

## Transplante de Células da Medula Óssea na Insuficiência Cardíaca Chagásica: Relato da Primeira Experiência Humana

*Bone Marrow Cell Transplantation in Chagas' Disease Heart Failure: Report of The First Human Experience*

Fábio Vilas-Boas<sup>1</sup>, Gilson Soares Feitosa<sup>1</sup>, Milena B. P. Soares<sup>2</sup>, Joel Alves Pinho-Filho<sup>1</sup>, Augusto C. A. Mota<sup>1</sup>, Augusto José Gonçalves Almeida<sup>1</sup>, Marcus Vinícius Andrade<sup>1</sup>, Heitor Ghissoni Carvalho<sup>1</sup>, Adriano Dourado Oliveira<sup>1</sup>, Ricardo Ribeiro-dos-Santos<sup>2</sup>

Hospital Santa Izabel da Santa Casa de Misericórdia da Bahia<sup>1</sup>, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - FIOCRUZ/BA<sup>2</sup>, Salvador, BA - Brasil

### Resumo

**Fundamento:** A insuficiência cardíaca (IC) causada pela Doença de Chagas (DC) é uma cardiomiopatia inflamatória progressiva que afeta milhões de pessoas na América Latina. Estudos com modelos experimentais de IC devido à DC indicam que o transplante de células mononucleares derivadas da medula óssea (TCMO) pode reduzir a inflamação, fibrose e melhorar a função miocárdica.

**Objetivo:** O objetivo desse estudo foi avaliar, pela primeira vez em seres humanos, a segurança e a eficácia do TCMO no miocárdio de pacientes com IC devido à DC.

**Métodos:** Um total de 28 pacientes com IC devido à DC (idade média  $52,2 \pm 9,9$  anos), em classes funcionais III e IV (NYHA) foram submetidos ao TCMO através de injeção coronariana. Foram avaliados os efeitos na fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE), capacidade funcional, qualidade de vida, arritmias e parâmetros bioquímicos, imunológicos e neuro-humorais.

**Resultados:** Não houve complicações relacionadas diretamente ao procedimento. A FEVE passou de  $20,1 \pm 6,8\%$  para  $28,3 \pm 7,9\%$ ,  $p < 0,03$ , quando se comparou o período basal e 180 dias após o procedimento, respectivamente. No mesmo período, também foram observadas melhoras na classe funcional NYHA média ( $3,1 \pm 0,3$  para  $1,8 \pm 0,5$ ;  $p < 0,001$ ), score de qualidade de vida de Minnesota ( $50,9 \pm 11,7$  para  $25,1 \pm 15,9$ ;  $p < 0,001$ ), e no teste de caminhada de seis minutos ( $355 \pm 136$  m para  $437 \pm 94$  m;  $p < 0,01$ ). Não houve alterações nos marcadores de ativação inflamatória ou neuro-hormonais. Nenhuma complicação foi registrada.

**Conclusão:** Nossos dados sugerem que a injeção intracoronariana de células derivadas da medula óssea é segura e potencialmente efetiva em pacientes com IC devido à DC. A extensão do benefício, entretanto, parece ser discreta e necessita ser confirmada em ensaios clínicos randomizados, duplo-cegos, controlados com placebo. (Arq Bras Cardiol 2011;96(4):325-331)

**Palavras-chave:** Células-tronco, insuficiência cardíaca, doença de Chagas, terapia celular, cardiomiopatia dilatada.

### Abstract

**Background:** Heart failure due to Chagas' disease (HFCD) is a progressive inflammatory cardiomyopathy that affects millions of individuals in Latin America. Studies using mice models of HFCD indicate that bone marrow mononuclear cell transplantation (BMCT) may reduce inflammation, fibrosis, and improve myocardial function.

**Objective:** The purpose of this study was to evaluate, for the first time in humans, the safety and efficacy of BMCT to the myocardium of patients with HFCD.

**Methods:** A total of 28 HFCD patients (mean age  $52.2 \pm 9.9$  years) with NYHA class III and IV were submitted to BMCT through intracoronary injection. Effects on the left ventricle ejection fraction (LVEF), functional capacity, quality-of-life, arrhythmias, biochemical, immunological, and neuro-humoral parameters, were evaluated.

**Results:** There were no complications directly related to the procedure. LVEF was  $20.1 \pm 6.8\%$  and  $28.3 \pm 7.9\%$ ,  $p < 0.03$  at baseline and 180 days after the procedure, respectively. In the same period, significant improvements were observed in the NYHA class ( $3.1 \pm 0.3$  to  $1.8 \pm 0.5$ ;  $p < 0.001$ ), quality-of-life ( $50.9 \pm 11.7$  to  $25.1 \pm 15.9$ ;  $p < 0.001$ ), and in the six-minute walking test ( $355 \pm 136$  m to  $437 \pm 94$  m;  $p < 0,01$ ). There were no changes in markers of immune or neurohormonal activation. No complications were registered.

**Conclusion:** Our data suggest that the intracoronary injection of BMCT is safe and potentially effective in patients with HFCD. The extent of the benefit, however, appears to be small and needs to be confirmed in a larger randomized, double blind, placebo controlled clinical trial. (Arq Bras Cardiol 2011;96(4):325-331)

**Keywords:** Stem cells; heart failure; Chagas' disease; tissue therapy; cardiomyopathy, dilated.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Fábio Vilas-Boas •

Av. Sete de Setembro, 4161 - Barra - 41140-900 - Salvador, BA - Brasil

E-mail: fabiovilasboas@cardiol.br

Artigo recebido em 10/08/10; revisado recebido em 13/10/10; aceito em 19/10/10.

## Introdução

A Doença de Chagas (DC) é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e afeta milhões de pessoas na América Latina<sup>1,2</sup>. Devido à intensa imigração a partir de áreas endêmicas, a infecção associada à transfusão tem sido recentemente identificada como uma ameaça potencial nos EUA<sup>3</sup>. Dentre suas muitas manifestações, o envolvimento cardíaco é bastante relevante, sendo habitualmente incapacitante<sup>4</sup>. Tem sido estimado que um quarto dos pacientes infectados eventualmente desenvolva a forma avançada da doença cardíaca, a qual apresenta características da cardiomiopatia dilatada grave, com arritmias potencialmente fatais e fenômenos tromboembólicos pulmonares e sistêmicos<sup>5</sup>. As características macroscópicas dessa condição incluem cardiomegalia global, e áreas localizadas de aneurismas, especialmente na região apical. As características microscópicas dessa condição incluem focos disseminados de inflamação e fibrose<sup>6</sup>. O achado real do parasita nessa forma tardia da doença é pouco frequente, embora o uso de técnicas altamente sensíveis permita o reconhecimento de partes do parasita no miocárdio<sup>7</sup>. Esse achado e outros sugerem que o processo auto-imune tem um papel principal na fase crônica da doença<sup>8,9</sup>. No estágio avançado, o prognóstico é ruim e uma progressão inexorável para a condição refratária é frequentemente observada, a despeito de todos os recursos terapêuticos disponíveis atualmente<sup>10,11</sup>.

Com o recente progresso na técnica de transplante de células derivadas de medula óssea (TCMO) direcionado à doença cardíaca isquêmica<sup>12-14</sup>, surgiu a possibilidade de empregar a mesma técnica na doença cardíaca chagásica. Experimentalmente, tem sido demonstrado que em camundongos cronicamente infectados com a cepa colombiana de *T. cruzi*, a injeção de células autólogas mononucleares de medula óssea resultou em redução significativa das células inflamatórias e da fibrose intersticial no miocárdio<sup>15</sup>. Nesse modelo experimental, o transplante autólogo simultâneo de células-tronco co-cultivadas e mioblastos esqueléticos mostrou ser funcionalmente efetivo<sup>16</sup>.

O fator de estimulação de colônias de granulócitos (G-CSF) induz a mobilização das células-tronco da medula óssea para o sangue periférico, fazendo com que um grande número de células-tronco estejam disponíveis para reparação de danos<sup>17</sup>. Assim, a experiência anterior com TCMO na doença cardíaca isquêmica, bem como os resultados experimentais com o modelo da DC definiu o cenário para nosso estudo-piloto de fase 1, envolvendo o uso de TCMO em seres humanos com cardiopatia chagásica avançada<sup>18,19</sup>.

## Métodos

Realizamos um estudo clínico aberto, de fase 1, para testar a viabilidade, segurança e eficácia potencial do transplante de células derivadas da medula óssea para o miocárdio de pacientes com insuficiência cardíaca (IC) causada por cardiomiopatia chagásica. Os indivíduos incluídos no estudo eram de ambos os sexos, com idade variando de 20 a 70 anos e ICC causada por DC, com fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) < 40% no ecocardiograma, classes funcionais III e IV (NYHA), em terapia médica otimizada para ICC e haviam permanecido

estáveis nessa condição por pelo menos um mês antes do início dos procedimentos de investigação.

Os pacientes excluídos apresentavam condições sistêmicas que poderiam ter impacto nos resultados do tratamento ou nas análises dos procedimentos de investigação. Essas condições incluíam infecções ou neoplasias, doenças auto-imunes, doenças hematológicas prévias, doenças hepáticas, insuficiência renal moderada (creatinina > 2 mg/dl), implante de marcapasso biventricular para ressincronização cardíaca nos 90 dias anteriores ao início do estudo, mulheres em idade fértil e pacientes com doença arterial coronariana detectada por cineangiocoronariografia.

Uma avaliação clínica foi realizada no período basal e os seguintes dados clínicos e variáveis foram registrados: a) classe funcional (CF) da NYHA; b) escore de qualidade de vida medido pelo questionário *Minnesota Living with Heart Failure*<sup>20</sup>; c) variáveis hematológicas e bioquímicas; d) eletrocardiograma (ECG) de 12 derivações; e) ecocardiograma transtorácico; f) teste de caminhada de 6 minutos (TC6M)<sup>21</sup>; g) monitorização por Holter de 24 horas. Após o procedimento, os pacientes foram encaminhados à Unidade de Terapia Intensiva (UTI), onde foram monitorados por pelo menos 24 horas. Em casos sem intercorrências, os pacientes eram transferidos para o quarto, onde permaneciam por pelo menos cinco dias. Todas as avaliações foram repetidas após 180 dias.

Para verificar qualquer possibilidade de dano miocárdico causado pela injeção de células de medula óssea, mensurações seriadas (a cada seis horas durante as primeiras 24 horas) de marcadores de dano miocárdico (CK-MB e troponina I), bem como eletrocardiograma, foram realizados. Para investigar o desenvolvimento de arritmias cardíacas como complicação da injeção de células, os pacientes foram submetidos à eletrocardiografia ambulatorial (Holter) de 24 horas antes do procedimento e periodicamente depois.

O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da instituição e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa. Os pacientes foram incluídos no estudo apenas após terem sido totalmente informados sobre os procedimentos do mesmo e após assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

## Transplante de células mononucleares de medula óssea

Os pacientes foram encaminhados ao laboratório de cateterismo após jejum de 12 horas. Uma amostra de 50 ml de conteúdo de medula óssea foi aspirada de cada paciente através de 5 punções nas cristas ilíacas posteriores direita e esquerda, sob anestesia local e sedação intravenosa. O aspirado colhido foi filtrado para remoção de debris da medula óssea, como gordura e fragmentos ósseos (malha de aço inoxidável, *Washington University*) e submetido a centrifugação por gradiente de densidade com Ficoll Histopaque (Amersham Pharmacia, produto licenciado para uso clínico em humanos). A fração mononuclear isolada foi então diluída em solução fisiológica estéril e novamente centrifugada. Uma amostra foi utilizada para contagem celular e teste de viabilidade.

Ao final do processo, as amostras foram diluídas em 20 ml de solução fisiológica. Imediatamente antes da injeção intracoronariana, os pacientes foram submetidos

## Artigo Original

ao cateterismo cardíaco esquerdo por via femoral, seguida de angiografia coronariana. Os pacientes eram excluídos se houvesse estenose > 50% em qualquer artéria coronariana. A solução contendo as células foi injetada lentamente, durante 10 minutos, no sistema coronariano esquerdo e direito: 10 ml na artéria descendente anterior esquerda, 5 ml na artéria coronária direita e 5 ml na artéria circunflexa esquerda.

Vinte e cinco dias depois, os pacientes receberam injeções diárias subcutâneas de G-CSF (Granulokine®) humano por cinco dias, na dose de 5 µg/kg/dia.

O teste de caminhada de 6 minutos (TC6M) foi realizado de acordo com o protocolo utilizado por Bitner e cols.<sup>21</sup> no estudo SOLVD. Após um período de repouso de 15 minutos, um novo teste foi realizado e a média das distâncias caminhadas nos dois testes foi usada como resultado. A qualidade de vida (QV) foi avaliada por meio do questionário de Minnesota (*Minnesota Living with Heart Failure Questionnaire*). Todas as entrevistas foram realizadas pela mesma enfermeira pesquisadora. Os estudos ecocardiográficos foram conduzidos pelo mesmo observador, cego para exames anteriores e para o status do paciente no protocolo. A FEVE foi calculada de acordo com o método de Simpson modificado<sup>22</sup>.

TNF-alfa, IL-1-beta, IL-6, MMP-2 e MMP-9 foram analisados através de kits de imunoensaio disponíveis comercialmente (Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA). A vasopressina foi analisada através de kit EIA (*Ann Arbor*, MI, EUA). O peptídeo natriurético do tipo B (BNP) foi medido usando-se imunoensaio fluorescente rápido (Biosite Diagnostics Incorporated, San Diego, California, EUA). Todos os outros testes bioquímicos e hematológicos foram realizados utilizando-se kits disponíveis comercialmente.

### Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o software SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) para Windows versão 9.0. As variáveis contínuas foram apresentadas como médias ± desvios-padrão. A distribuição das variáveis foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Como as variáveis não apresentavam distribuição normal, testes não-paramétricos foram realizados. Todas as comparações foram bicaudais. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

Os autores tiveram acesso total aos dados e são responsáveis por sua integridade. Todos os autores leram e concordam com o manuscrito como foi elaborado.

### Resultados

Durante o período de estudo de seis meses, um total de 30 pacientes foi selecionado. Dois pacientes foram excluídos após a coleta de medula óssea: um paciente devido a doença arterial coronariana detectada durante o cateterismo e outro devido a problemas técnicos com o equipamento de cateterismo, o que impediu a injeção.

As características basais da população estudada são descritas na Tabela 1. Como mostrado, os pacientes se encontravam em estágio avançado da doença e apresentavam diversos marcadores de gravidade. Todos os pacientes estavam nas

classes funcionais III e IV, a despeito de tratamento médico otimizado e altas doses de diuréticos. Digoxina foi utilizada por 95% dos pacientes, furosemida isoladamente ou em combinação com outros medicamentos foi usada por 85% dos pacientes, IECA ou BRA por 85% e beta-bloqueadores por 55% dos pacientes. A capacidade funcional avaliada era muito limitada, com base na pequena distância percorrida durante o teste de caminhada de seis minutos e a QV estava significativamente comprometida, como indicado pelos altos escores obtidos no questionário de Minnesota. A função ventricular estava gravemente deprimida, com fração de ejeção muito baixa e diâmetro diastólico do VE aumentado no ecocardiograma. A presença de hiponatremia e disfunção renal caracterizaram ainda mais a grave condição dessa população.

Não houve complicações diretamente relacionadas à aspiração de conteúdo da medula óssea ou injeção de células. Uma média de  $2,4 \pm 1,2 \times 10^8$  células foram injetadas nas artérias coronárias. Testes de viabilidade mostraram que  $96 \pm 6,5$  % das células eram viáveis no momento da injeção. Não foram observadas alterações significativas nos marcadores de necrose miocárdica em 24 horas ou alterações eletrocardiográficas sugestivas de isquemia ou infarto.

A fim de verificar se o implante miocárdico de células-tronco estava associado a arritmias, o perfil arritmogênico foi avaliado através do número total de extrassístoles ventriculares em 24 horas, bem como seu padrão de recorrência e agrupamento. Nenhuma alteração significativa foi encontrada no perfil arritmogênico (Tabela 2).

Houve quatro mortes durante o período de seis meses de seguimento: paciente 04, sexo masculino, idade 37, hemorragia pulmonar e insuficiência respiratória; paciente 16, sexo feminino, idade 34, morte súbita; paciente 27, idade 69, sexo masculino, insuficiência cardíaca terminal; paciente 7, idade 67, infecção respiratória complicada por insuficiência renal e choque. Nenhuma associação causal direta foi estabelecida entre as mortes e o transplante de células.

**Tabela 1 - Características clínicas e laboratoriais dos pacientes**

	(n = 28)
Idade (anos)	52,2 ± 9,9
Sexo masculino (n)	24
CF NYHA (n)	
III	24
IV	4
TC6M (m)	355 ± 136
FEVE (%)	20,1 ± 6,8%
VDFVE (mm)	72,6 ± 8,9
QV	50,9 ± 11,7
Sódio sérico (mEq/l)	131 ± 7,6
BUN (mg/dl)	32,1 ± 17,2
Creatinina (mg/dl)	1,4 ± 0,4

BUN - nitrogênio uréico cardíaco; n - número de pacientes; CF - classe funcional (NYHA); QV - escore de qualidade de vida no questionário Minnesota; FEVE - fração de ejeção do ventrículo esquerdo; VDFVE - volume diastólico final do ventrículo esquerdo; Valores expressos em médias ± desvios-padrão.

**Tabela 2 – Arritmias ventriculares: basal e após 6 meses (número/24 h)**

Arritmia	Basal	Seis meses	Valor de p
EV totais	5.734 ± 6.568	6.160 ± 4.015	0,55
TV não-sustentada	61 ± 126	31 ± 42	0,70

EV - extrasístoles ventriculares; TV - taquicardia ventricular;  
Valores expressos em médias ± desvio-padrão.

Não houve neoplasias, doenças hematológicas, coagulopatias, ou qualquer outro tipo doença que pudesse ser atribuído à injeção de células ou seu implante.

A função ventricular, avaliada pela FEVE, mostrou uma melhora significativa, embora pequena, seis meses após o procedimento (Figura 1).

A QV avaliada pelo Questionário de Minnesota mostrou uma melhora acentuada no escore global após seis meses (Figura 2).

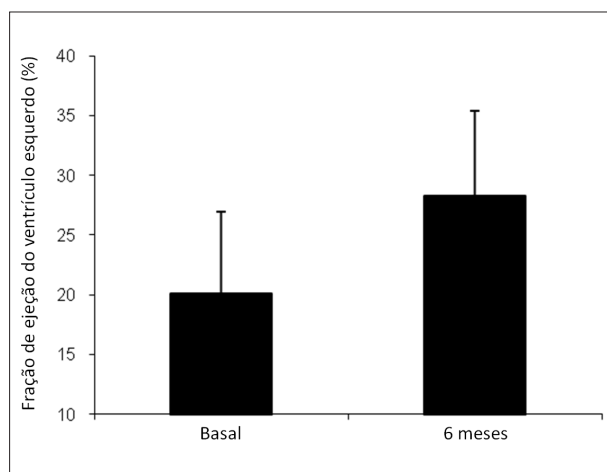
A capacidade funcional, medida pela distância percorrida no TC6M, mostrou uma melhora significativa, embora pequena, após seis meses (Figura 3).

Uma diminuição significativa na classe funcional média da NYHA foi observada após seis meses (Figura 4).

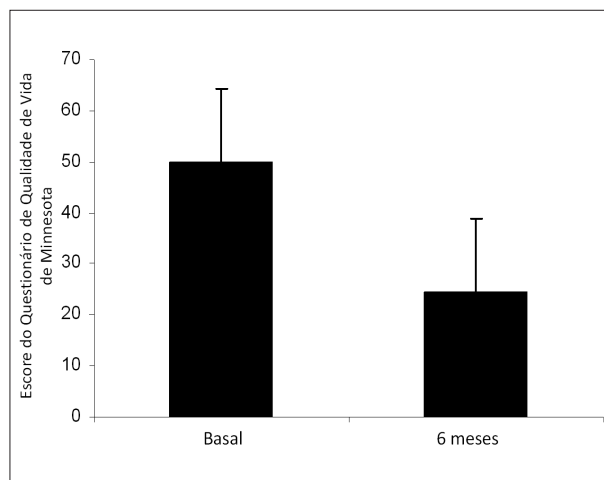
A análise bioquímica mostrou um aumento acentuado na concentração de sódio sérico durante o seguimento do estudo (Figura 5).

Entretanto, uma análise das concentrações de vasopressina não mostrou qualquer alteração significativa, das suas concentrações basais a 180 dias depois ( $193 \pm 53$  para  $182 \pm 44$  pg/ml,  $p = 0,38$ ). Houve uma tendência de aumento nos níveis de BNP ( $507 \pm 523$  para  $720 \pm 515$  pg/ml;  $p = 0,055$ ), a qual não foi acompanhada por outras evidências de congestão ou deterioração de função ventricular.

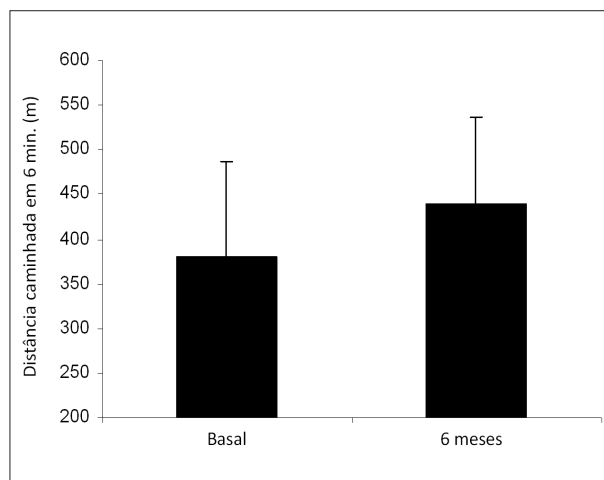
Uma análise do turnover da matriz extracelular mostrou aumento significativo nos níveis de MMP-2 (Figura 6), mas não mostrou alterações nos níveis de MMP-9 ( $1,6 \pm 1,8$  para  $2,3 \pm 2,8$  pg/ml,  $p = 0,20$ ).



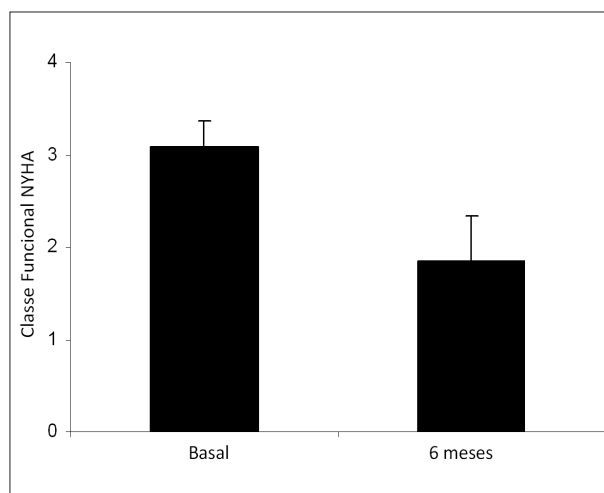
**Fig. 1 - Fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) medida através da ecocardiografia antes e após 6 meses de tratamento com CMO (Wilcoxon,  $p = 0,023$ ).**



**Fig. 2 - Escore de Qualidade de Vida (Questionário de Minnesota). (Wilcoxon,  $p < 0,001$ ).**



**Fig. 3 - Distância caminhada no teste de caminhada de seis minutos (TC6M) antes e depois do tratamento com CMO (Wilcoxon,  $p < 0,01$ ).**



**Fig. 4 - Classe Funcional (NYHA) média antes e depois do tratamento. (Wilcoxon,  $p < 0,001$ ).**

## Artigo Original

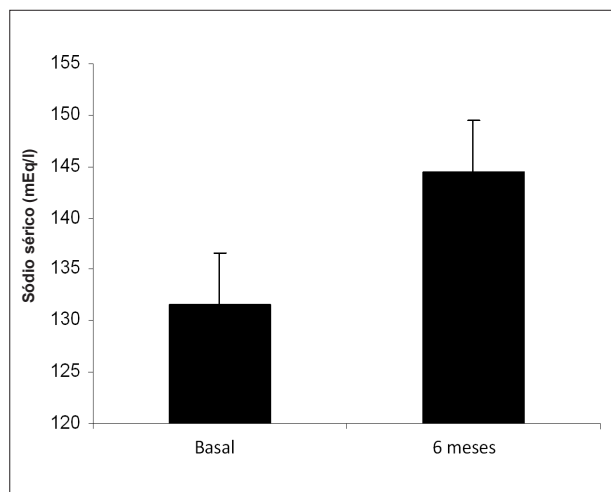


Fig. 5 - Concentração sódio sérico antes e após 6 meses de tratamento (Wilcoxon,  $p = 0,001$ ).

Não se observou diferença significativa nos níveis plasmáticos das citocinas IL-1-beta ( $12 \pm 14$  para  $13 \pm 13$  pg/ml,  $p = 0,54$ ) e IL-6 ( $40 \pm 74$  para  $28 \pm 48$  pg/ml,  $p = 0,21$ ), bem como nos níveis de TNF-alfa ( $3,4 \pm 3,5$  para  $3,8 \pm 4,2$  pg/ml,  $p = 0,38$ ).

## Discussão

Esse estudo demonstra que a terapia celular realizada através de injeção intracoronariana de células mononucleares derivadas de medula óssea autóloga é viável, segura e parece ser efetiva em pacientes com IC avançada causada por DC.

Nesses pacientes selecionados, com IC grave, estável e adequadamente tratados, o procedimento foi bem tolerado e não foram observadas arritmias, dano agudo ao miocárdio ou deterioração da função cardíaca após a injeção de células nas artérias coronárias. Esse achado é de grande relevância, considerando que estudos anteriores que utilizaram células-

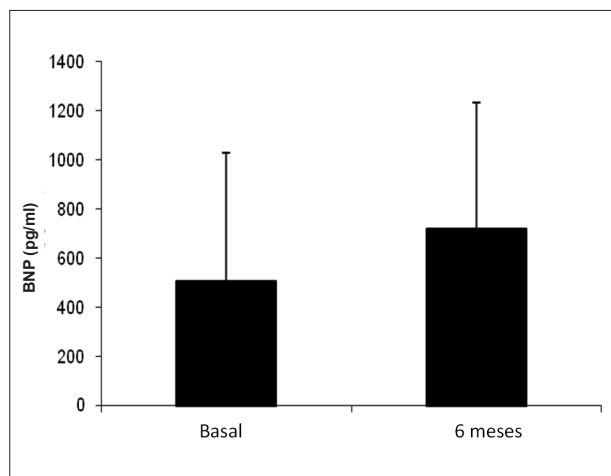


Fig. 6 - Níveis de MMP-2 antes e após 6 meses de tratamento com CMO (Wilcoxon,  $p = 0,003$ ).

tronco de músculo esquelético (células-satélite) apresentaram preocupações a respeito do desenvolvimento de arritmias em pacientes que foram submetidos a esse tipo de terapia celular<sup>23,24</sup>.

A despeito de estarem recebendo tratamento otimizado em doses adequadas, a CF dos pacientes e sua QV estavam gravemente comprometidas. Entretanto, houve melhoras consistentes em vários dos parâmetros avaliados. A QV melhorou de maneira consistente, como demonstrado pela avaliação feita através do questionário de Minnesota, o que reflete não apenas os parâmetros referentes à dispnéia, mas também os aspectos emocionais, psicológicos, econômicos e profissionais. O mesmo é verdadeiro em relação a variáveis mais objetivas, como a distância percorrida durante o teste de caminhada de 6 minutos, que mede a capacidade de exercício em níveis submáximos. Consistente com as variações mencionadas acima, houve uma melhora significativa na CF, avaliada por meio da classificação da NYHA.

Os aumentos na FEVE foram similares àqueles descritos em estudos anteriores. Duas recentes revisões sistemáticas e metanálises sobre terapia celular intracoronariana mostraram que esse tipo de terapia resulta em aumento modesto, embora significativo, na FEVE, quando comparado com controles (3 a 4%)<sup>25,26</sup>. No presente estudo, a FEVE média aumentou 5%, correspondendo a aproximadamente 20% do aumento relativo, já que a FEVE de nossos pacientes era significativamente mais baixa. A questão de se um pequeno aumento na FEVE é de importância clínica é um tema relevante. A maioria das intervenções que reduzem mortalidade na cardiologia, não aumenta a fração de ejeção de forma substancial. Os mecanismos por trás da melhora no desempenho ventricular são uma questão ainda a ser debatida. Dados recentes indicam que as células derivadas de medula óssea adotam características hematopoiéticas maduras<sup>27,28</sup>. Outro mecanismo proposto é que o TCMO pode exercer efeitos anti-apoptóticos parácrinos, induzindo modificações no ambiente imune<sup>29</sup>.

Considerando a bem conhecida dificuldade em controlar a hiponatremia com o tratamento usual, é digna de nota a observação da normalização do sódio sérico nesse estudo<sup>30,31</sup>. O mecanismo de correção parece ser independente do nível de estímulos de vasopressina, considerando que os níveis séricos de vasopressina permaneceram elevados e essas observações precisam ser avaliadas em outros estudos.

Um achado interessante do nosso estudo foi o comportamento dos níveis de BNP. Os níveis basais de BNP estavam elevados, embora quando considerada a gravidade da IC, seria esperado que estivessem ainda mais altos<sup>32,33</sup>. De certa forma surpreendente foi o fato de que, a despeito da melhora clínica consistente observada através de vários parâmetros, seus níveis não diminuíram de forma correspondente. Há alguma documentação demonstrando que, ocasionalmente, em ventrículos gravemente comprometidos, o nível de BNP pode não aumentar como esperado<sup>34</sup>. Os mecanismos considerados nessa situação podem incluir uma possível exaustão dos cardiomiócitos em produzir o BNP. Seguindo a mesma linha de pensamento, talvez o que tenhamos observado esteja de alguma forma relacionado a algum grau de regeneração de cardiomiócitos, re-estabelecendo

sua capacidade de produzir BNP, apesar da melhora clínica parcial. Entretanto, não podemos excluir a possibilidade da regeneração de outros componentes celulares que tenham contribuído para esse fato<sup>35</sup>.

Sabe-se que a inflamação tem um papel principal na patogênese da DC<sup>8</sup>. Entretanto, em nosso estudo, os biomarcadores inflamatórios não mostraram alteração em resposta ao TCMO. Esse achado sugere que a terapia celular não teve efeito sobre os mecanismos de inflamação ou então, outras fontes de hiperprodução dessas substâncias não são afetadas pela técnica utilizada. É interessante registrar, entretanto, que os níveis de MMP-2 aumentaram após o TCMO, o que pode se correlacionar com o aumento do turnover do colágeno<sup>36,37</sup>.

Considerando as características do presente estudo pioneiro de fase 1, a eficácia do procedimento deve ser avaliada em um desenho mais adequado, o qual idealmente deve incluir um grupo controlado por placebo para fins de comparação.

De qualquer forma, demonstramos em seres humanos com IC avançada causada por Doença de Chagas, o uso potencial de uma nova forma de terapia que precisa ser confirmada por observações futuras<sup>38</sup>.

## Referências

1. Dias JC, Silveira AC, Schofield CJ. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002;97(5):603-12.
2. Workshop on epidemiology and social determining factors of Chagas disease: basic information for surveillance and control policy in Latin America-- introduction, regional context, precedings, and recommendations. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102(Suppl.1):5-10.
3. Shulman IA, Appleman MD, Saxena S, Hiti AL, Kirchoff LV. Specific antibodies to *Trypanosoma cruzi* among blood donors in Los Angeles, California. *Transfusion*. 1997;37(7):727-31.
4. Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simoes MV. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation*. 2007;115(9):1109-23.
5. Pinto Dias JC. The treatment of Chagas disease (South American trypanosomiasis). *Ann Intern Med*. 2006;144(10):772-4.
6. Rassi A Jr, Rassi A, Little WC, Xavier SS, Rassi SG, Rassi AC, et al. Development and validation of a risk score for predicting death in Chagas' heart disease. *N Engl J Med*. 2006;355(8):799-808.
7. Soares MBP, Pontes-de-Carvalho L, Ribeiro-dos-Santos R. The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. *An Acad Bras Cienc*. 2001;73(4):547-59.
8. Andrade ZA, Andrade SC, Correa R, Sadigursky M, Ferrans VJ. Myocardial changes in acute *Trypanosoma cruzi* infection: ultrastructural evidence of immune damage and the role of microangiopathy. *Am J Pathol*. 1994;144(6):1403-11.
9. Ribeiro-Dos-Santos R, Mengel JO, Postol E, Soares RA, Ferreira-Fernandez E, Soares MB, et al. A heart-specific CD4+ T-cell line obtained from a chronic chagasic mouse induces carditis in heart-immunized mice and rejection of normal heart transplants in the absence of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol*. 2001;23(2):93-101.
10. Garcia S, Ramos CO, Senra JF, Vilas-Boas F, Rodrigues MM, Campos-de-Carvalho AC, et al. Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(4):1521-8.

## Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer a importante contribuição de Cristiane Carvalho e Aline Bernardes, do Hospital Santa Izabel e Daniele Brustollim, do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, por sua ajuda na seleção dos pacientes, coleta de dados e manuseio de amostras biológicas.

### Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes

### Fontes de Financiamento

O estudo foi financiado pelas seguintes instituições: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB); Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), e Instituto do Milênio de Bioengenharia Tecidual (IMBT).

### Vinculação Acadêmica

Não há vinculação deste estudo a programas de pós-graduação.

11. Rassi A Jr, Rassi A, Rassi SG. Predictors of mortality in chronic Chagas disease: a systematic review of observational studies. *Circulation*. 2007;115(9):1101-8.
12. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001;410(6829):701-15.
13. Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, Silva SA, Sousa AL, Mesquita CT, et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation*. 2003;107(18):2294-302.
14. Dimmeler S, Burchfield J, Zeiher AM. Cell-based therapy of myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(2):208-16.
15. Soares MB, Lima RS, Rocha LL, Takyia CM, Pontes-de-Carvalho L, de Carvalho AC, et al. Transplanted bone marrow cells repair heart tissue and reduce myocarditis in chronic chagasic mice. *Am J Pathol*. 2004;164(2):441-7.
16. Guarita-Souza LC, Carvalho KAT, Woitowicz V, Rebelatto C, Senegaglia A, Hansen P, et al. Simultaneous autologous transplantation of cocultured mesenchymal stem cells and skeletal myoblasts improves ventricular function in a murine model of Chagas disease. *Circulation*. 2006;114(1 Suppl.):I-120-4.
17. Leri A, Kajstura J, Anversa P, Frishman WH. Myocardial regeneration and stem cell repair. *Curr Probl Cardiol*. 2008;33(3):91-153.
18. Vilas-Boas F, Feitosa GS, Soares MB, Mota A, Pinho Filho JA, Almeida AJ, et al. Early results of bone marrow cell transplantation to the myocardium of patients with heart failure due to Chagas disease. *Arq Bras Cardiol*. 2006;87(2):159-66.
19. Leri A, Kajstura J, Anversa P. Bone marrow cells and cardiac repair. *Arq Bras Cardiol*. 2006;87(2):71-2.
20. Rector TS, Kubo SK, Cohn JN. Patient's self-assessment of their congestive heart failure, II: content, reliability and validity of a new measure, The Minnesota Living with Heart Failure Questionnaire. *Heart Fail*. 1987;3:198-209.
21. Bittner V, Weiner DH, Yusuf S, Rogers WJ, McIntyre KM, Bangdiwala SI, et al. Prediction of mortality and morbidity with a 6-minute walk test in patients with left ventricular dysfunction. *JAMA*. 1993;270(14):1702-7.

## Artigo Original

22. Schiller NB, Shah PM, Crawford M, DeMaria A, Devereux R, Feigenbaum H, et al. Recommendations for quantitation of the left ventricle by two-dimensional echocardiography: American Society of Echocardiography Committee on Standards. Subcommittee on Quantitation of Two-Dimensional Echocardiograms. *J Am Soc Echocardiogr.* 1989;2(5):358-67.
23. Murry CE, Wiseman RW, Schwartz SM, Hauschka SD. Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis. *J Clin Invest.* 1996;98(11):2512-23.
24. Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, Desnos M, Abergel E, Pouzet B, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41(7):1078-83.
25. Lipinski MJ, Biondi-Zoccai GC, Abbate A, Khianey R, Sheiban I, Bartunek J, et al. Impact of intracoronary cell therapy on left ventricular function in the setting of acute myocardial infarction: a collaborative systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *J Am Coll Cardiol.* 2007;50(18):1761-7.
26. Abdel-Latif A, Bolli R, Tleyjeh IM, Montori VM, Perin EC, Hornung CA, et al. Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med.* 2007;167(10):989-97.
27. Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature.* 2004;428(6983):668-73.
28. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature.* 2004;428(6983):664-8.
29. Gnechi M, He H, Liang OD, Melo LG, Morello F, Mu H, et al. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med.* 2005;11(4):367-8.
30. Packer M, Medina N, Yushak M. Correction of dilutional hyponatremia in severe chronic heart failure by converting-enzyme inhibition. *Ann Intern Med.* 1984;100(6):782-9.
31. Gheorghiadu M, Rossi JS, Cotts W, Shin DD, Hellkamp AS, Piña IL, et al. Characterization and prognostic value of persistent hyponatremia in patients with severe heart failure in the ESCAPE Trial. *Arch Intern Med.* 2007;167(18):1998-2005.
32. McCullough PA, Nowak RM, McCord J, Hollander JE, Herrmann HC, Steg PG, et al. B-type natriuretic peptide and clinical judgment in emergency diagnosis of heart failure: analysis from Breathing Not Properly (BNP) Multinational Study. *Circulation.* 2002;106(4):416-22.
33. Vilas-Boas F, Feitosa GS, Soares MB, Pinho-Filho JA, Nascimento T, Barojas MM, et al. Invasive and noninvasive correlations of B-type natriuretic peptide in patients with heart failure due to Chagas cardiomyopathy. *Congest Heart Fail.* 2008;14(3):121-6.
34. Miller WL, Hartman KA, Burritt MF, Burnett JC Jr, Jaffe AS. Troponin, B-type natriuretic peptides and outcomes in severe heart failure: differences between ischemic and dilated cardiomyopathies. *Clin Cardiol.* 2007;30(5):245-50.
35. Bruggink AH, de Jonge N, van Oosterhout MF, Van Wichen DF, de Koning E, Lahpor JR, et al. Brain natriuretic peptide is produced both by cardiomyocytes and cells infiltrating the heart in patients with severe heart failure supported by a left ventricular assist device. *J Heart Lung Transplant.* 2006;25(2):174-80.
36. Fielitz J, Leuschner M, Zurbrugg HR, Hannack B, Pregla R, Hetzer R, et al. Regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors in the left ventricular myocardium of patients with aortic stenosis. *J Mol Med.* 2004;82(12):809-20.
37. Martos R, Baugh J, Ledwidge M, O'Loughlin C, Conlon C, Patle A, et al. Diastolic heart failure: evidence of increased myocardial collagen turnover linked to diastolic dysfunction. *Circulation.* 2007;115(7):888-95.
38. Tura BR, Martino HF, Gowdak LH, dos Santos RR, Dohmann HF, Krieger JE, et al. Multicenter randomized trial of cell therapy in cardiopathies - MiHeart Study. *Trials.* 2007;8:2.