.D.F.
Idade	68 anos
Sexo	Masculino
Cateterismo	Lesão crítica no Início da Artéria Interventricular Anterior
Data da Cirurgia	11/12/2007
Cirurgia Realizada	Enxerto de Artéria Torácica Interna Esquerda para a Artéria Interventricular Anterior com CEC
Local de Implante de Células-Tronco	Paredes Lateral, Inferior e Ínfero-lateral do VE
Sistema de Coleta da Medula Óssea	Aberto
Volume	100 ml MO + 100 ml RPMI
Citologia Diferencial	Celularidade: diminuída na extensão examinada Megacariócitos: não visualizados Série branca: mielócitos, metamielócitos, bastonetes e segmentados Série vermelha: eritroblastos Material compatível com Medula Óssea
Contagem Total de Células	Amostra pré-processamento: $12,20 \times 10^6$ células / ml em 200 ml Amostra pós-processamento: $44,89 \times 10^6$ células / ml em 5 ml
Contagem de Células-Tronco CD 34+	Amostra pré-processamento: $0,057 \times 10^6$ células / ml em 200 ml Amostra pós-processamento: $1,396 \times 10^6$ células / ml em 5 ml
Controle microbiológico	Amostra pré-processamento: sem desenvolvimento de bactérias Amostra pós-processamento: sem desenvolvimento de bactérias
Duração do procedimento	4 horas
Viabilidade celular	79%
Número de células Mononucleares infundidas	$224,45 \times 10^6$ células diluídas para 8 ml
Número de Células-Tronco CD 34+ infundidas	$6,98 \times 10^6$ células diluídas para 8ml

QUADRO 7. INFORMAÇÕES CLÍNICAS, CIRÚRGICAS E LABORATORIAIS DO QUINTO PACIENTE OPERADO.

FONTE: O autor (2009)

PACIENTE: S.D.F. - CÉLULAS CD 34+

PRÉ: 0,47% do total e 4,07% das células mononucleares



PÓS: 0,80% do total e 3,11% das células mononucleares

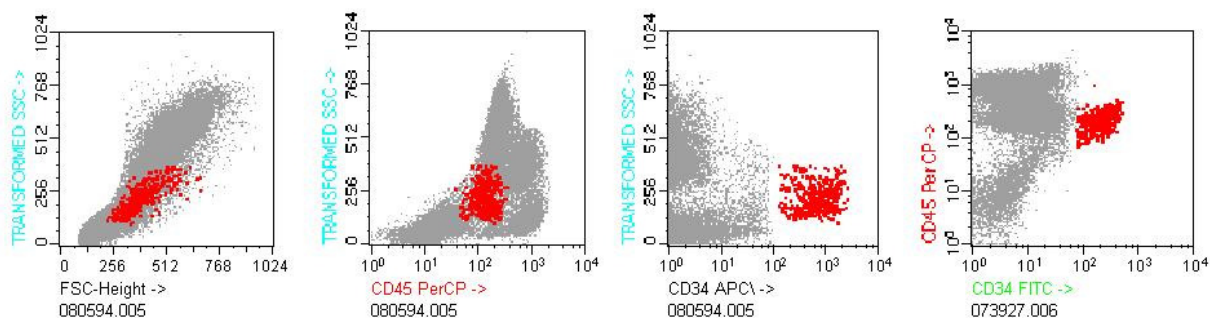


GRÁFICO 5. IMUNOFENOTIPAGEM DO ASPIRADO DE MEDULA ÓSSEA DO QUINTO PACIENTE OPERADO.

FONTE: O autor (2009)

TABELA 5. AVALIAÇÃO FUNCIONAL E PERFUSÃO MIOCÁRDICA DO QUINTO PACIENTE OPERADO

PRÉ-OPERATÓRIO					PÓS-OPERATÓRIO (3 MESES)		
CLASSE FUNCIONAL	III				I		
FRAÇÃO DE EJEÇÃO (SIMPSON)	28%				29%		
SEGMENTO DO VE	Parede	CONTRATILIDADE	ESCORE	PERFUSÃO	CONTRATILIDADE	ESCORE	PERFUSÃO
Anterior	Basal	Hipocinesia	2	Isquemia	Hipocinesia	2	Normal
	Média	Hipocinesia	2	Isquemia	Hipocinesia	2	Normal
	Apical	Hipocinesia	2	Isquemia	Hipocinesia	2	Fibrose
Antero Lateral	Basal	Hipocinesia	2	Normal	Normocinesia	1	Normal
	Média	Hipocinesia	2	Normal	Normocinesia	1	Normal
Lateral	Apical	Hipocinesia	2	Normal	Normocinesia	1	Normal
Ífero-Lateral	Basal	Hipocinesia	2	Normal	Normocinesia	1	Normal
	Média	Hipocinesia	2	Normal	Normocinesia	1	Normal
Inferior	Basal	Hipocinesia	2	Fibrose	Normocinesia	1	Fibrose
	Média	Hipocinesia	2	Fibrose	Normocinesia	1	Fibrose
	Apical	Hipocinesia	2	Fibrose	Normocinesia	1	Fibrose
Septal Inferior	Basal	Hipocinesia	2	Normal	Hipocinesia	2	Normal
	Média	Hipocinesia	2	Normal	Hipocinesia	2	Normal
Septal Anterior	Basal	Hipocinesia	2	Isquemia	Hipocinesia	2	Normal
	Média	Hipocinesia	2	Isquemia	Hipocinesia	2	Normal
Septal	Apical	Hipocinesia	2	Isquemia	Hipocinesia	2	Normal
Ápice		Normocinesia	1	Isquemia	Normocinesia	1	Normal
IEMP – WMSI	1,94			1,47			

FONTE: O autor (2009)

5 DISCUSSÃO

O uso de Células-Tronco tem sido amplamente divulgado tanto pela literatura científica quanto pela imprensa leiga. Isto desperta na população uma ansiedade muito grande para que os resultados dos estudos sejam rapidamente publicados. Resultados estes que, sendo positivos, poderiam ser prontamente incorporados na prática clínica.

Por mais que os resultados até agora publicados sejam promissores, não se pode abrir mão do rigor do método científico. As doenças cardiológicas até agora pesquisadas para terem como opção de tratamento o emprego de células-tronco possuem prognóstico ruim. Conforme Braile (2005), os tratamentos existentes não são capazes de devolver a qualidade de vida satisfatória a estes pacientes.

5.1 IMPLANTAÇÃO DO CENTRO DE PESQUISAS EM CÉLULAS-TRONCO

Para poder-se avançar nas pesquisas e trazer para um Hospital Universitário público o nível de desenvolvimento técnico alcançado nos centros pioneiros de pesquisa com células-tronco, muitas barreiras precisaram ser transpostas.

A primeira barreira, talvez a principal delas, foi o aporte de recursos financeiros. De nada adiantaria a iniciativa de criar o Centro de Pesquisas se a verba para sua concretização não existisse. Esta questão fundamental foi solucionada através do convênio celebrado entre a Universidade Federal do Paraná e a Secretaria de Estado de Ciência e Tecnologia no ano de 2005.

Possibilitou-se a realização das reformas de espaço físico necessárias, aquisição de equipamentos e materiais de consumo para o início da aplicação clínica dos protocolos.

Houve grande integração multidisciplinar para iniciar o projeto. Por ser o

Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná um hospital escola, a proposta de realização das pesquisas foi muito bem recebida por todas as Disciplinas e Setores envolvidos.

Com a definição do espaço físico e a caracterização dos equipamentos e materiais de consumo necessários, deu-se início ao processo de compra de equipamentos e insumos pelo processo licitatório. Muito tempo foi gasto para que todas as exigências do agente financiador e do Tribunal de Contas do Estado do Paraná fossem atendidas. Mesmo com certa demora, todos os equipamentos necessários foram adquiridos. Os reagentes imunológicos e demais itens de consumo foram importados e estavam disponíveis para o início das pesquisas.

Os protocolos foram criados concomitantemente à construção do laboratório. O Protocolo de Seleção de Pacientes precisou ser feito de tal forma que toda a população do Estado do Paraná tivesse acesso ao Centro de Pesquisas. O encaminhamento de pacientes de outras cidades para um hospital de referência específico não é simples. O Sistema de Saúde do Estado está formulado de tal forma que os pacientes portadores de doenças graves que precisam de atendimento em hospitais terciários, são encaminhados para os hospitais de referência da sua região de origem. Para que estes pacientes pudessem chegar ao HC-UFPR, foi necessária a criação do Ambulatório de Células-Tronco ligado a Unidade Funcional de Pneumologia e Cardiologia. Com este ambulatório, os pacientes passaram a poder ser incluídos em fila de espera para consulta no ambulatório de Cardiologia – Triagem e logo em seguida direcionados para o Ambulatório de Células-Tronco.

Com esta logística implantada, todos os pacientes do estado passaram a poder ter acesso ao Centro de Pesquisas por intermédio da Central de Agendamento de Consultas de acordo com o Sistema Único de Saúde.

Para a aplicação clínica dos protocolos, selecionaram-se pacientes portadores de miocardiopatia isquêmica grave (com fração de ejeção menor que 35%) que necessitavam realizar cirurgia de revascularização do miocárdio. Foi selecionada esta doença por três motivos essenciais: o acesso ao miocárdio seria

direto por tratar-se de cirurgia aberta; por estar sendo tratado o mesmo paciente com uma técnica convencional (revascularização do miocárdio) e uma nova técnica (células-tronco), o paciente poderia ser o seu próprio controle do ponto de vista estatístico. Por fim, segundo as determinações da CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa) e legislação federal, não poderia ser submetido um paciente a uma cirurgia traumática, como é a cirurgia cardíaca, para utilização exclusiva de uma técnica ainda com eficácia não comprovada (BRASIL, 2006).

Todos os cinco pacientes tratados apresentaram evolução satisfatória no período hospitalar. Um dos pacientes faleceu no 32º dia de pós-operatório por morte súbita.

Os protocolos criados foram aplicados aos cinco pacientes. Foi possível realizar as análises laboratoriais e as avaliações clínicas pré e pós-operatórias conforme os protocolos.

Foi possível formar com as informações obtidas o início de uma base de dados para a continuação da pesquisa com a aplicação clínica para o tratamento da miocardiopatia isquêmica.

5.2 APLICAÇÃO CLÍNICA

5.2.1 O Primeiro Paciente Operado

O primeiro paciente operado recebeu enxertos cirúrgicos (artéria torácica interna esquerda para artéria interventricular anterior e veia safena magna para o primeiro ramo diagonal) para artérias correspondentes aos segmentos anteriores, septais anteriores e antero-laterais do ventrículo esquerdo. Segundo a análise da contração segmentar, houve melhora nestes segmentos, passando a contratilidade de hipocinesia para normocinesia.

As Células-Tronco foram aplicadas em segmentos inferiores e ínfero-laterais. No segmento médio da parede ínfero-lateral, houve mudança da contratilidade de acinesia para hipocinesia. Nos outros segmentos não houve modificações.

Já a cintilografia pós-operatória evidenciou presença de áreas de isquemia na parede inferior. Esta parede encontrava-se com fibrose no exame pré-operatório. Esta é uma evidência indireta de neovascularização, mesmo não tendo havido modificação na contratilidade desta região.

Na avaliação da performance global do ventrículo esquerdo, a fração de ejeção pelo método bidimensional mostrou melhora de 27,5% para 32%. Com relação ao WMSI, houve passagem de 1,82 para 1,41. Estas duas variáveis poderiam ser atribuídas somente aos enxertos cirúrgicos, mas houve participação, mesmo que pequena, de segmento que recebeu células-tronco.

Com relação à Classe Funcional, houve melhora de Classe III para Classe II. Esta variável é muito subjetiva. Além da melhor performance miocárdica, está presente também o efeito placebo pelo paciente estar sendo submetido a uma nova técnica.

Quando avaliamos o processo de separação celular, os controles de qualidade microbiológicos referentes a contaminações das amostras, evidenciaram manutenção da esterilidade durante todo o processo. A viabilidade celular foi de

97,6%, mostrando haver pouca citólise durante o método de separação utilizado.

O número de células mononucleares infundidas neste primeiro paciente ficou abaixo do esperado. Isto pode ser atribuído a dois fatores principais: baixa celularidade da medula óssea e a contaminação do aspirado de medula óssea por sangue periférico durante a coleta. O maior indício deste fato é o resultado da citologia diferencial que evidenciou características de sangue periférico na amostra examinada. Entretanto, a lâmina para microscopia é preparada com amostra da última punção medular. Esta punção pode ter sido realizada em sítio do íliaco já inundado por sangue periférico vindo da manipulação pelas punções anteriores.

A menor celularidade obtida no final de todo o processo pode justificar a pequena melhora obtida nos segmentos ventriculares que receberam as células-tronco.

5.2.2 O Segundo Paciente Operado

O segundo paciente operado recebeu enxertos cirúrgicos (veia safena magna para o ramo marginal da circunflexa e veia safena magna para o ramo ventricular posterior) para artérias correspondentes aos segmentos inferiores e ínfero-laterais do ventrículo esquerdo. Segundo a análise da contração segmentar, os segmentos referentes a estas artérias estavam normocinéticos antes da operação e assim permaneceram no pós-operatório.

As Células-Tronco foram aplicadas em segmentos anteriores, laterais e no ápice. Dois segmentos que estavam hipocinéticos passaram a normocinéticos (Segmento Anterior Médio e Antero-lateral Médio). O Ápice que se encontrava discinético passou a acinético.

Neste paciente, pôde ser constatado que dois segmentos, o Inferior Apical e Septal Anterior Médio, pioraram sua contratilidade. Isto pode ser creditado à evolução do remodelamento ventricular nestas áreas. Neste tempo de pós-operatório, os procedimentos cirúrgicos adotados não foram capazes de interromper

este processo.

Quanto ao resultado da cintilografia, não houve melhora pós-operatória. O segmento basal e o médio da parede ínfero-lateral passaram a apresentar fibrose. Esta região recebeu um enxerto de veia safena. É provável que tenha havido infarto silencioso pós-operatório deste segmento.

Na avaliação da contratilidade global do ventrículo esquerdo, a fração de ejeção pelo método bidimensional mostrou melhora, passando de 35% para 38,5%. Com relação ao WMSI, houve passagem de 1,64 para 1,58. Mesmo tendo havido melhora em segmentos que receberam células-tronco, isto não se refletiu em melhora dos índices de performance global ventricular. A melhora nestes segmentos foi equalizada pela evolução do remodelamento em outros segmentos.

Com relação à Classe Funcional, houve melhora de Classe III para Classe I, mesmo tendo havido pequena melhora nas variáveis objetivas de contração ventricular.

Quando ao processo de separação celular, os controles de qualidade microbiológicos referentes a contaminações das amostras, evidenciaram manutenção da esterilidade durante todo o processo. A viabilidade celular foi de 96,7%, novamente mostrando haver pouca citólise durante o método de separação utilizado.

O número de células mononucleares infundidas nesta paciente também ficou abaixo do esperado. Segundo Ryan (2000), este fato pode ser atribuído à baixa celularidade da medula óssea desta paciente. Esta característica medular pode estar presente em pacientes idosos. No envelhecimento, parte das células hematopoiéticas é substituída por tecido adiposo.

A menor celularidade obtida no final do processo de separação pode justificar a pequena melhora obtida na avaliação objetiva da contratilidade ventricular esquerda, mas foi suficiente para melhorar a contração de dois segmentos.

5.2.3 O Terceiro Paciente Operado

O terceiro paciente operado recebeu enxertos cirúrgicos (artéria torácica interna esquerda para artéria interventricular anterior e veia safena magna para o primeiro ramo diagonal) para artérias correspondentes aos segmentos anteriores, septais anteriores e antero-laterais do ventrículo esquerdo. Segundo a análise da contração segmentar, houve melhora nestes segmentos, passando a contratilidade de hipocinesia para normocinesia.

As Células-Tronco foram aplicadas em segmentos inferiores e ínfero-laterais. Nos segmentos da parede ínfero-lateral, houve normalização da contratilidade. Nos outros segmentos não houve modificações.

Na avaliação da performance global do ventrículo esquerdo, a fração de ejeção pelo método bidimensional não mostrou modificação. Com relação ao WMSI, houve melhora de 2 para 1,52.

A Cintilografia Miocárdica não evidenciou modificações da perfusão neste curto período de seguimento. Com relação à Classe Funcional, houve melhora de Classe III para Classe I.

Quando se avaliou o processo de separação celular, os controles de qualidade microbiológicos referentes a contaminações das amostras evidenciaram manutenção da esterilidade durante todo o processo. A viabilidade celular foi de 98%. Neste paciente também houve pouca citólise durante a separação celular.

O número de células mononucleares infundidas neste paciente ficou dentro do esperado, logo se pode observar que a melhora obtida nos territórios que receberam enxertos cirúrgicos repetiu-se nos que receberam células-tronco.

5.2.4 O Quarto Paciente Operado

O quarto paciente operado recebeu enxerto cirúrgico único (artéria torácica interna esquerda para artéria interventricular anterior) para artéria que irriga os segmentos anteriores e septais anteriores do ventrículo esquerdo.

As Células-Tronco foram aplicadas em segmentos laterais, inferiores e ífero-laterais.

Quando se avaliou o processo de separação celular, os controles de qualidade microbiológicos referentes a contaminações das amostras, evidenciaram manutenção da esterilidade durante todo o processo. A viabilidade celular foi de 99%.

O número de células mononucleares infundidas neste paciente ficou dentro do esperado: $370,2 \times 10^6$ células. O intervalo protocolar é de 150 a 500×10^6 células mononucleares.

Este paciente faleceu no 32º dia de pós-operatório. No 14º dia de pós-operatório, o paciente havia comparecido ao hospital para avaliação pós-operatória de rotina, com inspeção da ferida cirúrgica e conferência da medicação em uso. O paciente encontrava-se assintomático, em classe funcional I. O óbito ocorreu à noite, enquanto o paciente dormia. Segundo relatos da família, o paciente havia tido um dia normal, não tendo apresentado qualquer tipo de sintoma. Não houve avaliação necroscópica. Como causas prováveis podem-se considerar arritmia ventricular e síndrome coronariana aguda.

5.2.5 O Quinto Paciente Operado

O quinto paciente operado também recebeu enxerto cirúrgico único (artéria torácica interna esquerda para artéria interventricular anterior) para artéria correspondente aos segmentos anteriores, antero-laterais e septais anteriores do ventrículo esquerdo. Segundo a análise da contração segmentar, não houve

melhora nos segmentos anteriores, mantendo-se hipocinéticos. Os segmentos antero-laterais passaram de hipocinéticos para normocinéticos. Como a lesão coronariana era no início da artéria descendente anterior, explica-se este resultado pela perfusão dos ramos diagonais.

As Células-Tronco foram aplicadas em segmentos inferiores e ínfero-laterais. Houve mudança da contratilidade nestes segmentos de hipocinesia para normocinesia. Nos segmentos septais não houve modificações.

A cintilografia evidenciou melhora dos segmentos que receberam o enxerto arterial. Não houve modificação da perfusão dos segmentos que receberam células-tronco.

Na avaliação da performance global do ventrículo esquerdo, a fração de ejeção pelo método bidimensional mostrou discreta melhora de 28% para 29%. Com relação ao WMSI, houve passagem de 1,94 para 1,47. Neste paciente houve igual participação na melhora da contratilidade global do ventrículo esquerdo de segmentos que receberam enxertos cirúrgicos e células-tronco.

Com relação à Classe Funcional, houve melhora de Classe III para Classe I.

No processo de separação celular, os controles de qualidade microbiológicos referentes a contaminações das amostras, evidenciaram manutenção da esterilidade. Entretanto, a viabilidade celular foi de 79%, mostrando ter havido citólise durante a separação celular. Mesmo assim, se considerarmos $224,45 \times 10^6$ células infundidas, $177,31 \times 10^6$ células estavam viáveis. Número que se encontra dentro do esperado.

5.3 ANÁLISE CRÍTICA DOS RESULTADOS

Os quatro pacientes sobreviventes apresentaram melhora clínica neste curto tempo de seguimento. O efeito da revascularização do miocárdio nesta melhora foi perceptível. Houve melhora da perfusão e da contratilidade nos locais que receberam enxerto cirúrgico.

Conforme afirmado por Hausmann (1997), pacientes com miocardiopatia isquêmica e grave comprometimento da fração de ejeção do ventrículo esquerdo, obtém benefício com incremento da função ventricular quando submetidos à revascularização cirúrgica do miocárdio. Esta melhora ocorre quando são tratadas áreas comprovadamente isquêmicas. O acréscimo na fração de ejeção varia de 6 a 22% um ano após a cirurgia.

Nesta pequena amostra de pacientes, foi possível evidenciar melhora dos segmentos do miocárdio que receberam células-tronco. Mas esta melhora foi heterogênea. Dois pacientes obtiveram melhora da contratilidade segmentar não acompanhada de melhora da perfusão miocárdica.

Segmentos que se mantiveram hipocinéticos e apresentavam fibrose, apresentaram incremento da perfusão miocárdica.

Estendendo-se o estudo para um número maior de pacientes e adicionando o grupo controle, esta heterogeneidade poderá, ou não, ser corrigida.

Este estudo para início da aplicação clínica não objetivou a análise da eficácia da terapia celular. Visou a demonstração da funcionalidade do Centro de Pesquisas e a capacidade de gerar informações para prosseguimento das investigações clínicas.

5.4 PERSPECTIVAS FUTURAS

As células-tronco possuem um potencial terapêutico substancial. Pacientes com doenças outrora intratáveis, passaram a apresentar novas possibilidades de tratamento.

Muito progresso houve nas pesquisas experimentais, mas tem-se que avançar muito. Pouco se entende do real mecanismo pelo qual ocorre melhora quando utilizadas as células-tronco.

É perceptível a melhora que os pacientes obtêm com esta nova modalidade terapêutica. Questiona-se qual o papel das células-tronco neste processo. Será que as células-tronco se transdiferenciam em células especializadas e assim permanecem no tecido tratado? Será que as células-tronco secretam substâncias (efeito parácrino) que estimulam a divisão celular de células terminais? Será que as células-tronco estimulam a migração de novas células para o tecido doente, intensificando o processo de reparação natural?

Precisa-se conhecer profundamente o processo de diferenciação celular. Será que o cardiomiócito criado a partir da estimulação da diferenciação das células mesenquimais realmente é uma célula totalmente capaz de contrair-se e sincronizar-se com o miocárdio nativo?

O campo de pesquisas é extenso. Pacientes com miocardiopatia isquêmica, chagásica e dilatada estão apresentando melhoras.

A partir do momento que os mecanismos de atuação das células-tronco estiverem estabelecidos, a célula ideal definida, a via de administração e a quantidade de células padronizadas, a aplicação clínica poderá tornar-se realidade mundial.

Estudos randomizados, duplo-cegos e com número substancial de pacientes são necessários em vista dos resultados variáveis encontrados nos centros mundiais que realizam este tipo de pesquisa.

6 CONCLUSÕES

O Centro de Pesquisas em Transplante de Células-Tronco foi criado com a reforma e a adequação do Laboratório de Cultura Celular e com a definição dos protocolos propostos.

A aplicação clínica dos protocolos em cinco pacientes foi executada, comprovando a funcionalidade do Centro de Pesquisas.

REFERÊNCIAS

AMERICAN HEART ASSOCIATION (AHA). **Nomenclature and criteria for diagnosis of diseases of the heart and great vessels**. 9^a ed. Boston: Little, Brown & Co., p.253-256, 1994.

AMERICAN HEART ASSOCIATION (AHA). ACC/AHA Guideline update for coronary artery by-pass graft surgery: Summary Article. **Circulation**, v. 110, p. 1168-76, 2004.

AMERICAN HEART ASSOCIATION (AHA). Heart disease and stroke statistics – 2009 update. **Circulation**, v. 119, p. e1-e161, 2009.

ASSMUS, B. *et al.* Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). **Circulation**, v. 106, p. 3009-17, 2002.

ASSMUS, B. *et al.* Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 12, p. 1189-91, 2006.

AURICCHIO, A. *et al.* Cardiac resynchronization therapy restores optimal atrioventricular mechanical timing in heart failure patients with ventricular conduction delay. **Journal of the American College of Cardiology**. v. 39, n. 7, p. 1163-9, 2002.

BATISTA, R. J. *et al.* Partial left ventriculectomy to treat end-stage heart disease. **Annals of Thoracic Surgery**, v. 64, n. 3, p. 634-8, 1997.

BÖYUM, A. Isolation of leucocytes from human blood: A two-phase system for removal of red cells with methylcellulose as erythrocyte aggregative agent. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, Supplement 97, n. 21, p. 9-29, 1968.

BÖYUM, A. Isolation of leucocytes from human blood. Further observations. Methylcellulose, dextran and Ficoll as erythrocyte-aggregating agent. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, Supplement 97, n. 21, p. 31-50, 1968.

BRAILE, D. M. Terapia Celular: uma nova perspectiva no tratamento da insuficiência cardíaca de causa isquêmica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 84, n. 5, p. 357-9, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de Informações Hospitalares do SUS. **Indicadores de morbidade, mortalidade e fatores de risco: 2005**. Brasília, 2005. Disponível em <<http://www.datasus.gov.br>>. Acesso em: 10/10/2008.

CHACHQUES, J. C.; GRANDJEAN, P. A.; CARPENTIER, A. Latissimus dorsi dynamic cardiomyoplasty. **Annals of Thoracic Surgery**, v. 47, n. 2, p. 600-4, 1989.

CHEN, S. L.; FANG, W. W.; YE, F. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. **American Journal of Cardiology**, v. 94, p. 92-5, 2004.

CHIU, R. C. J.; AUDRIUS, Z.; KAO, R. L. Cellular cardiomyoplasty: myocardial regeneration with satellite cell implantation. **Annals of Thoracic Surgery**, v. 60, p. 12-18, 1995.

DOR, V. *et al.* Efficacy of endoventricular patch plasty in large post infarction akinetic scar and severe left ventricular dysfunction: comparison with a series of large dysknetic scars. **Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 116, n. 1, p. 50-9, 1998.

FELKER, G. M. *et al.* The problem of decompensated heart failure: nomenclature, classification and risk stratification. **American Heart Journal**, v. 145, s. 2, p. s18-s25, 2003.

FOLLAND, E. D. *et al.* Assessment of left ventricular ejection fraction and volumes by real-time, two-dimensional echocardiography. A comparison of cineangiographic and radionuclide techniques. **Circulation**, v. 60, n. 4, p. 760-6, 1979

FRANCO, K. L. New devices for chronic ventricular support. **Journal of Cardiovascular Surgery**. v. 16, n. 3, p. 178-92 , 2001.

FRESHNEY R. I. Physical methods of cell separation. In: _____. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**. New York: Alan R. Liss, Inc., 1987. p. 155-168.

FUCHS, S. *et al.* Transendocardial delivery of autologous bone marrow enhances collateral perfusion and regional function in pigs with chronic experimental myocardial ischemia. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 37, p. 1726-32, 2001.

HAIDER, H. K.; ASHRAF, M. Bone marrow stem cell in the infarcted heart. **Coronary Artery Disease**, v. 16, n. 2, p. 99-103, 2005.

HAMANO, K. *et al.* Local implantation of autologous bone marrow cells for therapeutic angiogenesis in patients with ischemic heart disease: clinical trial and preliminary results. **Japanese Circulation Journal**, v. 65, p. 845-7, 2001.

HAUSMANN, H. *et al.* Decision-making in end-stage coronary artery disease: revascularization or heart transplantation? **Annals of Thoracic Surgery**, v. 64, n. 5, p. 1296-301, 1997.

HOSENPUD, J. D. *et al.* The registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: seventeenth official report – 2000. **Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 19, p. 909, 2000.

JAIN, M. *et al.* Cell therapy attenuates deleterious ventricular remodeling and improves cardiac performance after myocardial infarction. **Circulation**, v. 103, n. 14, p. 1920-27, 2001.

JAIN, M. *et al.* Mesenchymal stem cells in the infarcted heart. **Coronary Artery Disease**, v.16, n. 2, p.93-97, 2005.

KAWAMOTO, A. *et al.* Therapeutic potential of ex-vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. **Circulation**, v. 103, p. 634-7, 2001.

KOCHER, A. A. *et al.* Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. **Natural Medicine**, v. 7, n. 4, p. 430-6, 2001.

KONERTZ, W. *et al.* Safety and feasibility of a cardiac support device. **Journal of Cardiac Surgery**, v. 16, n. 2, p. 113-7, 2001.

KOUCHOUKOS N. T. *et al.* Ischemic heart disease. In: _____. **Kirklin and Barrat-Boyes Cardiac Surgery**: morphology, diagnostic criteria, natural history, techniques, results and indications. 3rd ed., Philadelphia: Churchill Livingstone, 2003. p. 1724-78.

KOUCHOUKOS N. T. *et al.* Heart failure. In: _____. **Kirklin and Barrat-Boyes Cardiac Surgery**: morphology, diagnostic criteria, natural history, techniques, results and indications. 3rd ed., Philadelphia: Churchill Livingstone, 2003. p. 352-481.

MCGLAVE, P. Overview of stem cell transplantation. In: HOFFMAN, R. *et al.* **Hematology**: basic principles and practice. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000. p.1550-3

MENASCHE, P. *et al.* Myoblast transplantation for heart failure. **Lancet**, v. 357, p. 279-80, 2001.

MENASCHE, P. *et al.* Autologous skeletal myoblast transplantation for severe post-infarction left ventricular dysfunction. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 41, p. 1078-83, 2003.

MENASCHE, P. Skeletal myoblast for cell therapy. **Coronary Artery Disease**, v.16, p. 105-110, 2005.

MENASCHE, P. Skeletal myoblasts and cardiac repair. **Journal of Molecular and Cell Cardiology**, v. 45, n. 4, p. 545-53, 2008.

MENDEZ, G. F.; COWIE, M. R. The epidemiological features of heart failure in developing countries: a review of the literature. **International Journal of Cardiology**, v. 80, n. 2-3, p. 213-9, 2001.

MOTA, A. C. A.; SOARES, M. B. P.; SANTOS, R. R. Uso de terapia regenerativa com células-tronco da medula óssea em doenças cardiovasculares – perspectiva do hematologista. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 27, n. 2, p. 126-132, 2005.

OETTGEN, P. Cardiac stem cell therapy, need for optimization of efficacy and safety monitoring. **Circulation**, v. 114, p. 353-8, 2006.

ORLIC, D. *et al.* Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. **Proceedings of The National Academy of Science of The U.S.A.**, v. 98, p. 10344-9, 2001.

ORLIC, D. *et al.* Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. **Nature**, v. 410, p. 701-5, 2001.

OZ, M. C.; ARTRIP, J. H.; BURKHOFF, D. Direct cardiac compression devices. **Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 21, n. 10, p. 1049-55, 2002.

OZBARAN, M.; OMAI, S. B.; NALBANTGIL, S. Autologous peripheral stem cell transplantation in patients with congestive heart failure due to ischemic heart disease. **European Journal of Cardiothoracic Surgery**, v. 25, n. 3, p. 342-50, 2004.

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

PIEGAS, L. S. *et al.* Risk factors for myocardial infarction in Brazil. **American Heart Journal**, v. 146, n. 2, p. 331-8, 2003.

PFEFFER, M. A.; BRAUNWALD, E. Ventricular remodeling after myocardial infarction: experimental observations and clinical implications. **Circulation**, v. 81, p. 1161-72, 1990.

RYAN, D. H.; COHEN, H. J. Bone marrow aspiration and morphology. In: HOFFMAN, R. *et al.* **Hematology**: basic principles and practice. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000. p. 2460-8.

ROSSI NETO, J. M. Avanços no tratamento da insuficiência cardíaca. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v. 14, n.1, p. 1-10, 2004.

SAHA, G. B. *et al.* Present assessment of myocardial viability by nuclear imaging. **Seminars in Nuclear Medicine**, v. 26, n. 4, p. 315-35, 1996.

SAM, J. *et al.* Heart cell implantation after myocardial infarction. **Coronary Artery Disease**, v. 16, n. 2, p. 85-91, 2005.

SCHÄCHINGER, V. *et al.* Normalization of coronary blood flow in the infarct-related artery after intracoronary progenitor cell therapy: intracoronary doppler substudy of the TOPCARE-AMI trial. **Clinical Research in Cardiology**, v. 95, n. 1, p. 13-22, 2006.

SEEGER, F. H. *et al.* Cell isolation procedures matter: a comparison of different isolation protocols of bone marrow mononuclear cells used for cell therapy in patients with acute myocardial infarction. **European Heart Journal** . v. 28, n. 6, p. 766-772, 2007.

SHILLER, N. B. *et al.* Recommendations for quantification of the left ventricle by two dimensional echocardiography: American Society of Echocardiography Committee on Standards, Subcommittee on Quantitation of Two-Dimensional Echocardiograms. **Journal of American Society of Echocardiography**, v. 2, p. 358-67, 1989.

SUTHERLAND, D. R. *et al.* The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. **Journal of Hematotherapy**, v. 5, n. 3, p.213-226, 1996.

SMITHS, P. C.; VAN GEUNS, R. J.; POLDERMANS, D. Catheter based intramyocardial injection of autologous skeletal myoblasts as a primary treatment of ischemic heart failure: clinical experience with six-month follow up. **Journal of The American College of Cardiology**, v. 42, p. 2063-9, 2003.

STAMM, C. *et al.* Autologous bone marrow stem cell transplantation for myocardial regeneration. **Lancet**, v. 361, p. 45-6, 2003.

STAMM, C. *et al.* CABG and bone marrow stem cell transplantation after myocardial infarction. **Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 52, p. 152-8, 2004.

STRAUER, B. E. *et al.* Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. **Circulation**, v. 106, p. 1913-18, 2002.

SUTTON, G. C. Epidemiologic aspects of heart failure. **American Heart Journal**, v.120, p. 1538-40, 1990.

TSE, H. F.; KWONG, Y. L.; CHAN, J. K. Angiogenesis in ischemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. **Lancet**, v. 361, p. 47-9, 2003.

VERFAILLIE, C. M. Anatomy and physiology of hematopoiesis. In: HOFFMAN, R. *et al.* **Hematology: basic principles and practice**. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000. p. 139-54.

VILLAS-BOAS, F. *et al.* Resultados iniciais do transplante de células de medula óssea para o miocárdio de pacientes com insuficiência cardíaca de origem chagásica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 87, n. 2, p. 159-66, 2006.

WOLLERT, K. C. *et al.* Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. **Lancet**, v. 364, p. 141-8, 2004.

ZORNOFF, L. A. M. *et al.* Remodelamento e seu impacto na progressão da disfunção ventricular. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v. 12, n. 3, p. 371-8, 2002.

DOCUMENTOS CONSULTADOS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR/ISO 14644-1**: Salas limpas e ambientes controlados associados. Parte 1: Classificação da limpeza do ar. Rio de Janeiro, 2005.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR/ISO 14644-4**: Salas limpas e ambientes controlados associados. Parte 4: Projetos, construção e partida. Rio de Janeiro, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. **Resolução 196** de 10 de outubro de 1996. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 1996.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC 153 de 14 de junho de 2004. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2004.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Sistema de Bibliotecas. **Teses, dissertações, monografias e outros trabalhos acadêmicos**. Curitiba: Editora UFPR, 2007. (Normas para apresentação de documentos científicos, 2).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Sistema de Bibliotecas. **Referências**. Curitiba: Editora UFPR, 2007. (Normas para apresentação de documentos científicos, 4).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Sistema de Bibliotecas. **Redação e editoração**. Curitiba: Editora UFPR, 2007. (Normas para apresentação de documentos científicos, 9).

APÊNDICES

APÊNDICE 1	- EQUIPE MULTIDISCIPLINAR	83
APÊNDICE 2	- MATERIAIS PARA COLETA E SEPARAÇÃO DA MEDULA ÓSSEA POR PACIENTE	85

APÊNDICE 1. EQUIPE MULTIDISCIPLINAR

A equipe responsável pelas etapas científicas do projeto foi assim constituída:

- Prof. Dr. Danton da Rocha Loures: Professor Titular do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Paraná. Chefe da Disciplina de Cirurgia Torácica e Cardiovascular da UFPR. Coordenador do Centro de Pesquisas em Células-Tronco;

- Prof. Dr. Cláudio Pereira da Cunha: Professor Titular do Departamento de Clínica Médica da Universidade Federal do Paraná, Chefe da Disciplina de Cardiologia. Colaborador do desenvolvimento dos protocolos clínicos;

- Dra. Maria Felicitas Niedfeld Rodriguez: Médica especialista em Imunopatologia. Chefe do Laboratório de Cultivo Celular do HC-UFPR, Professora Assistente do Departamento de Clínica Médica da UFPR. Responsável pelas rotinas laboratoriais de separação e cultivo celular;

- Dra. Mariester Malvezzi: Médica Mestre em Medicina Interna. Especialista em Citometria de Fluxo. Responsável pelos procedimentos de Identificação da População Celular do Aspirado de Medula Óssea;

- Dr. Ricardo João Westphal: Médico especialista em Cardiologia. Responsável pela execução dos Ecocardiogramas;

- Dra. Glaucia Taborda Francisco: Médica especialista em Cardiologia, responsável pelo ambulatório de Células-Tronco e auxílio na realização das cintilografias miocárdicas;

- Prof. Dr. Ronaldo da Rocha Loures Bueno: Chefe do Serviço de Hemodinâmica do HC-UFPR. Responsável pela realização das cineangiocoronariografias.

- Prof. Dr. José Zanis Neto: Professor Adjunto do Departamento de Clínica Médica da Universidade Federal do Paraná. Responsável pelo protocolo para obtenção da Medula Óssea;

- Dr. Luiz Carlos Wollner: Médico especialista em Medicina Nuclear. Chefe do

Laboratório de Medicina Nuclear do HC-UFPR;

- Dr. Lauro Ervilha: Médico especialista em Medicina Nuclear. Responsável pela realização das Cintilografias Miocárdicas;

- Dra. Alexandra Cristina Senegaglia: Bióloga. Doutorado em Ciências da Saúde. Atuação em pesquisas com cultivo celular. Responsável pela execução das rotinas de cultivo celular;

- Dra. Carmen Lucia Kuniyoshi Bebelatto: Bióloga. Doutorado em Ciências da Saúde. Atuação em pesquisas com Células Tronco. Responsável pela execução das rotinas de cultivo celular;

- Tamara Borgonovo: Bióloga. Mestre em Genética. Responsável pela preparação, separação e cultivo celular.

- Dra. Oáidia Adelina Nocetti Sermann: Médica Especialista em Cirurgia Cardiovascular. Responsável pelo atendimento dos pacientes no ambulatório de células-tronco.

APÊNDICE 2. MATERIAIS PARA COLETA E SEPARAÇÃO DA MEDULA ÓSSEA POR PACIENTE.

Reagente / Material	Volume/ Unidades
Agulha 25 x 0,8 mm	20
Agulha 13 x 0,45 mm	8
Antibiótico (Penicilina/Estreptomicina)	5 ml
Azul de Tripano	1 ml
Bolsa de Coleta	(só para sistema fechado)
Cell strainer 100 µm (peneira de Nylon)	1
Solução de Ficoll-Hypaque	400 ml
Filtro de 0,22 µm	1
Filtro de 0,45 µm	1
Gaze estéril	20
Heparina	5 ml
Lâminas para microscopia	6
Luva Cirúrgica	10
Meio RPMI / TC199	900 ml
Pipeta de 10 ml	25
Pipeta de 2 ml	5
Pipeta de 25 ml	6
Pipeta de 5 ml	5
Ponteira 1-100µl	3
Ponteira 1-200µl	3
Seringa 1 ml	25
Seringa 5 ml	5
Seringa 10 ml	5
Solução Salina estéril	Bolsa de 250 ml
Tubo criogênico	6
Tubo de 15 ml	4
Tubo de 50 ml	50

ANEXO



CEP/HC/UFPR



10 Anos

Curitiba, 01 de outubro de 2007.

Ilmo (a) Sr. (a)
Dr. Danton Richilin da Rocha Loures
Nesta

Prezado Pesquisador:

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "TRANSPLANTE DE CELULAS TRONCO DE MEDULA OSSEA NA MIOCARDIOPATIA ISQUEMICA" foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em reunião realizada no dia 31 de julho de 2007. O referido projeto atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96, e demais, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Ministério da Saúde.

Informamos que por tratar-se de um estudo da Área Temática Especial – Novos Procedimentos, e por um Genético de Células Autólogas o

CAAE: 0168.0.208.000-07

Registro CEP/HC: 1492.157/2007-07

Protocolo de Estudo versão 3 de julho de 2007; Termo de Consentimento de Livre e Esclarecido versão 3.0.

Conforme a Resolução 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do primeiro relatório: 02 de fevereiro de 2008.

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Renato Tambara Filho".

Renato Tambara Filho

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR