

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA

FABIANA BERGAMIN MUCCILLO

**CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DA
FRAÇÃO MONONUCLEAR DA MEDULA ÓSSEA DE
PACIENTES COM CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA
CRÔNICA**

Rio de Janeiro

2013

Caracterização Imunofenotípica da Fração Mononuclear da Medula Óssea de Pacientes com Cardiomiopatia Chagásica Crônica

FABIANA BERGAMIN MUCCILLO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas, área de concentração Cardiologia e Infecções, oferecido pelo Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ / Instituto Nacional de Cardiologia – INC para obtenção do grau de Mestre em Cardiologia e Infecção.

Orientadores:

Prof. Antonio Carlos Campos de Carvalho

Dra. Patrícia Cristina dos Santos Costa

Rio de Janeiro

2013

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

M942 Muccillo, Fabiana Bergamin

Caracterização imunofenotípica da fração mononuclear da medula óssea de pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica / Fabiana Bergamin Muccillo. – Rio de Janeiro, 2013.

xix, 138 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Pós-Graduação em Doenças Infecciosas, 2013.

Bibliografia: f. 109-122

1. Doença de Chagas. 2. Imunofenotipagem. 3. Cardiopatia chagásica crônica. I. Título.

CDD 616.9363

FABIANA BERGAMIN MUCCILLO

**Caracterização Imunofenotípica da Fração
Mononuclear da Medula Óssea de Pacientes com
Cardiomiopatia Chagásica Crônica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas, área de concentração Cardiologia e Infecções, oferecido pelo Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ / Instituto Nacional de Cardiologia – INC para obtenção do grau de Mestre em Cardiologia e Infecção.

Orientadores:

Prof. Antonio Carlos Campos de Carvalho

Dra. Patrícia Cristina dos Santos Costa

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

**Prof. Dr. Ademir Batista da Cunha – Membro da Banca Examinadora e
Presidente**

Doutor em Medicina / Cardiologia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Prof^a. Dra. Cristiane Del Corso – Membro da Banca Examinadora

Doutora em Ciências Biológicas / Fisiologia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

**Prof^a. Dra. Elizabeth Soares da Silva Magalhães – Membro da Banca
Examinadora**

Doutora em Imunologia pelo Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IMPG/UFRJ)

Prof. Dr. Fernando Eugênio Cruz – Suplente Interno

Doutor em Medicina / Cardiologia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

A minha família pelo amor incondicional.

Ao meu marido pelo apoio científico e amoroso em todas as horas.

Aos meus filhos por iluminarem minha vida.

A todos que me acompanham e desejam, verdadeiramente, meu bem.

Ao essencial.

AGRADECIMENTOS

Escrever uma dissertação é uma experiência enriquecedora e um desafio, mesmo para quem trabalha nessa área há tantos anos e ao lado de brilhantes pesquisadores como eu. Entretanto, o maior desafio é conseguir agradecer a todas as pessoas que me ajudaram ao longo dessa jornada e, no meu caso, me considero uma pessoa de muita sorte, pois tenho muitos a agradecer.

Preliminarmente, quero agradecer a Deus pelo dom da vida.

Aos meus pais Carlos Fernando e Eloisa por me ensinarem a amar. E principalmente a minha mãe que sempre esteve ao meu lado de corpo e alma, acreditando e apostando em mim. A vocês, meu amor e minha eterna gratidão.

Aos meus irmãos Fernando André e Elisa por sempre aguentarem uma irmã “cientísta” e por tornarem minha vida mais divertida.

Ao meu marido, Igor, meu companheiro e mestre que me ensinou tanto e que compartilha o mais importante comigo... a vida!

Aos meus filhos, Camila, Raphael e Catharina pelo simples fato de existirem na minha vida e serem meus. Obrigada por entender, consolar e ajudar essa mãe estressada que ama vocês incondicionalmente.

Ao meu orientador e eterno “chefe”, Antonio Carlos Campos de Carvalho, minha admiração, respeito e carinho para sempre.

À Patrícia Cristina dos Santos Costa, minha 'sempre' orientadora e amiga. Fico feliz por ter conquistado sua amizade e carinho e por você me manter na linha. Somos ótimas!

À Elizabeth Soares da Silva Magalhães que me incentivou, acudiu e orientou quando eu mais precisava. Sua amizade é um presente iluminado.

Aos membros da banca que, em suas especialidades, transferiram ao longo desses anos seus conhecimentos a mim e a tantos outros alunos. Compartilhar conhecimento é um dom de vocês!

A minha querida amiga e colega de coordenação, Nena... sem palavras para seu carinho comigo e por todos ensinamentos de vida. Adoro você, veia!

A Lais por me ajudar junto ao IPEC e pelo carinho com que fez isso.

A Letícia Basciano por sua prática e praticidade que mantiveram, muitas vezes, meu foco.

A todas as pessoas que me apoiaram, me deram suporte (Iolanda e sua hóspede), me deram força para não desistir e continuar sorrindo sempre.

A todos os meus amigos, parentes e colegas de trabalho. Não viveria sem a amizade de vocês.

E, por fim, a todos aqueles que por um lapso não mencionei, mas que colaboraram comigo: abraços fraternos a todos!

"Nós somos o que fazemos repetidas vezes.
Portanto, a excelência não é um ato, mas
um hábito" – *Aristóteles*

RESUMO

As cardiopatias crônicas estão nos primeiros lugares da lista de doenças com elevado índice de morbimortalidade mundial. Dentre elas, a doença de Chagas, considerada negligenciada pela Organização Mundial de Saúde, integra esse grupo, e afeta, aproximadamente, nove milhões de brasileiros, sendo que entre esses, 30% poderão desenvolver algum grau de comprometimento cardíaco durante a fase crônica da doença. O acometimento cardíaco da doença é caracterizado por uma resposta inflamatória exacerbada que leva à destruição progressiva do miocárdio, resultando em insuficiência cardíaca congestiva (ICC). O único tratamento disponível para pacientes, nesse estágio da doença, seria o transplante cardíaco, com todas as suas complicações clínicas e sócio-econômicas. Nesse contexto, surge a terapia celular como alternativa terapêutica. Estudos na Bahia comprovaram segurança no uso da terapia celular em cardiopatas chagásicos. A partir deles, iniciou-se, no Brasil, o Estudo Multicêntrico Randomizado de Terapia Celular em Cardiopatias (EMRTCC), com o objetivo de verificar a eficácia do tratamento com células mononucleares de medula óssea (CMMO) na cardiopatia chagásica e em mais três outras cardiopatias. Diversos estudos com CMMO de pacientes com cardiopatia isquemia crônica e aguda demonstraram diferenças expressivas em parâmetros importantes quando comparados a CMMO de indivíduos normais, tais como: a capacidade de migração e de formação de colônias após implante. O nosso trabalho analisou a fração mononuclear das CMMO extraídas dos pacientes portadores da doença de Chagas crônica para o EMRTCC no Instituto Nacional de Cardiologia (INC), visando caracterizar fenotipicamente as linhagens celulares da mesma. Averiguamos o percentual de células precursoras e o perfil leucocitário dessa fração, através da imunofenotipagem por citometria de fluxo. A fim de comparação, utilizamos amostras da mesma fração extraída de medulas de doadores normais e pacientes do EMRTCC com cardiopatia isquêmica crônica. Concluímos que pacientes com doença de Chagas submetidos à terapia celular apresentam um perfil hematopoiético com produção de todas as linhagens constitutivas da medula óssea, além de apresentarem atividades funcionais de caráter imunológico, tanto de resposta inata, quanto adaptativa, esperadas em pacientes acometidos pela cardiopatia chagásica crônica.

ABSTRACT

Chronic heart diseases occupy the first places in the list of diseases with high morbidity and mortality rate worldwide. Among them, Chagas disease, considered neglected by the World Health Organization, integrates this group, and affects approximately nine million Brazilians, among whose, 30% will develop some degree of cardiac involvement during the chronic phase of the disease. The cardiac disease is characterized by an exaggerated inflammatory response that leads to the progressive destruction of the myocardium, resulting in congestive heart failure. The only treatment available to patients at this stage of the disease would be heart transplantation, with all its clinical and socio-economic complications. In this context cell therapy is an alternative therapy. Studies in Bahia proved cell therapy in cardiac chagasic patients to be safe and based on them, began in Brazil, the Randomized Multicenter Study of Cell Therapy in Cardiopathies (EMRTCC), in order to verify the efficacy of treatment with mononuclear cells Bone marrow (BMMC) in Chagas heart disease and in three other heart diseases. Several studies with BMMC from patients with acute and chronic ischemic heart disease demonstrated significant differences in important parameters when compared to BMMC from normal patients, such as: migration ability and colony formation after implantation. Our study analyzed the mononuclear fraction of BMMC extracted from Chagasic patients enrolled in the EMRTCC at the National Cardiology Institute (INC), to characterize these cells phenotypically. Using flow cytometry we established the percentage of precursor cells and white blood cell count in this fraction. For comparison, we used the same fraction extracted from the marrow of normal donors and EMRTCC patients with chronic ischemic heart disease. We conclude that patients with Chagas disease who underwent stem cell therapy have a profile with production of all hematopoietic lineages constituents of bone marrow, besides presenting characteristic of both innate, as well adaptive immune responses, expected from patients suffering from Chagas heart chronic.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	DOENÇA DE CHAGAS	4
1.1.1	<i>Fase Aguda</i>	8
1.1.2	<i>Fase Crônica</i>	11
1.1.3	<i>Sistema Imune na Doença de Chagas</i>	13
1.1.4	<i>Tratamento para a Doença de Chagas</i>	15
1.1.5	<i>Perspectivas Terapêuticas</i>	16
1.2	DOENÇA ISQUÊMICA CRÔNICA	18
1.3	TERAPIA CELULAR	20
1.3.1	<i>Célula-tronco</i>	21
1.3.1.1	Definições de Células-tronco	23
1.3.1.1.1	Clonalidade	23
1.3.1.1.2	Potencialidade	24
1.3.1.2	Características das Células-tronco	25
1.3.1.3	As Células-tronco e seus Nichos	26
1.3.1.4	As Fontes e Diferentes Tipos de Células-tronco	27
1.3.1.4.1	Células-tronco Embrionárias (ESC)	28
1.3.1.4.2	Fetal	29
1.3.1.4.3	Cordão Umbilical	29
1.3.1.4.4	Células-tronco Adultas	29
1.3.1.4.5	Pesquisas com Células-tronco de Medula Óssea em Cardiopatias Crônicas	36
1.4	IMUNOFENOTIPAGEM	38
1.4.1	<i>Especificidade Imunofenotípica</i>	42
2	OBJETIVO GERAL	45
3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45

4	MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1	DESENHO DO ESTUDO	46
4.2	ISOLAMENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA (CMMO):.....	49
4.3	QUANTIFICAÇÃO, VIABILIDADE E CRIOPRESERVAÇÃO CELULAR	53
4.3.1	<i>Contagem das Células Nucleadas Totais:</i>	53
4.3.2	<i>Análise de viabilidade celular:</i>	54
4.3.3	<i>Criopreservação das Células:</i>	55
4.3.4	<i>Uso da Câmara de Neubauer para Contagem e Viabilidade Celular</i>	57
4.3.5	<i>Cálculos de Número de Células Mortas:</i>	58
4.3.6	<i>Protocolo de Preparo de Reagentes</i>	59
4.3.6.1	<i>Líquido do Turk:</i>	59
4.3.6.2	<i>Solução de Azul de Tripan</i>	59
4.4	INFUSÃO CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA (CMMO):.....	60
4.4.1	<i>Protocolo de Infusão das CMMO para cardiomiopatia chagásica:</i>	60
4.4.1.1	<i>Preparo do Paciente para o Cateterismo:</i>	60
4.4.1.2	<i>Liberação por Cateterismo das CMMO</i>	61
4.4.2	<i>Protocolo de Infusão das CMMO para Cardiomiopatia Isquêmica:</i>	62
4.5	IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO	63
4.5.1	<i>Citometro de Fluxo</i>	63
4.5.2	<i>Marcação Imunofenotípica</i>	65
4.5.3	<i>Painel Imunofenotípico</i>	66
4.5.4	<i>Análise Multiparamétrica</i>	69
5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	75
6	RESULTADOS.....	76
6.1	PACIENTES E INFUSÃO DE CMMO:	76
6.2	ISOLAMENTO DE CMMO	76
6.3	CARACTERIZAÇÃO POR CITOMETRIA DE FLUXO:	77
6.3.1	<i>Análise qualitativa</i>	78

6.3.2	<i>Análise Quantitativa</i>	86
6.3.2.1	Cardiopatia Chagásica Crônica x Doadores Normais	86
6.3.2.2	Cardiopatia Chagásica x Cardiopatia Isquêmica Crônica.....	90
6.3.2.3	Cardiopatia Isquêmica Crônica x Doadores Normais	95
7	DISCUSSÃO	99
8	CONCLUSÃO	108
9	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	109
10	ANEXOS	123

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Triatomíneos.....	4
Figura 2: Estágios da forma de vida do <i>T. cruzi</i>	5
Figura 3: Ciclo evolutivo do <i>T. cruzi</i>	6
Figura 4: Sinal de Romãña.	9
Figura 5: Histiologia na cardiopatia chagásica.....	10
Figura 6: Alterações cardíacas na cardiopatia chagásica.....	13
Figura 7: Tipos de divisão de células-tronco.....	23
Figura 8: Classificação das células-tronco humanas.....	28
Figura 9: Células-tronco de medula óssea.	34
Figura 10: Tipos celulares utilizados em ensaios clínicos.....	35
Figura 11: Especificação de Fluorocromos.....	42
Figura 12: Critérios de inclusão e exclusão – ISQ/EMRTCC.....	47
Figura 13: Critérios de inclusão e exclusão – CHG/EMRTCC	48
Figura 14: Etapas do aspirado e isolamento de CMMO.	52
Figura 15: Camara de Neubauer	57
Figura 16: Visão anterior das artérias coronárias.	62
Figura 17: Citometro de Fluxo	65
Figura 18: Marcação Imunofenotípica	66
Figura 19: Fração mononuclear isoladas da medula óssea.....	77
Figura 20: Precursoras da CMMMO	80
Figura 21: Neutrófilos da CMMO	81
Figura 22: Monócito e precursores monocíticos da CMMO	82

Figura 23: Linfócitos T e subpopulações da CMMO	83
Figura 24: Linfócitos B da CMMO	84
Figura 25: Células <i>Natural Killers</i> da CMMO	85
Figura 26: Mononucleares e neutrófilos da CMMO de CHG X DN	86
Figura 27: Linhagens de células precursoras da CMMO de CHG X DN.....	87
Figura 28: Monócitos da CMMO de CHG X DN.....	88
Figura 29: Linfócitos T e subpopulações da CMMO de CHG X DN.....	89
Figura 30: Linfócitos B e células NK da CMMO de CHG X DN	90
Figura 31: Mononucleares e neutrófilos da CMMO de CHG X ISQ	91
Figura 32: Linhagem de células precursoras da CMMO de CHG X ISQ	92
Figura 33: Monócitos da CMMO de CHG X ISQ.....	93
Figura 34: Linfócitos T e subpopulações da CMMO de CHG X ISQ.....	94
Figura 35: Linfócitos B e células NK da CMMO de CHG X ISQ	95
Figura 36: Mononucleares e neutrófilos da CMMO de DN X ISQ.....	95
Figura 37: Linhagem de células precursoras da CMMO de DN X ISQ	96
Figura 38: Monócitos da CMMO de DN X ISQ	97
Figura 39: Linfócitos T e subpopulações da CMMO de DN X ISQ	97
Figura 40: Linfócitos B e células NK da CMMO de DN X ISQ	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Grupos de diferenciação (CD) e suas especificações	43
Tabela 2: Criopreservação automática	56
Tabela 3: Painel Imunofenotípico do estudo.....	67
Tabela 4: Perfil imunofenotípico das populações celulares estudada.	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Alofococianina (do inglês <i>Allophycocyanin</i>)
BSCUP	Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário
CCC	Cardiopatia chagásica crônica
CD	Grupo de Diferenciação (do inglês <i>Cluster of differentiation</i>)
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CF	Citômetro de Fluxo
CFU	Unidades formadoras de colônias
CHG	Pacientes portadores da doença de Chagas crônica
CMF	Citometria de Fluxo
CMMO.	Células mononucleares de medula óssea
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CT	Células-tronco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DN	Doadores normais
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
EMRTCC	Estudo Multicêntrico Randomizado de Terapia Celular em Cardiopatias
EPC	Células Precursoras Endotelias (do inglês <i>endothelial progenitor cells</i>)
EPO	Eritropoetina
ESC	Células-tronco embrionárias (do inglês <i>embryonic stem cells</i>)
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FC	Frequência cardíaca
FEVE	Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FITC	Isocianato de fluoresceína (do inglês <i>fluorescein isothiocyanate</i>)
FSC	Dispersão frontal (do inglês <i>forward scatter</i>)
G-CSF	Fator estimulante de colônia de granulócitos (do inglês <i>granulocyte colony-stimulating factor</i>)
HLA	Antígeno leucocitário humano (do inglês <i>human leukocyte antigen</i>)
HSC	Células-tronco hematopoiéticas (do inglês <i>hematopoietic stem cells</i>)
IBCCF	Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	Insuficiência cardíaca
ICC	Insuficiência cardíaca congestiva
ICC	Insuficiência cardíaca congestiva
IECA	Inibidores da Enzima Conversora da Angiotensina
IgG	Imunoglobulina G
IMPG	Instituto de Microbiologia Paulo de Góes

INC	Instituto Nacional de Cardiologia
INCA	Instituto Nacional do Cancer
IPEC	Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
ISHAGE	<i>International Society for Hematotherapy and Graft Engineering</i>
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
ISQ	Pacientes isquêmicos
LASER	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>
MAPC	Células Progenitoras Adultas Multipotentes (do inglês multipotent adult progenitor cell)
MSC	Células-tronco mesenquimais (do inglês <i>Mesenchymal stem cells</i>)
NIH	<i>National Institute of Health</i>
NK	Células assassinas naturais (do inglês <i>Natural Killer cells</i>)
NYHA	<i>New York heart association</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAHO	Organização Pan Americana de Saúde (do inglês Pan American Health Organization)
PBS	Tampão salinatamponado com fosfato (do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PE	Ficoeritrina (do inglês <i>Phycoerytrin</i>)
PE-Cy5	Ficoeritrina ciano 5 (do inglês <i>Phycoerytrin cyano 5</i>)
PE-Cy7	Ficoeritrina ciano 7 (do inglês <i>Phycoerytrin cyano 7</i>)
PMT	Foto multiplicador
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês <i>Ribonucleic acid</i>)
SBC	Sociedade Brasileira de Cardiologia
SITC	Sociedade Internacional de Terapia Celular
SSC	Dispersão lateral (do ingles <i>Side scatter</i>)
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
VEGF	Fator de crescimento de endotélio vascular (do inglês <i>vascular endothelial growth fator</i>)
WHO	Organização Mundial de Saúde (do inglês World Health Organization)

1 Introdução

As doenças crônicas representam um problema sócio-econômico de grande impacto mundial. Segundo a definição da Organização Mundial de Saúde (OMS), são doenças permanentes, causadoras de incapacidade e / ou deficiências residuais. Causadas por alterações patológicas irreversíveis que exigem uma reabilitação especial do doente por longos períodos de supervisão, observação e cuidados (WHO, 2005). Doenças crônicas, como doenças cardíacas, acidente vascular cerebral, câncer, doenças respiratórias e diabetes, representam a principal causa de morte e incapacidade no mundo, abrangendo cerca de 60% dos óbitos mundiais, atingindo homens e mulheres em iguais proporções (PAHO, 2010).

O aumento no número de pacientes com doenças crônicas, cardíacas ou não, pode ser, em parte, atribuído à melhora nas condições de vida e aos avanços tecnológicos e científicos na área de saúde, que aumentam a expectativa de vida da população. As mudanças no padrão comportamental da população, devido aos processos de urbanização, industrialização, desenvolvimento econômico e globalização alimentar corroboram para esse aumento. Porém, com a vida moderna, veio, também, um estilo de vida sedentário, dieta desequilibrada e consumo de tabaco, fatores de risco que os pacientes acometidos por esse grupo de doenças têm em comum.

As doenças cardiovasculares, dentre as doenças crônicas, são as que tem o maior índice de morte no mundo. Mais de 17 milhões de pessoas morreram de doenças cardiovasculares em 2008 (WHO, 2011). As doenças cardiovasculares

formam um grupo heterogêneo, agrupando enfermidades de caráter agudo e crônico. Entre as infecções agudas, as mais importantes em termos de tamanho da população afetada são de origem isquêmica. Já entre as formas crônicas, as cardiomiopatias isquêmicas e dilatadas são as mais prevalentes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Independente do caráter agudo ou crônico, as cardiopatias podem acarretar sequelas incapacitantes e de alto custo social.

Outra cardiopatia negligenciada, porém, de grande impacto para saúde mundial, é a Cardiomiopatia Chagásica. Milhões de pessoas estão infectadas no mundo, principalmente na América Latina onde a doença de Chagas é endêmica. Mais de 25 milhões de pessoas estão em risco de adquiri-la. Nas últimas décadas, tem se detectado, cada vez mais, essa doença no Canadá, nos Estados Unidos Unidos, na Europa e nos países do Pacífico Ocidental, principalmente, devido à migração de pessoas infectadas oriundas de países endêmicos, dessa forma, demonstrando que seu estatus de negligenciável deveria ser alterado (WHO, 2011). Esse fato alimenta a incidência anual da cardiopatia chagásica que é de, aproximadamente, 200 mil novos casos registrados em quinze países (Argolo *et al*, 2007).

Estima-se que haja cerca de 12 a 14 milhões de pessoas infectadas na América Latina, distribuídas por 18 países americanos (Dias *et al*, 2007). Dos infectados, cerca de 20.000 morrem a cada ano, lembrando que, dos pacientes portadores da doença de Chagas crônica, aproximadamente 30% evoluem para doença cardiovascular. (Dias *et al*, 2002). No Brasil, estudos atuais demonstram prevalência da infecção inferior a 0,2% (Dias *et al*, 2007). Esse decréscimo se deu pela progressão do controle vetorial e transfusional, programas que tiveram início na

década de 80. Em 2006, o principal vetor (*T. infestans*) foi praticamente eliminado e a transmissão via transfusional é praticamente inexistente, pois 99% dos bancos de sangue brasileiros fazem seleção prévia de doadores.

Surgiram surtos de doença de Chagas aguda, relacionados à ingestão de alimentos contaminados (caldo de cana, açaí, bacaba, entre outros) e casos isolados por transmissão vetorial extradomiciliar, especialmente, na Amazônia Legal, devido ao foco silvestre do vetor do gênero *Rhodnius*. No período de 2000 a 2011, segundo descrição no portal da saúde do Sistema Único de Saúde (SUS), foram registrados, no Brasil, 1.252 casos de doença de Chagas aguda. Destes, 70% (877/1.252) foram por transmissão oral, 7% por transmissão vetorial (92/1.252), e em 22% (276/1.252) não foi identificada a forma de transmissão. Mais de 95% desses novos casos por transmissão oral ocorreram em apenas dois Estados: Pará e Amapá, sendo o processamento de açaí e outros alimentos o principal foco de contágio (<http://portal.saude.gov.br>).

Porém, o que predomina, ainda, no Brasil, são os casos crônicos de doença de Chagas decorrentes de infecções adquiridas no passado, com aproximadamente três milhões de indivíduos infectados.

Mesmo com a queda significativa da incidência, a Doença de Chagas, em nosso país, ainda é um dos fatores mais importantes para o desenvolvimento de insuficiência cardíaca congestiva (ICC), sendo um dos principais contribuintes do quadro nosológico da insuficiência cardíaca (IC). Segundo Soares e colaboradores, os pacientes portadores de IC causada por cardiopatia chagásica crônica evoluem com grave disfunção sistólica devido à miocardite crônica e consequente fibrose (Soares *et al*, 2004).

Os dados expostos evidenciam a relevância destas doenças que se mostram dispendiosas para as nações, além de demonstrarem significativa importância nos quadros de morbi-mortalidade mundial. Enfatizando a cardiopatia chagásica e a cardiopatia isquêmica crônica, esse trabalho pretende inseri-las em um novo contexto, o das novas alternativas terapêuticas que possam vir a amenizar este grande problema de saúde pública mundial.

1.1 Doença de Chagas

A Doença de Chagas é a infecção parasitária causada pelo protista cinetoplástida flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). O seu ciclo de vida inclui a passagem obrigatória por vários hospedeiros mamíferos e insetos hematófagos, como *Triatoma infestans*, conhecido no Brasil como barbeiro, da família dos Reduvidos - Reduviidae, pertencentes aos gêneros *Triatoma* (Figura 1). Também são vetores da doença o *Rhodnius prolixus*, segundo vetor mais disseminado na América Sul e Central e o *Panstrongylus* (Brener *et al*, 2000). Essa doença pode ser considerada uma antropozoonose, devido a sua ocorrência, e também está intimamente relacionada a alterações produzidas pelo ser humano no meio ambiente, bem como, por desigualdades econômicas (Argolo *et al*, 2007).

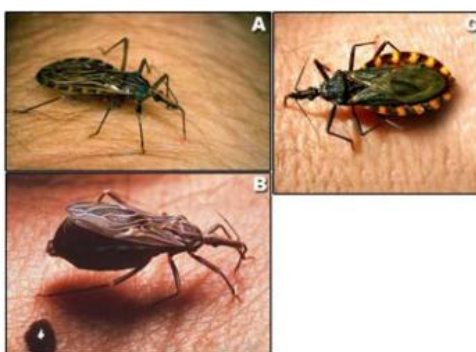


Figura 1: Triatomíneos.
Em A e B, *Rhodnius prolixus* e em C, *Triatoma infestans*. Fonte: www.sciencephoto.com

A forma mais comumente descrita de infecção pelo parasito ocorre quando o homem é picado pelo triatomídeo contaminado. Neste momento, o barbeiro elimina os tripomastigotas metacíclicos em suas fezes, sendo essas as formas infectantes que podem penetrar pelas mucosas, quando o homem leva as mãos contaminadas aos olhos ou nariz, ou por soluções de continuidade, como as provocadas pelo ato de coçar ou pelo orifício da picada do barbeiro. Logo após a penetração, o tripomastigota metacíclico invade células do sistema fagocítico mononuclear (célula alvo) e perde o flagelo, passando a se chamar amastigota. Nesse estágio, os amastigotas se multiplicam por divisão binária em ciclos de aproximadamente doze (12) horas, até que a célula infectada fique repleta de amastigotas (Figura 2). Estes amastigotas se transformam em tripomastigotas (Brener *et al*, 2000).

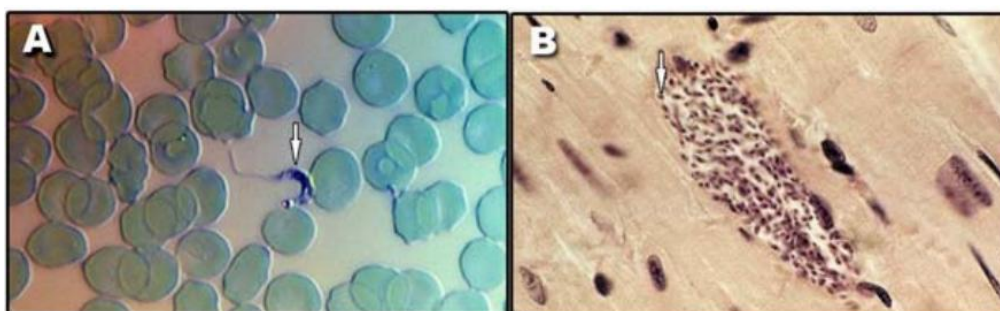


Figura 2: Estágios da forma de vida do *T. cruzi*.

A: forma tripomastigota flagelada próximo às células. **B:** ninho do parasito na forma amastigota no tecido muscular. Fonte: www.sciencephoto.com

Em seguida, a célula infectada se rompe e novos protozoários são lançados na circulação para infectar uma nova célula alvo (Figura 3).

Doença de Chagas: Ciclo de Vida do *Trypanosoma cruzi*

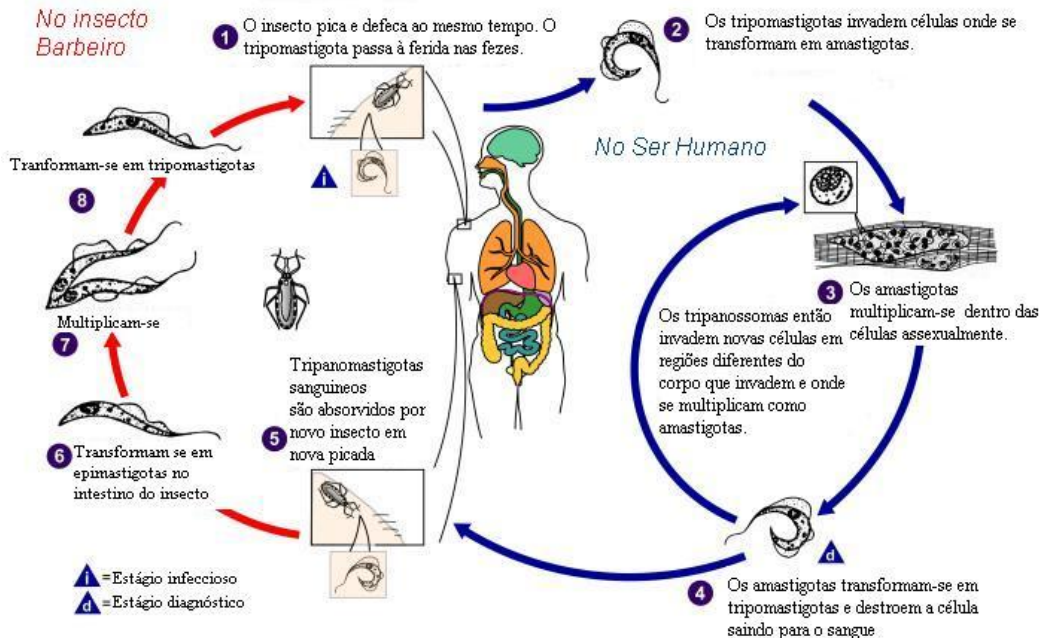


Figura 3: Ciclo evolutivo do *T. cruzi*

Diferentes formas do *Trypanosoma cruzi* ao longo do seu ciclo evolutivo no hospedeiro vertebrado. A contaminação ocorre quando o inseto hematófago infectado (barbeiro) pica o hospedeiro (mamífero) para se alimentar. **1-** O inseto, quando se alimenta, deposita no hospedeiro através das fezes a forma tripomastigota. **2-** o parasito é mantido dentro das células em um vacúolo, em seguida, escapa deste para o citoplasma. **3-** Diferenciação para a forma amastigota e a multiplicação por fissão. **4-** Rompimento celular e liberação das formas tripomastigota. **5-** O inseto se alimenta de um hospedeiro infectado e ingere os protozoários, que se alojam no seu intestino. **6, 7 e 8** - diferenciação e multiplicação do protozoário. Figura adaptada de Centers for Disease Control and Prevention – CDC.

As formas básicas de transmissão da doença de Chagas humana, além da transmissão pelo vetor, seriam também pela transfusão de sangue. Com os avanços no controle dos vetores domiciliares e rigorosa seleção de doadores de sangue em toda a área endêmica, as vias alternativas cresceram de importância, porém, ainda não foram consideradas prioritárias para os programas de controle governamentais no Brasil (Dias *et al*, 2011). As vias consideradas alternativas são:

transmissão congênita ou vertical, ocasionada por mães contaminadas aos seus filhos recém-nascidos; **transmissão acidental do *Trypanosoma cruzi* ao homem** ocorre nas mais diversas situações, tais como, em laboratórios de triatomíneos; seja

na captura do vetor em áreas endêmicas ou em trabalhos experimentais com mamíferos infectados, culturas ou em aerossóis de materiais infectados. Contaminação em cirurgias com pacientes agudos e pela falta de segurança no transporte de materiais infectados; **transmissão por transplante de órgãos** pode ocorrer a partir do doador com doença de Chagas ou pela reativação da parasitemia, se o receptor estiver previamente infectado; **transmissão oral ou por leite materno**, que pode ocorrer, segundo Dias *et al*, por: “a) ingestão de leite materno, de mãe infectada (o parasita pode vir da própria glândula ou contaminar o leite em casos de sangramento mamilar); b) ingestão de sangue de mamífero infectado; c) ingestão de carne mal cozida de mamíferos infectados e, especialmente, de reservatórios silvestres; d) ingestão de suspensão de *Trypanosoma cruzi* em pipetas (acidente de laboratório); e) ingestão de alimentos ou bebidas contaminados com fezes ou urina de triatomíneos infectados por *Trypanosoma cruzi*; f) ingestão de alimentos ou bebidas contaminadas com urina ou secreção para-anal de marsupiais infectados por *Trypanosoma cruzi*”; e **transmissão por situações excepcionais**, como por exemplo, pela picada do Triatomíneo (saliva contaminada), via sexual e outras (Dias *et al*, 2011).

Do ponto de vista clínico, a doença de Chagas se caracteriza por apresentar duas fases: aguda e crônica.

1.1.1 Fase Aguda

A fase aguda da doença, que pode apresentar sintomas ou não, corresponde ao período inicial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* no homem e em vários mamíferos. A essência dessa fase é a inflamação local relacionada à presença do parasito com imunomodulação celular do tipo Th1, resposta humoral e microangiopatias (Maya, 2010).

À medida que o ciclo de invasão e ruptura se repete, o histiotropismo se desloca do sistema fagocítico mononuclear para células musculares lisas e cardíacas e para o sistema nervoso (Teixeira *et al*, 1975; Teixeira *et al*, 1978). Essa etapa de intensa multiplicação e invasão de células com elevada parasitemia é característica dessa fase. Nesse período, a doença já é detectável por diagnóstico sorológico no sangue periférico e a sintomatologia é caracterizada por febre, hepatoesplenomegalia, alargamento do linfonodos e edema subcutâneo (Rassi *et al*, 1979).

Normalmente, no sítio de infecção ocorre uma intensa reação inflamatória antes da disseminação do protozoário. O local onde há inflamação aguda pode produzir uma reação intensa denominada “Chagoma” - inchaço na região da picada. A disseminação produz áreas de inflamação multifocais em diversos órgãos, com predomínio da infecção no coração e sistema nervoso, seguido da miosite focal e comprometimento dos plexos nervosos intestinais, nos casos mais graves. Os chagomas estão presentes na maioria dos casos descritos, entretanto, o “sinal de Romaña” (Figura 4), que é um inchaço característico das pálpebras, as quais ficam quase totalmente fechadas, pois, alguns barbeiros têm preferência em picar parte do

rosto próxima aos olhos, não aparece com alta frequência, estando presente em apenas 10% dos casos agudos ocorridos (Rassi *et al*, 2000).



Figura 4: Sinal de Romana.
Fonte: www.bioscience.org

A infecção em outros tecidos ocorre quando da circulação de tripomastigotas absorvidos por macrófagos e transportados para o fígado, gânglios linfáticos, baço e músculos do coração, formando pseudocistos de amastigotas nesses sítios, aumentando, por sua vez, a parasitemia (Coura e Borges-Pereira, 2010). Quando ocorre o rompimento dos pseudocistos, há uma intensa inflamação local, como, por exemplo, no miocárdio, levando a uma miocardite aguda. A reação inflamatória leva à destruição das células musculares e neurônios, e é mantida pela presença de *T. cruzi*, ou seus fragmentos e pelo DNA do parasita, com uma reação de hipersensibilidade tardia, levando a comprometimento da microcirculação e, posterior, fibrose (Figura 5) (Coura e Borges-Pereira, 2010). Com a intensificação da resposta imunológica, em geral, há uma queda progressiva no número de parasitos circulantes até que sejam raramente encontrados na circulação, caracterizando o fim da fase aguda da doença.

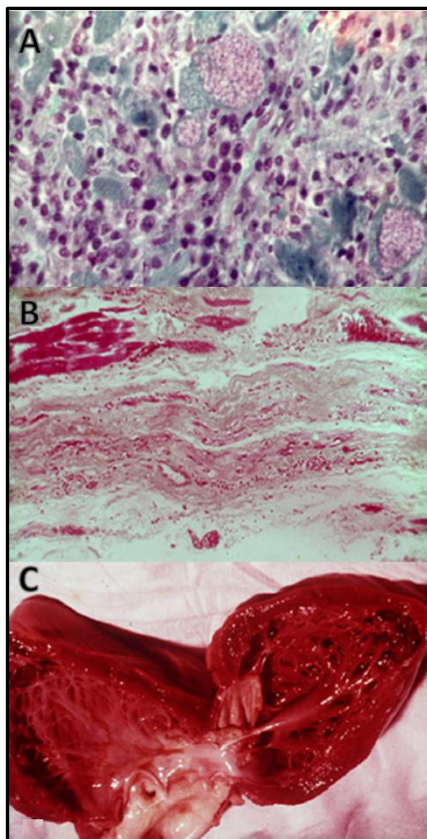


Figura 5: Histiologia na cardiopatia chagásica

Pseudocistos de amastigotas (A), fibrose (B), hipertrofia do miocárdio e dilatação com trombos no vértice na doença de Chagas crônica do coração (C). Fonte: Adaptação de Coura e Borges-Pereira, 2010.

As alterações cardíacas observadas, ocasionadas pela miocardite, são, por exemplo, a taquicardia sinusal, a baixa voltagem do complexo QRS e o bloqueio atrioventricular de primeiro grau (Rassi *et al*, 2000). Esses sintomas são inespecíficos e desaparecem gradualmente, mesmo sem tratamento terapêutico (Campos de Carvalho, 1994). Porém, quando ocorre a morte de pacientes com doença de Chagas aguda (um caso em 1000 infectados) é geralmente associada à falência cardíaca e/ou meningite e encefalite (WHO, 2002).

Segundo o Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, de 2005, o diagnóstico laboratorial parasitológico para essa fase é definida pela presença do

parasito circulante, demonstrável no exame direto do sangue periférico e o diagnóstico sorológico, pela presença de anticorpos anti-*T.cruzi* da classe IgM no sangue periférico, principalmente quando associado às alterações clínicas e epidemiológicas.

1.1.2 Fase Crônica

Os pacientes, durante essa fase, podem apresentar diferentes manifestações clínicas, dependentes tanto de fatores inerentes ao parasito, quanto ao hospedeiro vertebrado. Os fatores relevantes inerentes ao parasito são: a variabilidade entre as cepas, a virulência, a antigenicidade, o tropismo e a quantidade do inóculo. Em relação ao hospedeiro vertebrado, fatores como idade, sexo e o perfil da resposta imune parecem modular diferenças nas manifestações clínicas (Dias, 2000). Segundo o Consenso Brasileiro, nesta fase, o exame parasitológico é de baixa sensibilidade, devido à parasitemia subpatente, conferindo-lhe um baixo valor diagnóstico. O teste sorológico é o exame de escolha, considerando o indivíduo infectado aquele que apresenta anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgG detectado por dois testes sorológicos de princípios distintos. Geralmente, a identificação da doença ocorre em testes de admissão para trabalhos ou doação de sangue (Teixeira *et al*, 2006).

Na fase crônica, a maior parte dos pacientes portadores da doença de Chagas crônica permanece assintomática por um longo período, o que caracteriza a forma indeterminada da doença. Entretanto, quando a doença se manifesta, os principais alvos são o sistema gastrointestinal e o coração. Quando este órgão está gravemente comprometido, devido à multiplicação exacerbada dos tripanossomas no eixo maior do músculo, formando uma grande massa, ocorre lesão do miocárdio,

e menos intensamente também do pericárdio, do endocárdio e das arteríolas coronárias, levando a intenso infiltrado inflamatório e fibrose. O indivíduo infectado pode apresentar diversas manifestações clínicas, como falta de ar, tonturas, taquicardia, braquicardia e inchaço nas pernas. Além disso, o parasito também pode causar lesões no fígado e nos sistemas nervoso e linfático (Argolo *et al*, 2007). Aproximadamente, 10% dos pacientes infectados desenvolvem uma forma digestiva, apresentando dilatações e alterações funcionais, principalmente, no esôfago e no cólon por lesões no sistema nervoso autônomo intramural, parasitismo tecidual e ação do sistema imune (Tafuri *et al*, 1970; Tafuri *et al*, 1987; Dias *et al*, 1992).

A Cardiopatia Chagásica Crônica (CCC) constitui uma das principais causas de insuficiência cardíaca (IC) e é a maior causa de morbidade da doença de Chagas manifestando-se em cerca de 30 a 40% dos pacientes após décadas da infecção inicial. Estes podem apresentar prognósticos e evolução variáveis, desde pequenas alterações eletrocardiográficas até a insuficiência cardíaca ou progredindo para uma eventual morte súbita (Coura *et al*, 1984; Dias *et al*, 1992; Elizari e Chiale, 1993).

A CCC normalmente afeta indivíduos entre 30 e 45 anos de idade. O coração aumenta de tamanho, ocupando a base da caixa torácica (Figura 6a). As cavidades internas do coração ficam dilatadas e as paredes podem ficar finas. Outra alteração morfológica observada é o aneurisma de ponta (Figura 6b). Na forma cardíaca, em geral, ocorre extensa fibrose miocárdica com destruição do sistema de condução e grande redução dos neurônios do coração, ocasionando distúrbios autonômicos característicos da doença de Chagas na forma cardíaca (Coura e Borges-Pereira, 2010; Marin-Neto *et al*, 2007).

Estudos histológicos revelam que casos de morte de pacientes por cardiomiopatia chagásica estão relacionados com inflamação provocada por infiltrados de células mononucleares do sistema imune (Figura 6c). No local da inflamação, são encontrados linfócitos e macrófagos entre as fibras musculares e podem estar presentes também células plasmáticas, neutrófilos e eosinófilos (Texeira *et al*, 2006).

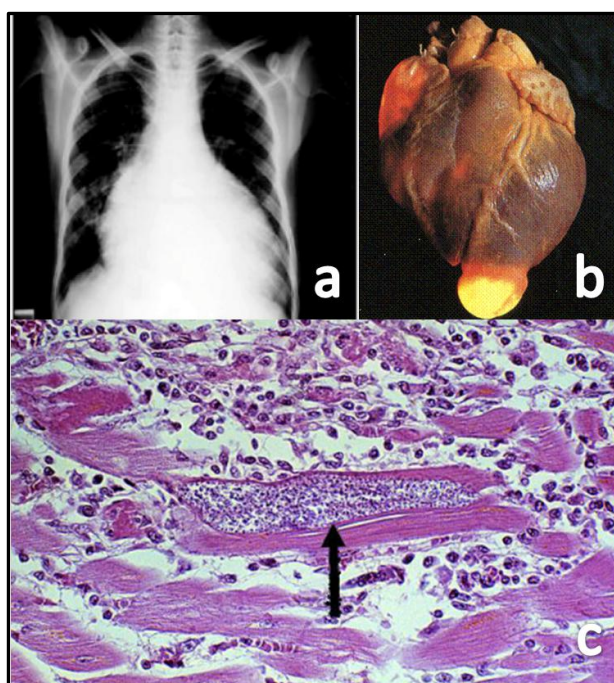


Figura 6: Alterações cardíacas na cardiopatia chagásica. Hipertrofia cardíaca (A). Aneurisma de ponta (B). Infiltrado inflamatório no coração (C). Fonte: www.bioscience.org

1.1.3 Sistema Imune na Doença de Chagas

A infecção com *Trypanosoma cruzi* resulta em múltiplas disfunções imunológicas, persistência do parasito e destruição inflamatória do músculo cardíaco. Seguindo-se a infecção, o aumento inicial da parasitemia é contido pelas citocinas pró-inflamatórias liberadas por macrófagos e células *Natural Killer* (NK).

Esta ativação da resposta imune inata é seguida pela imunidade adaptativa caracterizada por ativação policlonal de linfócitos T CD4+, CD8+ e células B. Essa resposta reduz, mas não elimina o parasita. Em relação às células T CD4+, a resposta do tipo Th1 medeia a proteção contra a infecção, enquanto a resposta Th2 correlaciona com a persistência do parasito (Maya *et al.*, 2010). Acredita-se que células TCD4+, monócitos, células NK e toda complexa rede de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias produzidas nesse processo sejam fundamentais para orquestrar a resposta imune nos pacientes portadores da doença de Chagas crônica, influenciando a evolução clínica da doença.

Durante o curso da doença de Chagas, os linfócitos T CD4+ e CD8+, que reconhecem os antígenos do *T. cruzi* se expandem e diferenciam em T efetoras ativadas. Após a diferenciação, as células T efetoras penetram no tecido cardíaco e medeiam a inflamação e as lesões ao tecido (Reis *et al.*, 1993). Nos locais das lesões os linfócitos T CD8+, citotóxicos, se acumulam ao redor das células do tecido induzindo a lise celular, criando regiões com intensa destruição celular e consequente substituição desse tecido por tecido fibroso (Teixeira *et al.*, 2006).

Os mecanismos imunopatológicos que determinam a migração de subpopulações de células T e produção de mediadores inflamatórios, os quais promovem as lesões nos tecidos, ainda não estão bem elucidados na doença de Chagas. A dificuldade em detectar o parasito no miocárdio na fase crônica da doença e a resposta de células T de forma deletéria contra antígenos próprios como os componentes de nervos e músculos desencadeia reações inflamatórias auto-imunes, sendo estas uma das responsáveis pela manutenção da miocardite crônica

(Kalil & Cunha-Neto, 1996). Nos pacientes cardiopatas crônicos, a miocardite é formada principalmente pelas células T CD8+ (Reis *et al.*, 1993).

1.1.4 Tratamento para a Doença de Chagas

As recomendações atuais para o tratamento da doença de Chagas no Brasil são baseados em decisões tomadas por especialistas que foram reunidos pelo Ministério da Saúde em 1997, e posteriormente, com a revalidação por especialistas coordenados pelo Organização Pan Americana de Saúde (PAHO), cerca de 13 - 14 anos atrás. (Coura, 2012). O Consenso Brasileiro de 2005 teve por objetivo padronizar, não só essa, como outras questões relacionadas a Doença de Chagas. As recomendações sugerem que os casos de doença de Chagas adquirida através da transmissão vetorial, oral ou congênita, ou através de acidentes de laboratório ou qualquer outra via de transmissão devem ser imediatamente tratados com as drogas que estão atualmente disponíveis: nifurtimox e benzonidazol. Também, foi recomendado que crianças, até 12 anos de idade, devem ser tratadas, assim como, em adultos quando a infecção é recente entre 10 a 12 anos do início da infecção (Coura, 2012). Porém, dentro dos programas de saúde pública, não há indicação de tratamento em larga escala para adultos em fase crônica da doença.

O tratamento de pacientes cardiopatas chagásicos crônicos, quanto à insuficiência cardíaca (IC), visa reduzir os sintomas, retardar a evolução da disfunção ventricular e prolongar a sobrevida, utilizando para isso medidas gerais como, dieta para correção da obesidade e manutenção de um peso ideal, restrição hídrica em casos graves, proibição do consumo de álcool, eliminação de fatores agravantes da doença, adequação de atividades físicas de acordo com o grau de IC

e idade do paciente e vacinação para influenza e pneumonia pneumocócica em pacientes com IC avançada.

O tratamento medicamentoso segue as recomendações das Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC), sendo que o tratamento padrão é feito com diuréticos, inibidores da enzima conversora da angiotensina (IECA), digitálicos, betabloqueadores, e alguns estudos inseriram antagonista da aldosterona para pacientes sintomáticos com classificação III e IV do New York Heart Association (NYHA).

Outro tratamento disponível, segundo o consenso brasileiro em doença de Chagas seria o cirúrgico, no caso de IC refratárias, usando recursos como, estimulação ventricular multissítio, transplante cardíaco e terapia celular, esse, ainda como perspectiva. (Consenso Brasileiro em Doença de Chagas - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Enfim, apesar dos tratamentos disponíveis, segundo Soares e colaboradores, os pacientes portadores de IC causada por cardiopatia chagásica crônica evoluem com grave disfunção sistólica devido à miocardite crônica e consequente fibrose (Soares *et al*, 2004). Nesse contexto, acabam sendo encaminhados para filas de transplantes cardíacos, na esperança que esse seja bem sucedido, reduzindo a acelerada evolução para óbito. Porém, a relação de transplantes versus lista de espera é extremamente desanimadora.

1.1.5 Perspectivas Terapêuticas

A dificuldade de realização de transplantes, além da reativação da doença de Chagas de 27 a 90% dos casos de pacientes transplantados devido à

imunodepressão, segundo a II Diretriz Brasileira de Transplante Cardíaco, trouxe a necessidade de uma nova perspectiva terapêutica. (Bacal *et al*, 2010). Dessa forma, uma nova área da medicina, abre expectativas inovadoras para o tratamento de doenças crônico-degenerativas: a Medicina Regenerativa. Esta consiste na utilização de células-tronco, fatores de proliferação/diferenciação celulares e biomateriais que permitem ao próprio organismo reparar tecidos e órgãos lesados, mesmo em órgãos considerados por muito tempo incapazes de desenvolver quaisquer processos regenerativos, como o cérebro e o coração (Santos *et al*, 2004).

Além disso, ainda há várias pesquisas em busca de novos medicamentos e novas técnicas diagnósticas para tentar minimizar os problemas que essa doença acarreta aos pacientes e a sociedade como um todo.

Novos derivados antifúngicos triazólicos surgiram como tratamentos alternativos para doença de Chagas. Eles inibem a biossíntese do ergosterol no *T. cruzi*, que é essencial para o crescimento e sobrevivência do parasita, e têm propriedades farmacocinéticas apropriadas para o tratamento da infecção disseminada intracelular.

O E1224, um desses medicamentos em teste, com o perfil de segurança favorável e resultados encorajadores nos estudos em animais além de farmacocinética adequada, é considerado um candidato prioritário para o tratamento da doença de Chagas. O ensaio com E1224, segundo o site do *Clinical Trials*, encontra-se em fase II, e tem por objetivo determinar se cada um dos três diferentes regimes de dosagem de E1224 são eficazes e seguros na erradicação da

parasitemia do *T. cruzi* em indivíduos portadores da forma crônica indeterminada da Doença de Chagas, em comparação com placebo (<http://clinicaltrials.gov/>).

1.2 Doença Isquêmica Crônica

Na lista das dez principais causas de morte da Organização Mundial da Saúde (OMS), as doenças cardíacas isquêmicas figuram como primeiro lugar no ranking, tanto nos países de alta, quanto de média renda e em quarto lugar nos países considerados de baixa renda.

Em 2008, 7,3 milhões de pessoas morreram de doença cardíaca isquêmica no mundo e projeta-se que o número anual de mortes por doenças cardiovasculares aumentará para, aproximadamente, 23,3 milhões em 2030 (WHO, 2013).

Dentro das doenças isquêmicas do coração temos a angina pectoris, infarto agudo do miocárdio e suas complicações e doença isquêmica crônica do coração, sendo que a doença de base para tais doenças, em geral, é a aterosclerose.

A característica dominante da doença isquêmica crônica (DIC) do coração se dá quando ocorre uma falha na circulação coronariana, a qual tem como propósito manter adequado balanço entre a oferta/consumo de oxigênio do miocárdio (Carvalho, 2001). Essa falha causa uma isquemia miocárdica reversível que é caracterizada por sintomas estáveis que se estabelecem por meses ou anos, podendo se transformar, em lesões permanentes (*Canadian Cardiovascular Society Consensus Conference*, 1997). A angina estável é a manifestação clínica mais frequente da cardiopatia isquêmica crônica.

O teste de esforço com registro eletrocardiográfico é o teste de escolha para o diagnóstico e estratificação de risco da doença isquêmica crônica. Os objetivos do

tratamento são melhorar o prognóstico e reduzir os sintomas. O prognóstico é melhorado pela diminuição do peso dos fatores de risco coronário, através da administração de agentes anti-plaquetários, e em doentes de alto risco, com revascularização miocárdica. Os sintomas são melhorados por medicamentos anti-anginosos que atuam através de diferentes mecanismos, incluindo a redução do consumo de oxigênio e melhora da perfusão do miocárdio, e revascularização em pacientes que não respondem satisfatoriamente aos medicamentos.

A Cardiomiopatia isquêmica é caracterizada por sintomas e sinais de disfunção ventricular esquerda com graus variados de disfunção. Observa-se melhora funcional em pacientes com lesões cardíacas, mas com grandes áreas de viabilidade miocárdica, submetidos à revascularização do miocárdio (Crea *et al*, 2012).

Um grande número de pacientes, após serem submetidos a sucessivos procedimentos de revascularização, se tornam refratários, não sendo mais passíveis de revascularização mecânica. Sucessivos procedimentos de revascularização fazem com que, um grande número de pacientes, atinja o estágio final da doença arterial coronária. Para esses pacientes, a injeção intramiocárdica de células isoladas de medula óssea surge como alternativa terapêutica, mostrando-se promissora. Esta terapia experimental tem por objetivo melhorar a perfusão do miocárdio e a função contrátil, diminuindo os sintomas da angina.

A eficácia da terapia celular está sob investigação constante, e inúmeros estudos em busca de inovações adicionais estão sendo realizados na tentativa de melhorar a eficácia da terapia celular. Podemos citar aqueles que buscam melhorar a identificação de células mais promissoras, ou, usar novas estratégias, como pré-

condicionamento isquêmico e estímulos farmacológicos associados à terapia convencional, ou ainda, os que tentam aumentar o enxerto e função celular no sítio de interesse. Além disso, a combinação de terapia genética e a terapia celular tem demonstrado um grande potencial. Finalmente, o uso de biomateriais parece ser uma técnica promissora para melhorar sobrevivência celular, a qual pode contribuir para a otimização de técnicas de enxerto.

Espera-se que estas inovações apresentem resultados eficazes transformando-se em tratamentos para uma variedade de doenças, ampliando o espectro de opções terapêuticas para pacientes que esgotaram as terapias convencionais.

1.3 Terapia Celular

A terapia celular é uma proposta terapêutica que, por meio de infusão de células, visa agir na regeneração de órgãos e tecidos.

Dentro desse contexto, uma questão importante é a identificação de qual seria a célula-tronco ideal para tal fim. Certamente o ideal seria a utilização de células-tronco existentes no tecido lesado do próprio indivíduo. No entanto, para que isto seja possível, é necessário entender melhor os fatores que controlam a proliferação, migração e diferenciação destas células-tronco adultas e das células por elas geradas antes que se possa propor uma possível abordagem terapêutica usando as mesmas. Há também a dificuldade inerente de obtenção destas células sem provocar lesões significativas nos órgãos de onde seriam retiradas. Vários estudos que estão em andamento, neste momento, avaliam estas questões.

Outras alternativas seriam a utilização de células-tronco embrionárias e mesenquimais (MSC). A primeira delas muito promissora, pois poderíamos controlar a diferenciação para o tipo celular desejado antes de transplantá-las para o local da lesão. Mas, há muito que se estudar para que se possa extinguir os riscos de tumorigênese com o uso destas células. A população celular de MSC é extremamente rara, e para sua utilização clínica é necessário que haja expansão *in vitro*. O procedimento de expansão destas células *in vitro*, livre de produtos de origem animal, foi estabelecido recentemente, (Muller *et al*, 2006) e alguns estudos clínicos pioneiros já começaram a utilizar este tipo celular em ensaios clínicos.

1.3.1 Célula-tronco

Qualquer organismo pluricelular é composto por diferentes tipos de células. Calcula-se que de cerca de 75 trilhões de células existentes em um homem adulto, se encontram mais ou menos 200 tipos de células distintas, todas derivadas de células precursoras, denominadas células-tronco. (Johnson *et al*, 2004).

Estas células começaram a despertar interesse científico a partir do lançamento, em 1839, da obra: Investigações Microscópicas sobre a Estrutura e Crescimento dos Animais e das Plantas, que passou a ser conhecida como a Teoria Celular descrita pelo zoólogo alemão Theodor Schwann (1810-1882). Na obra, Schwann afirma que todos os tecidos animais e vegetais são formados por células. Ele se baseou no fato da presença do núcleo em todos os tipos de células, e na obediência a um processo básico comum de formação comandado pelo núcleo. Sendo assim, sabe-se que o corpo humano é constituído basicamente por três tipos de células:

1. As células germinais que são as células que dão origem aos gametas - óvulos e espermatozóides;

2. As células somáticas, que constituem a maior parte das células que constituem um organismo adulto,

3. As células-tronco, que de acordo com a definição canônica, são células que possuem a capacidade de se dividir indefinidamente *in vivo* dando, tanto células-tronco, por autorrenovação, como células especializadas maduras, devido à multipotencialidade. (Alison *et al*, 2002).

Essas últimas são caracterizadas por serem células indiferenciadas, ou seja, não estão no fim das vias de diferenciação celular; não tem restrição no número de vezes que podem se dividir durante a vida de um organismo, e quando se dividem, cada “célula filha” formada pode manter-se indiferenciada ou pode se tornar uma célula funcional especializada. Para realizar essa dupla tarefa, replicação e diferenciação, a célula-tronco pode seguir dois modelos básicos de divisão: o determinístico, no qual sua divisão gera sempre uma nova célula-tronco e uma indiferenciada; e o estocástico (ou aleatório), no qual células-tronco geram somente novas células-tronco ou geram apenas células diferenciadas ou ainda uma célula-tronco e uma célula diferenciada, conforme exemplificado na Figura 7 (Johnson *et al*, 2004).

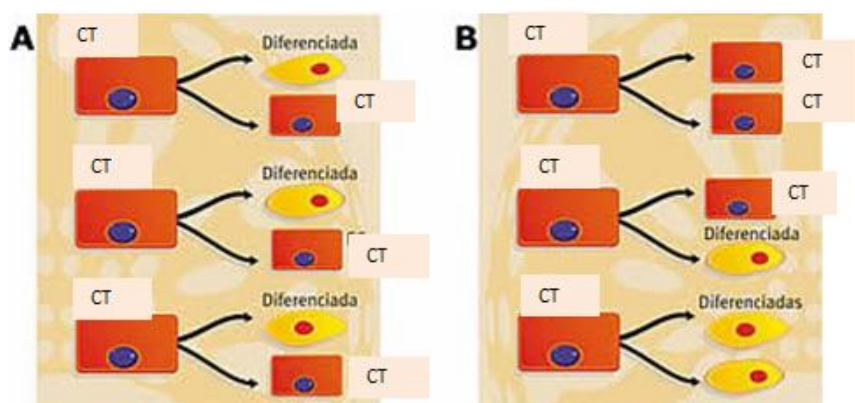


Figura 7: Tipos de divisão de células-tronco

A divisão de células-tronco segue dois modelos: o determinístico (A), que gera sempre uma célula-tronco e uma célula diferenciada, e o aleatório (B) em que podem ser geradas diversas combinações de células. CT: célula-tronco. Adaptado de <http://www.educacaopublica.rj.gov.br>

1.3.1.1 Definições de Células-tronco

As células-tronco são definidas funcionalmente como células que tem tanto a capacidade de autorrenovação, como a de gerar células diferenciadas (Smith *et al*, 2001; Weissman *et al*, 2001). Especificamente, as células-tronco podem gerar células-filhas idênticas à mãe (autorrenovação) e produzir descendentes com um potencial restrito (células diferenciadas). A autorrenovação define a capacidade das células-tronco de se perpetuarem, mantendo ao longo de gerações o seu potencial proliferativo (Pittenger *et al*, 1999).

1.3.1.1.1 Clonalidade

A capacidade clonogênica das células-tronco pode ser considerada uma das características mais importante e significa que uma única célula tem a capacidade de se multiplicar formando uma linhagem. Uma linhagem celular pode ser definida como uma população clonal ou constituída de células aparentemente homogêneas

quando as mesmas podem ser amplificadas em cultura, congeladas, descongeladas e subcultivadas *in vitro*. Porém, as culturas de células que não provêm da uma única célula podem constituir uma população mista, contendo células-tronco e células de suporte, necessárias para a propagação das células-tronco. Por conseguinte, uma linha de células-tronco deve fazer referência a sua origem.

1.3.1.1.2 Potencialidade

O termo “potencial” de uma célula é geralmente utilizado para descrever a capacidade de diferenciação das células-tronco. Elas podem ser totipotentes, pluripotentes ou multipotentes. Totipotência é um termo usado para identificar uma célula-tronco, que pode diferenciar-se em qualquer célula do indivíduo, desenvolvendo um indivíduo completo. Na origem da vida de um organismo existe uma única célula-tronco, o zigoto, que é uma célula totipotente. Esta célula pode dar origem a células especializadas do embrião ou do adulto. O ovo fertilizado se divide para dar origem a linhagens de células que formarão os diferentes órgãos. Durante as primeiras 3 a 4 divisões, cada célula filha mantém a sua totipotência. Em seguida, através de uma série de divisões e diferenciações, as células-tronco embrionárias, isoladas da massa celular interna, perdem a sua totipotência. Este processo é conhecido como comprometimento celular. Estas células são pluripotentes. Elas têm a capacidade de originar vários tipos de células das três camadas germinativas: *endoderma*, que origina, por exemplo, o trato gastrointestinal e os pulmões; *mesoderma*, que origina, por exemplo, os músculos, ossos, sangue e sistema urogenital; e a *ectoderma*, que origina, por exemplo, os tecidos epidermais e sistema nervoso. Células-tronco pluripotentes podem se especializar em qualquer tecido do

organismo, mas elas não podem por si próprias desenvolver em um ser adulto, uma vez que não possuem a capacidade de gerar tecidos extraembrionários. Um exemplo de células-tronco pluripotentes são as células-tronco embrionárias (Johnson *et al*, 2004).

Células multipotentes possuem uma capacidade de diferenciação limitada, se diferenciando apenas em linhagens relacionadas ao seu tecido de origem. Elas estão distribuídas pelo organismo em nichos e acredita-se que tenham importância nos mecanismos de reparo do tecido onde estão alocadas (Johnson *et al*, 2004). Suas principais funções são a de manter a homeostase do tecido e substituir, seguindo os limites de regeneração de cada tecido, as células mortas por envelhecimento, lesão ou doença (Leblond *et al*, 1964). Existem também populações de células progenitoras que são tripotentes, bipotentes ou unipotentes, tais como as células-tronco epidérmicas. (Bongso *et al*, 2009).

1.3.1.2 Características das Células-tronco

Como mencionado anteriormente, quando uma célula-tronco se divide, as células filhas podem ter um caminho de diferenciação especializado, ou de autorrenovação. Isto assegura um fornecimento constante de células-tronco para a reconstituição dos órgãos adultos. Este mecanismo fisiológico é necessário para a manutenção da composição de tecidos celulares e de órgãos do corpo. Uma das vantagens das células-tronco, é que elas podem se diferenciar em tipos celulares sem ser necessariamente dos tecidos em que residem. Esta propriedade é conhecida como "plasticidade" das células-tronco. As células-tronco também são

altamente clonogênicas e geralmente representam uma pequena porcentagem do total de células que compõem um determinado órgão (Gardner *et al*, 2002).

1.3.1.3 As Células-tronco e seus Nichos

Os nichos das células-tronco são locais especiais nos tecidos, responsáveis pela manutenção da homeostase dos mesmos, isto é, a manutenção do equilíbrio entre os diferentes tipos de células que constituem o tecido. O nicho é descrito como um compartimento anatômico definido, incluindo componentes não celulares e celulares (matriz extracelular, citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento de ação local), capazes de integrar os sinais locais e sistêmicos que regulam a biologia destas células (Jones *et al*, 2008a). Este nicho ou micro-ambiente proporciona um equilíbrio entre a autorrenovação e diferenciação, e a produção de células maduras funcionais (Moore *et al*, 2006). As células, os vasos sanguíneos e as glicoproteínas da matriz são parte de uma estrutura tridimensional que proporciona um micro-ambiente altamente especializado onde o contato e a comunicação entre eles é essencial. Além disso, o ambiente metabólico formado por fatores de crescimento, proteínas de sinalização celular e a pressão parcial de oxigênio fazem parte do nicho (Scadden *et al*, 2010).

Na década de 1970, um modelo de microambiente indutivo da hematopoiese foi descrito (Trentin *et al*, 1989). Em 1977, Dexter, propôs a utilização de uma camada de células aderentes do estroma para a manutenção de células-tronco hematopoiéticas (HSC) de rato cultivadas a longo prazo (Dexter *et al*, 1977). Estes sistemas têm contribuído para aprofundar o conceito de nicho por Robert Schofield

em 1978. Ele afirmou a hipótese de que as HSC só podem manter o equilíbrio entre a autorrenovação e a diferenciação em linhagens hematopoiéticas, mantendo o contacto físico com um estroma adequado, constituído por células do estroma associadas a sua matriz extracelular (Schofield *et al*, 1978). O conceito de nicho é amplamente fundamentado e pode ser aplicado para a maioria das células-tronco. Exemplos de nichos estudados são aqueles de células-tronco intestinais e folículos pilosos.

1.3.1.4 As Fontes e Diferentes Tipos de Células-tronco

As células-tronco podem ser classificadas em quatro grandes categorias com base em sua origem, ou seja, as células-tronco embrionárias, as células-tronco fetais, as células-tronco do cordão umbilical e células-tronco adultas. Cada uma pode ser dividida em subtipos (figura 8). Dentro de um organismo, uma dada célula-tronco pode ser extraída de vários tecidos diferentes. Assim, as HSC estão presentes, tanto na medula óssea, como no fígado fetal. As MSC existem na medula óssea, mas também em muitos tecidos adultos. Embora essas células tenham muitas características morfológicas e funcionais em comum, eles não são idênticas. É por isso que a origem anatômica de uma célula-tronco é um parâmetro importante na interpretação dos resultados experimentais.

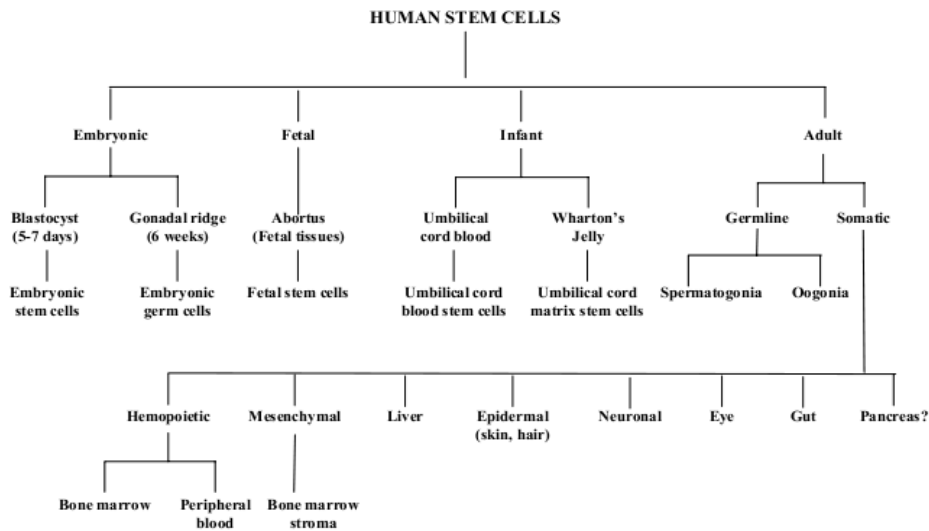


Figura 8: Classificação das células-tronco humanas
(Extraído de Bongso, 2005).

1.3.1.4.1 Células-tronco Embrionárias (ESC)

Elas são derivadas da massa celular interna de blastocistos de mamíferos. A massa celular interna dos blastocistos humanos de 5-6 dias é a fonte de ESC pluripotentes que podem proliferar indefinidamente, preservando sua pluripotência, mantendo esta característica *in vitro* (Johnson *et al*, 2004).

Durante o desenvolvimento embrionário, a massa celular interna forma duas camadas distintas de células, o epiblasto e o hipoblasto. O hipoblasto forma o saco vitelino e o epiblasto se diferencia nas três camadas germinativas (ectoderma, mesoderma e endoderma) que formarão o organismo adulto.

As células-tronco embrionárias foram descobertas em 1981 (Evans & Kaufman, 1981; Martin *et al*, 1981) seguida do isolamento das ESC humanas em 1998 (Thomson *et al*, 1998).

1.3.1.4.2 Fetal

Este é um tipo de célula primitiva encontrada em órgãos fetais que vão se desenvolver nos diferentes órgãos do corpo. A pesquisa com células-tronco fetais tem sido limitada até agora a certos tipos de células. Células-tronco da crista neural, células-tronco hematopoiéticas fetais e progenitores de ilhotas pancreáticas fetais foram isolados de fetos (Beattie *et al*, 1997).

1.3.1.4.3 Cordão Umbilical

Elas são células tronco circulantes que incluem células-tronco hematopoiéticas e não hematopoiéticas. Eles apresentam características multipotentes sendo capazes de se diferenciar em células sanguíneas (Rogers *et al*, 2004). Foi, também, descrito que a matriz do cordão umbilical contém células-tronco potencialmente úteis (Mitchell *et al*, 2003). Esta matriz, chamada geleia de Wharton é uma fonte de isolamento de células-tronco mesenquimais. Estas células expressam marcadores característicos de células-tronco, e mostram uma atividade telomerase elevada.

1.3.1.4.4 Células-tronco Adultas

As células-tronco adultas são células encontradas em vários tecidos do organismo adulto. Algumas delas estão sendo utilizadas em ensaios clínicos como, por exemplo, a células-tronco de cordão umbilical, da medula óssea e da gordura (NIH, 2009).

As células-tronco adultas multipotentes possuem diferenciação restrita ou dirigida e uma menor capacidade de proliferação, quando comparadas às embrionárias, o que torna remota a possibilidade de formação de tumores quando infundidas em pacientes. Aliado a isto, há a possibilidade de utilização de células-tronco adultas de origem autóloga, ou seja, do próprio paciente, o que minimiza problemas como rejeição imunológica. Este tipo celular é muito promissor para aplicação clínica em medicina regenerativa (Asahara *et al*, 2000).

Podemos identificar nos vários tecidos e órgãos adultos células-tronco como as mesenquimais, as precursoras endoteliais e as hematopoiéticas.

- As células-tronco mesenquimais

As células-tronco mesenquimais são um componente do estroma da medula óssea. O tecido do estroma da medula óssea é composto por uma população heterogênea de células que compreende células reticulares, adipócitos, células osteogênicas, células do músculo liso, células endoteliais e macrófagos (Bianco, 1998). As células-tronco mesenquimais são uma população de células-tronco adulta bem caracterizada. Há uma quantidade pequena na medula óssea (1 em cada 10^4 ou 1 em cada 10^5 células mononucleares), sendo responsáveis pela formação das células do estroma de medula óssea garantindo a homeostasia do ambiente medular para que a hematopoiese ocorra de maneira bem regulada (Chen *et al*, 2006). Acredita-se que elas são capazes de reparar danos locais. *In vitro*, elas se dividem em meios de cultura adequados e se diferenciam em vários tipos de tecidos mesodérmicos, incluindo osso, cartilagem, músculo, estroma da medula óssea, tendões, ligamentos e gordura (Caplan *et al*, 1994; Short *et al*, 2003). A caracterização das células-tronco mesenquimais tem sido facilitada pela

simplicidade de sua cultura. Além do estroma da medula óssea, as células-tronco mesenquimais podem, também, ser derivadas a partir do periósteo, gordura e pele.

Os estudos de Friedenstein *et al.* foram os primeiros a relatar a existência de uma população de células-tronco no estroma de medula óssea. Eles observaram que eram células aderentes ao frasco de cultura com formato fibroblastóide (Friedenstein *et al.*, 1976). A partir deste momento vários estudos foram realizados e, muitos deles demonstraram que as células-tronco aderentes do estroma de medula óssea ou células-tronco mesenquimais são capazes de gerar várias linhagens celulares incluindo osteócitos, condrócitos e adipócitos (Pittenger *et al.*, 1999).

Com o intuito de padronizar os achados científicos relacionados às células estromais aderentes derivadas de medula óssea, a Sociedade Internacional de Terapia Celular (SITC) publicou um artigo (Dominici *et al.*, 2006), onde sugere que tais células podem ser classificadas como MSC quando atenderem aos três critérios listados abaixo:

1. Aderência às placas de cultura *in vitro*, quando cultivadas em condições adequadas;
2. Expressão de antígenos específicos em sua superfície, apresentando expressão de CD105, CD73 e CD90 mensurados por citometria de fluxo e ausência de expressão de CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e HLA de classe II (menor ou igual a 2%).
3. Diferenciação *in vitro* em osteoblasto, adipócito e condroblasto.

As MSC apresentam um aspecto muito relevante, porém, ainda não totalmente consolidado na literatura; a capacidade de modular a resposta imune. Isto torna sua aplicação clínica muito interessante. Estudos demonstram que MSC ex

vivo suprimem o funcionamento de uma larga população de células imunológicas, incluindo linfócitos T (Krampera *et al*, 2003; Le Blanc *et al*, 2003; Di Nicola *et al*, 2002), células apresentadoras de antígenos, Natural Killers (NK), e linfócitos B (Jiang *et al*, 2005; Aggarwal *et al*, 2005). Este achado é particularmente interessante, pois demonstra a possibilidade de diminuir a rejeição imunológica contra as células injetadas, no caso de realização de terapias celulares utilizando essas células.

Enfim, a facilidade de obtenção, a multipotencialidade e uma suposta capacidade de imunossupressão, que diminuem os problemas de imunorejeição, ampliam a importância de seu estudo em terapias celulares.

- As células precursoras endoteliais (EPC)

As células progenitoras endoteliais foram inicialmente descritas em 1997 por Asahara, como uma população heterogênea de células circulantes no sangue periférico e cuja origem advem de inúmeros precursores, incluindo hemangioblastos (Asahara *et al*, 1997), precursores não hematopoiéticos, células monocíticas (Yoder *et al*, 2007) ou células-tronco residentes nos tecidos (Beltrami *et al*, 2003). Estas células são capazes de migrar para o local onde existem lesões endoteliais, e se diferenciar em células endoteliais maduras desempenhando importante função no reparo vascular, e na formação de novos vasos em razão de sua capacidade de proliferar, migrar, se diferenciar *in vivo* e *in vitro* em células endoteliais, bem como, incorporar-se ao endotélio preexistente. (Nobrega *et al*, 2012)

As EPC são raras, representando cerca de 0,0001% a 0,01% da fração mononuclear do sangue periférico. Porém, diferentes estímulos são capazes de mobilizar as EPC da medula óssea, fazendo com que elas tenham seu número

elevado temporariamente na circulação periférica. Uma vez na circulação periférica, as EPC secretam fatores pró-angiogênicos, como o fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF) e o fator estimulante de colônia de granulócitos (G-CSF), capazes de estimular de forma paracrina os processos de neovascularização e angiogênese, tornando esse um grande atrativo para as pesquisas em terapia celular com essas células. (Asahara *et al*, 1999; Powell *et al*, 2005)

Além das citadas nos tópicos acima, ainda compõe o conjunto de células-tronco adultas, as células do intestino, fígado, osso, cartilagem, epiderme (pele e cabelo), do sistema nervoso, do pâncreas e do olho (Gronthos *et al*, 1999; Luskin *et al*, 1993; Nuttall *et al*, 1998; Reynolds *et al*, 1992; Tropepe *et al*, 2000, Wright *et al*, 2000; Zulewski *et al*, 2001).

- As células-tronco hematopoiéticas

A medula óssea é um órgão difuso, volumoso e muito ativo, sendo fonte de todas as células sanguíneas do organismo. O adulto normal, produz, por dia, cerca de 2,5 bilhões de eritrócitos, 2,5 bilhões de plaquetas e 1,0 bilhão de granulócitos por quilograma de peso corporal. Esta produção é ajustada com grande precisão às necessidades do organismo (Junqueira & Carneiro, 1999).

A medula óssea é encontrada no canal medular dos ossos longos e nas cavidades dos ossos esponjosos. Como todo tecido hematopoiético é constituída por células reticulares, associadas a fibras reticulares. Esses elementos formam uma esponja percorrida por inúmeros capilares sinusóides. Entre as células reticulares existe um número variável de tipos celulares; podemos citar, como exemplo, os macrófagos, células adiposas, células precursoras dos eritrócitos, granulócitos, monócitos, plaquetas e células-tronco indiferenciadas (Junqueira & Carneiro, 1999).

A medula óssea têm células-tronco de origem hematopoiética e mesenquimal, sendo, essas últimas formadoras do sistema celular estromal da medula óssea, análogo ao sistema hematopoiético, onde as MSC residentes são responsáveis por manter um nicho das mesmas, por autorrenovação, além de dar origem as células das várias linhagens que compõem o estroma medular (Deans *et al*, 2000) (Figura 9).

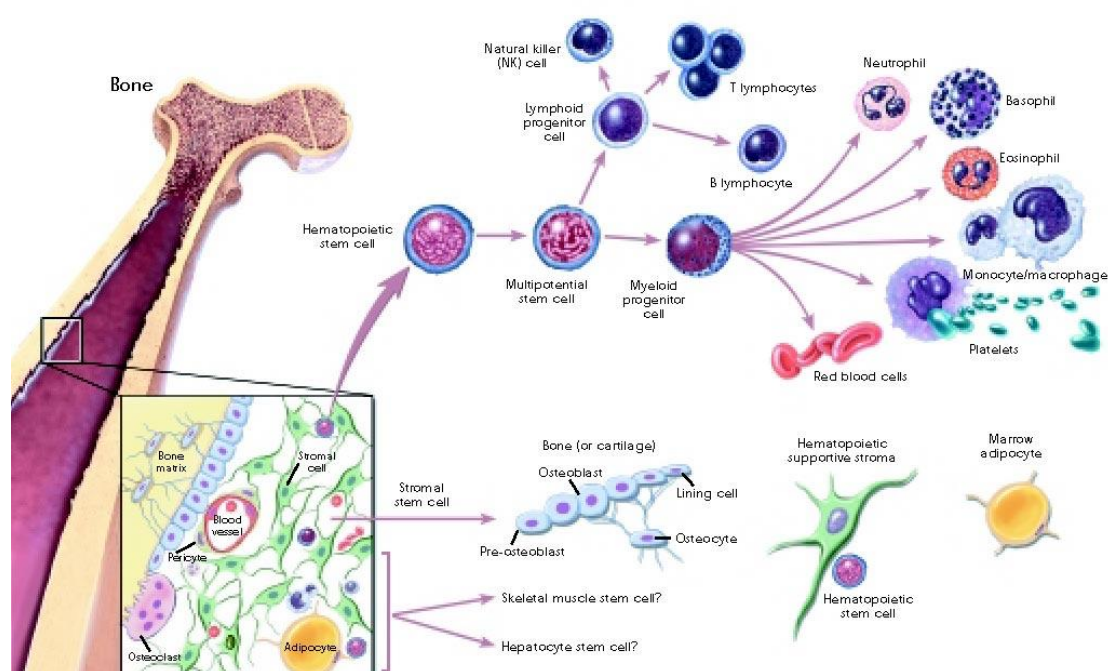


Figura 9: Células-tronco de medula óssea.

As HSCs se diferenciam nos precursores linfóides e mielóides, que por sua vez, dão origem a todas as células sanguíneas do organismo. As MSCs podem dar origem a células de osso, cartilagem, tendão e de estroma. (Adaptado de NIH 2001)

A hematopoiese é, basicamente, a produção e manutenção de células-tronco do sangue, além de sua proliferação e diferenciação em células sanguíneas (Short *et al*, 2003). As células-tronco hematopoiéticas são derivadas no início da embriogênese a partir da mesoderma e se estabelecem em locais muito específicos de hematopoiese no embrião. Estes locais incluem a medula óssea, o fígado e o saco vitelino.

As células-tronco hematopoiéticas são as células adultas mais estudadas. São isoladas a partir de células mononucleares de medula óssea (CMMO) e, segundo o National Institute of Health (NIH), essa é a fração celular mais utilizada em ensaios clínicos para tratamento de doenças crônicas de origem não hematológica (NIH, 2009) (Figura 10). Para doenças de origem hematológica, estas células têm sido amplamente utilizadas na prática clínica há mais de 40 anos e são a base do sucesso do transplante de medula óssea.

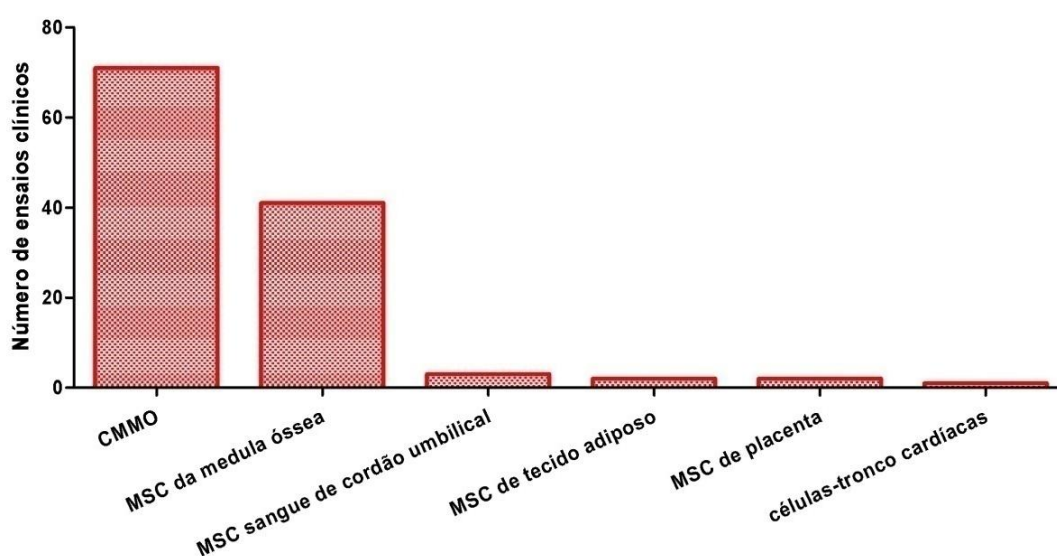


Figura 10: Tipos celulares utilizados em ensaios clínicos.

Número de ensaios clínicos registrados no NIH para protocolos de terapia celular para tratamento de doenças não hematológicas. CMMO - células mononucleares de medula óssea, MSC - mesenchymal stem cell (NIH, 2009).

A despeito dos inúmeros estudos, o mecanismo de ação dessas células no reparo tecidual ainda é controverso, pois a capacidade de transdiferenciação das CMMO em outros tipos celulares é muito restrita, assim como é restrita a capacidade de fusão das células de medula óssea com as células do tecido do hospedeiro. Assim, segundo Alvarez-Dolado e colaboradores, sua ação direta não teria capacidade de regenerar órgãos lesados (Alvarez-Dolado *et al*, 2003). Entretanto, essas observações não excluem a possibilidade de um papel terapêutico para

CMMO, pois se deve levar em consideração que as mesmas apresentam outras características que facilitam seu uso terapêutico a curto e médio prazo. Uma delas seria o tropismo que apresentam por áreas de lesão (Middleton *et al*, 2007) e a outra, seria a produção, por essas células, de diversos fatores tróficos, que melhoram o funcionamento de tecidos lesados, promovem maior sobrevivência das células que os formam, diminuem a inflamação e aumentam a vasculogênese (Chopp *et al*, 2002). Dessa forma, acredita-se que o papel das CMMO, em terapias celulares, é proteger as células que sobreviveram após a injúria (por ação parácrina), ao invés de substituir as que já morreram, realizando, assim, um processo de reparo celular em lugar de regeneração celular que se atribuiu inicialmente como mecanismo de ação das células-tronco derivadas de medula óssea.

1.3.1.4.5 Pesquisas com Células-tronco de Medula Óssea em Cardiopatias Crônicas

Diversos estudos têm sido realizados, visando o possível tratamento das cardiopatias crônicas, bem como de diversas outras doenças crônicas não cardiológicas, com CMMO em terapia celular. Estudos envolvendo aplicação de CMMO no tratamento de doenças cardíacas foram realizados, comprovando, não só segurança e exequibilidade do método como apresentando resultados preliminares positivos (Assmus *et al*, 2002; Perin *et al*, 2003; Stamm *et al*, 2003).

Estudos brasileiros de grande relevância, como o realizado por Vilas-Boas e colaboradores, demonstraram o primeiro caso de transplante de CMMO para o miocárdio de um portador de insuficiência cardíaca de etiologia chagásica. Os

resultados obtidos evidenciaram ser possível a realização da injeção intracoronariana de célula de medula óssea, sugerindo que este procedimento é potencialmente seguro e efetivo em pacientes com insuficiência cardíaca chagásica (Vilas-Boas *et al*, 2004).

Na sequência de seus estudos, Vilas-Boas e colaboradores analisaram uma amostra de 28 pacientes. Não houve complicações relacionadas diretamente ao procedimento. Os dados demonstraram que a injeção intracoronariana de CMMO é exequível e potencialmente segura e eficaz para pacientes com insuficiência cardíaca de etiologia chagásica (Vilas-Boas *et al*, 2006).

Com o objetivo de avaliar a hipótese de que injeções transendocárdicas de CMMO pudessem promover com segurança a neovascularização, e aumento da perfusão e contratilidade miocárdica em pacientes com grau avançado de cardiopatia isquêmica crônica, Perin e colaboradores realizaram um estudo similar, utilizando CMMO de 21 pacientes. Foi observada melhora dos sintomas da doença, e melhora na função e perfusão cardíaca com essa terapia, não havendo evidência clínica de danos aos pacientes (Perin *et al*, 2003).

Baseados nesses resultados e em inúmeros outros publicados pela comunidade científica mundial especializada nessa área, nossa equipe, junto com pesquisadores brasileiros, coordenados pelo Dr. Antonio Carlos Campos de Carvalho, iniciaram, em 2005, o Estudo Multicêntrico Randomizado em Terapia Celular em Cardiopatias (EMRTCC) que envolvia um centro coordenador – Instituto Nacional de Cardiologia (INC) - e 34 hospitais e institutos com o intuito de avaliar a segurança e eficácia do implante autólogo de células-tronco de medula óssea em 1200 pacientes brasileiros, divididos em quatro braços, com as seguintes

cardiopatias: infarto agudo do miocárdio, cardiopatia isquêmica crônica, cardiomiopatia dilatada e cardiopatia chagásica.

Desses quatro braços do EMRTCC, o estudo com a doença de Chagas foi o primeiro a ser divulgado; os demais, devem ter seus resultados publicados em breve.

Infelizmente, os resultados finais não foram muito animadores, sendo concluído que, a terapia com CMMO por via intracoronariana não apresentou vantagens adicionais sobre a terapia padrão para a cardiopatia chagásica crônica em pacientes com insuficiência cardíaca grave (Ribeiro-Dos-Santos *et al*, 2012). No entanto, esta constatação não deve diminuir o interesse pela terapia celular na cardiopatia chagásica, pois acreditamos que se deve testar novos tipos celulares, outras formas de liberação das células no coração e, quem sabe, outro momento de aplicação das células durante a fase crônica da doença.

1.4 Imunofenotipagem

A necessidade de identificar células estimulou o desenvolvimento da imunofenotipagem. O conhecimento molecular oriundo de técnicas de imagem, como microscopia eletrônica, e o desmembramento proteico por ultracentrifugação, permitiu a purificação de proteínas. Estas tecnologias, em conjunto, com técnicas de hibridização celular, proporcionaram a produção de anticorpos monoclonais com altíssima especificidade que são a base da imunofenotipagem. Estes anticorpos permitem compor painéis capazes de identificar tipos de células, estágios maturativos e características funcionais.

A imunofenotipagem desenvolveu-se rapidamente nos últimos anos e suas aplicações estão em franca expansão em laboratórios de pesquisa básica e clínica, atuando em diferentes áreas da medicina, incluindo imunologia, patologia, oncologia, genética, bioquímica clínica, microbiologia, medicina regenerativa e terapia celular. A expansão se deu, principalmente, pelo fato da imunofenotipagem proporcionar medidas sensíveis, rápidas e precisas de uma gama relativamente ampla de células, além de análise de DNA e/ou RNA, detecção e quantificação de antígenos, análise de resistência a múltiplas drogas, potencial de membrana, medição das alterações citoplasmáticas, tais como pH ou cálcio livre entre outras (Orfao *et al*, 1995).

A técnica que acrescentou alta sensibilidade à imunofenotipagem foi a citometria de fluxo (CMF), sendo útil tanto no diagnóstico, classificação, prognóstico, estadiamento, monitoramento, como na caracterização fenotípica de células hematopoiéticas patológicas, além de inúmeras outras. A CMF avalia as propriedades celulares, no momento em que essas células se movem em uma solução eletrolítica, através de um conjunto de detectores de fluorescência. Apresenta alta sensibilidade, especificidade e precisão, permitindo análises multiparamétricas de um grande número de células em pequeno intervalo de tempo. A CMF é uma técnica que combina vários conceitos (Shapiro *et al*, 2005).

O equipamento utilizado na imunofenotipagem é denominado citômetro de fluxo (CF) e possui quatro componentes principais incluindo; um ou mais LASERs que incidem sobre as células; fotodetectores e amplificadores de sinais; suspensões celulares marcadas com anticorpos fluorescentes e um computador ligado ao sistema com um *software* de análise.

Os parâmetros celulares avaliados por esse método podem ser divididos em dois grupos principais; os evidenciados pela luz dispersa que reflete o tamanho celular designado FSC - *forward scatter* - e a complexidade interna, designado SSC - *side scatter*, caracterizando a granulosidade da célula; e os associados à detecção de cor que permite identificar a ligação de anticorpos marcados com fluorocromos que reconhecem moléculas celulares específicas, revelando características fenotípicas importantes, como grau de diferenciação celular, linhagem celular, ploidia, expressão de proteínas apoptóticas, dentre outras (Orfao *et al*, 1995).

As suspensões celulares marcadas com anticorpos fluorescentes são aspiradas e as células passam em fila, uma a uma, cruzando os feixes dos LASERs no interior da câmara de fluxo. Nesse mesmo local, detectores internos captam e enviam sinais elétricos que são medidos por um computador. Esses sinais são plotados em gráficos e histogramas em escala logarítma ou linear e analisados em regiões de parâmetros de fluorescência, através das leituras oriundas dos fotomultiplicadores, que possibilitam a análise de populações celulares diferentes, dentro de uma mesma amostra, previamente incubada com anticorpos marcados com fluorocromos distintos. (Shapiro *et al*, 2005).

Esses anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos, que possuem padrão espectral específico de absorção e de emissão de luz, quando reagem imunologicamente com a suspensão celular, permitem analisar, qualitativa e quantitativamente, padrões de expressão de moléculas de superfície designadas *cluster of differentiation* (CD) nas populações celulares de interesse, medindo simultaneamente as propriedades físicas e químicas de milhares células por minuto.

O CD é uma nomenclatura usada para a identificação e investigação de moléculas presentes na superfície das células. A utilização da nomenclatura CD expandiu-se e recentemente, para os seres humanos, existem mais de 360 CDs classificados (Matesanz-Isabel J *et al*, 2011).

Está disponível comercialmente uma gama de anticorpos conjugados com diferentes fluorocromos contra um mesmo CD, por exemplo, CD3-FITC, CD3-PE, CD3-Percp entre outros; além de vários citômetros de fluxo com capacidade de detectar essas inúmeras cores (Figura 11). A combinação desses dois fatores, atualmente, nos permite construir painéis imunofenotípicos com alta sensibilidade e especificidade ao grupo celular de interesse, possibilitando a análise de parâmetros distintos ou de populações celulares diversas em uma mesma suspensão celular.

Os fatores que mais afetam os resultados de imunofenotipagem incluem o tipo e a qualidade da amostra, os protocolos de preparação de reagentes e amostras, a calibração e subjetividade durante a análise e a interpretação dos resultados, que fazem da rigorosa padronização uma necessidade desta metodologia (Picot *et al*, 2012).

Fluorochrome	Fluorescence Emission Color	Ex-Max (nm)	Excitation Laser Line (nm)	Em-Max (nm)
Alexa Fluor® 405	Blue	401	360, 405, 407	421
Pacific Blue®	Blue	410	360, 405, 407	455
Alexa Fluor® 488	Green	495	488	519
FITC	Green	494	488	519
PE	Yellow	496, 546	488, 532	578
PE-Texas Red®	Orange	496, 546	488, 532	615
Texas Red®**	Orange	595	595	615
APC*	Red	650	595, 633, 635, 647	660
Alexa Fluor® 647	Red	650	595, 633, 635, 647	668
PE-Cy5*	Red	496, 546	488, 532	667
PerCP	Red	482	488, 532	678
PerCP-Cy5.5	Far Red	482	488, 532	695
PE-Cy7	InfraRed†	496, 546	488, 532	785
APC-Cy7	InfraRed†	650	595, 633, 635, 647	785

Figura 11: Especificação de Fluorocromos

A tabela mostra o tipo, faixa da emissão da cor, comprimentos de onda de excitação máxima, de excitação ao LASER e de emissão máxima, em nanômetros. Fonte: www.bdbioscience.com

1.4.1 Especificidade Imunofenotípica

A caracterização de uma célula ou de uma linhagem celular na amostra estudada depende da composição do painel de anticorpos escolhidos. Nesse trabalho o painel foi definido visando a identificação de precursores e células diferenciadas da fração mononuclear de medula óssea dos pacientes cardiopatas.

Cada anticorpo possui uma especificidade, entretanto, como as proteínas são comuns a múltiplas linhagens celulares, se faz necessário combinar os diferentes anticorpos contra determinados CDs, para poder caracterizar um tipo celular específico na amostra estudada. O CD4 é uma glicoproteína 55 kD que está presente na superfície de linfócitos T auxiliares e também na superfície de monócitos. Esta ambiguidade gera, tecnicamente, uma identificação errônea quando analisada isoladamente. Seguindo esse raciocínio, se associarmos no mesmo painel

o CD4 com o CD3, aumentamos a especificidade da identificação, pois o CD3 é uma proteína de 20-28 kD constitutiva de linfócitos T e ausente nos monócitos.

A escolha adequada dos anticorpos que irão se ligar aos CDs determina a qualidade de um bom painel imunofenotípico. Abaixo a Tabela 1 lista os CDs utilizados nesse estudo e suas especificações:

Tabela 1: Grupos de diferenciação (CD) e suas especificações

Adaptado de ABBAS, A.K; LICHTMAN, A.H. Imunologia Celular e Molecular; tradução de Cláudia Reali. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005, 5ª edição, pp. 523-38.

CD	Sinônimos comuns	Estrutura molecular, Família	Reatividade	Funções conhecidas ou propostas
CD3	T3; Leu-4	20-28 kD; associação das cadeias γ , δ , ϵ no complexo TCR; Superfamília Ig; ITAM na cauda citoplasmática	Linfócitos T, timócitos	Expressão na superfície celular e transdução de sinal pelo receptor antigênico dos linfócitos T
CD4	T4; Leu-3; L3T4	55 kD; superfamília Ig	Linfócitos T restritos ao MHC da classe II, subconjuntos de timócitos, monócitos e macrófagos	Sinalização e coreceptor da adesão na ativação de linfócitos T induzida por antígeno restrito ao MHC da classe II; desenvolvimento dos timócitos; receptor primário para retrovírus HIV
CD8	T8; Leu-2; Lyt2	34 kD; expressa como homodímero (CD8 α) ou heterodímero com CD8 β ; superfamília Ig	Linfócitos T restritos ao MHC da classe I, subconjuntos de timócitos	Sinalização e coreceptor de adesão na ativação de linfócitos T induzida por antígeno restrito ao MHC da classe I (liga-se a moléculas da classe I do MHC); desenvolvimento de timócitos
CD14	Mo2; receptor LPS	53 kD; ligada a PI	Monócitos, macrófagos, granulócitos, forma solúvel no soro	Liga-se ao complexo de LPS e proteína de ligação a LPS; necessária para ativação macrófagos induzida por LPS
CD19	B4	95 kD; superfamília Ig	Maioria dos linfócitos B	Ativação de linfócitos B; forma um complexo coreceptor com CD21 e CD81, transmitindo sinais que sinergizam

				com os sinais do complexo do receptor antigênico dos linfócitos B
CD33	Sialoadesina; molécula de citoadesão dependente do ácido siálico	67 kD; superfamília Ig; família das lecitinas semelhantes à Ig de ligação com o ácido siálico; ITIMs na cauda citoplasmática	Monócitos, células progenitoras mielóides	Liga-se ao ácido siálico; regulação da sinalização nas células mielóides
CD34	gp 105-120	116 kD; sialomucina	Precursos das células hematopoiéticas, células endotéliais em vênulas endoteliais altas	Adesão e células com célula; liga-se a CD62L (L-selectina)
CD	Sinônimos comuns	Estrutura molecular, Família	Reatividade	Funções conhecidas ou propostas
CD56	Leu-19; NKH1	175-220 kD; isoforma de molécula de adesão celular neural (N-CAM); superfamília Ig	Células NK, subconjunto de linfócitos T e B, cérebro	Adesão homotípica
CD64	Fc γ RI	75 kD; superfamília Ig; associada não, covalentemente, à cadeia Fc γ RI comum	Monócitos, macrófagos, neutrófilos ativados	Receptor Fc γ com alta afinidade; papel na fagocitose, ADCC e ativação dos macrófagos
CD73	Ecto-5'-nucleotidase	69-70 kD; ligada a PI	Subconjuntos de linfócitos Te B, células dendríticas foliculares do centro germinativo, mesenquimal, precursor endotelial	Ecto-5'-nucleotidase; sinalização nos linfócitos T
CD90	Thy-1	25-35- Kd; ligada a PI; superfamília Ig	Timócitos, linfócitos T periféricos, (camundongos), neurônios, mesenquimal, precursor endotelial	Marcador para linfócito T; papel na ativação de linfócitos T (?)
CD105	Endoglina	Homodímero de subunidades com 90 kD	Células endoteliais, macrófagos ativados, mesenquimais e endoteliais	Liga-se a TGF- β ; modula respostas celulares a TGF- β
CD45	Antígeno comum dos leucócitos (LCA); T200; B220	Múltiplas isoformas, 180-220 kD; família dos receptores da proteína tirosina fosfatase; família da fibronectina tipo III	Células hematopoiéticas	Tirosina fosfatase desempenha papel crítico na sinalização mediada pelo receptor antigênico de linfócitos T e B

2 Objetivo Geral

Avaliar fenotipicamente a fração mononuclear da medula óssea de pacientes com doença de Chagas e doença isquêmica crônica submetidos à terapia celular, comparando-as com a de doadores normais.

3 Objetivos Específicos

- Isolar a fração de células mononucleares provenientes do aspirado medular de pacientes com cardiomiopatia chagásica, doença isquêmica crônica e doadores normais;
- Caracterizar por citometria de fluxo o fenótipo da população de células mononucleares de pacientes portadores da doença de Chagas crônica, pacientes portadores de cardiopatia isquêmica crônica e doadores normais;
- Comparar o percentual fenotípico das populações celulares da fração mononuclear da medula óssea entre o grupo de pacientes portadores da doença de Chagas crônica e os grupos de pacientes isquêmicos crônicos e doadores normais.

4 Materiais e Métodos

4.1 Desenho do Estudo

Este estudo é um subestudo do EMRTCC, o qual propôs um tratamento, com CMMO de pacientes cardiopatas, dentre eles pacientes com doença de Chagas e doença isquêmica crônica.

O EMRTCC visava estudar 1200 pacientes divididos em quatro diferentes cardiopatias, sendo recrutados 300 pacientes para cada uma delas, conforme publicado em 2007 por Tura e colaboradores (Tura *et al*, 2007). Para a seleção dos pacientes, os mesmos, deveriam apresentar os critérios de inclusão e exclusão conforme as figuras 12 e 13, para doença isquêmica crônica e doença de Chagas, respectivamente

Desses pacientes selecionados, 20 pacientes com doença de Chagas e 14 com cardiopatia isquêmica crônica, acompanhados pelos médicos Dr. Ademir Batista da Cunha e Dr. Jose Oscar Reis Brito, responsáveis pelos respectivos estudos no INC, tiveram a fração mononuclear da medula óssea estudada no presente projeto.

Além desses pacientes, foram analisados os dados de 5 doadores de medula óssea normais. As amostras de medula óssea dos doadores saudáveis foram gentilmente cedidas pela professora Dra. Alexandra Cristina Senegaglia, advindas do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná em Curitiba (HC-UFPR).

III. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

3.1 Critérios de inclusão

Os pacientes serão elegíveis se apresentarem todas as características abaixo:

- a. Em acompanhamento ativo e regular em serviço de cardiologia com diagnóstico de doença arterial coronária aterosclerótica grave e difusa com indicação de cirurgia de revascularização miocárdica
- b. Idade entre 30 e 75 anos.
- c. Ecocardiograma mostrando fração de ejeção entre 25 e 55% (inclusive) pelo método de Simpson.
- d. Paciente sintomático classe funcional II a IV (CCS) com tratamento medicamentoso otimizado.
- e. Angina documentada por quadro clínico característico, por estudo cineangiocoronariográfico e pelos seguintes exames complementares:
 - i. Cintilografia de perfusão miocárdica com estresse farmacológico
 - ii. Ressonância nuclear magnética com estresse farmacológico
- f. Impossibilidade de resolução de todas as lesões obstrutivas por angioplastia devido a qualquer um dos 3 fatores seguintes:
 - i. Tipo Anatômico
 - ii. Extensão da Lesão
 - iii. Comprometimento do leito distal
- g. Impossibilidade de resolução de todas as lesões obstrutivas por abordagem cirúrgica OU ainda que possível, antecipa-se um resultado cirúrgico insatisfatório, devido a qualquer um dos 3 fatores seguintes:
 - i. Tipo Anatômico
 - ii. Extensão da Lesão
 - iii. Comprometimento do leito distal

Figura 12: Critérios de inclusão e exclusão – ISQ/EMRTCC

Critérios de inclusão e exclusão na seleção de pacientes com cardiopatia isquêmica crônica para o EMRTCC. (Extraído do protocolo de doença isquêmica crônica do EMRTCC)

V CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

5.1 Critérios de inclusão

Os pacientes serão elegíveis se apresentarem todas as características abaixo:

- a. Diagnóstico sintromico de insuficiencia cardiaca pelos critérios de Framingham.
- b. Em acompanhamento ativo e regular em serviço de cardiologia com diagnóstico sorológico de doença de Chagas.
- c. Idade entre 30 e 75 anos.
- d. Classe funcional III ou IV da NYHA.
- e. Tratamento medicamentoso adequado ao final do período de otimização.
- f. Ecocardiograma mostrando fração de ejeção menor do que 40% pela regra de Simpson.

5.2 Critérios de exclusão

Os pacientes serão inelegíveis se apresentarem qualquer uma das características abaixo:

- a. Doenças valvares, exceto a insuficiencia funcional mitral ou tricúspide.
- b. Coronariografia mostrando lesão significativa (obstrução de pelo menos 50% da luz de uma ou mais coronárias).
- d. Presença de episódios de taquicardia ventricular sustentada.
- e. Uso abusivo de álcool ou drogas ilícitas em curso (Baseado no DSM IV).
- f. Qualquer co-morbidade com impacto na sobrevida em 2 anos.

Obs.: A anuência de cada um dos pacientes elegíveis, por meio da assinatura de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, será a última etapa a ser vencida para a seleção do grupo de pacientes que fará parte do estudo. Este termo será elaborado em linguagem acessível e informará ao paciente todos os aspectos importantes inerentes à pesquisa que devem ser por ele conhecidos, conforme prevê em detalhes a Resolução CNS nº 196/96.

Figura 13: Critérios de inclusão e exclusão – CHG/EMRTCC

Critérios de inclusão e exclusão na seleção de pacientes com cardiopatia chagásica para o EMRTCC (Extraído do protocolo de cardiopatia chagásica do EMRTCC)

Todos os protocolos do EMRTCC foram aprovados pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). O EMRTCC está registrado sob número 4108 junto a CONEP e esse subprojeto foi submetido a comissão de ética em pesquisa (CEP) do INC e aprovado sob número 0335/27-05-2011. Aos pacientes foi aplicado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pertinente a cada cardiopatia, os mesmos se encontram no ANEXO I e II para consulta.

4.2 Isolamento de Células Mononucleares da Medula Óssea (CMMO):

As CMMO foram obtidas por punção de medula óssea da crista ilíaca dos pacientes portadores da doença de Chagas crônica e pacientes com doença isquêmica crônica, realizada por hematologista em centro cirúrgico.

O aspirado medular, recolhido em vinte seringas de 20 mL, foi transportado de forma estéril, envolto em campo cirúrgico, até a área limpa, certificada e classificada como ISO classe 7 pela norma ISO14644-1, onde foi processado, dentro de uma cabine de segurança biológica com fluxo laminar, assegurando, assim, a esterilidade do material.

O campo cirúrgico estéril interno, que envolve a cuba rim com as seringas contendo a medula óssea aspirada, foi então aberto dentro da cabine de segurança biológica para posterior filtração da mesma.

O processo de filtragem da medula óssea foi feito com o auxílio do kit de filtração para medula óssea da Universidade de Washington. O mesmo é composto por dois beckers, mesa de sustentação, suporte de filtração, duas membranas filtrantes - uma grossa de 250 μm e outra mais fina de 150 μm - e um êmbolo. Todo aparato para filtração da medula óssea é montado, previamente, dentro da cabine de segurança biológica.

A um Becker, devidamente apoiado na mesa de sustentação, adiciona-se 2 mL de heparina sódica (Roche). O aspirado de medula óssea é transferido das seringas para esse Becker, após conferência do volume total de medula óssea

obtido, entre 50-100mL. Esse valor é importante na obtenção das relações de concentração pertinentes ao processamento como um todo.

A medula óssea heparinizada é então diluída em solução fisiológica de Cloreto de Sódio 0,9% estéril (HalexIstar) na proporção 1:1 e depois pré-filtrada em membrana de filtração de malha grossa (250 μm), afim de eliminar espículas de osso e possíveis coágulos. O embolo só é usado no caso do conteúdo não passar pelo filtro com a força da gravidade. O pré-filtrado passa, então, por nova filtração, dessa vez, utilizando uma membrana de malha mais delgada (150 μm).

O volume final de medula filtrada é colocado em tubos cônicos de centrifugação de 50 mL de volume, lentamente, com o auxílio de pipetas sorológicas, sobre 20mL de Ficoll-Paque Premium (Amershan Bioscience, produto licenciado para uso humano / GMP), reagente que promove a separação das células por gradiente de densidade após centrifugação. A proporção entre a medula e Ficoll deve ser de 3:2. Esse mistura heterogênea, que deve apresentar duas fases distintas, é, então, centrifugada a 550xg por 25 minutos a 25°C, com tempo de aceleração máximo e, preferencialmente, livres de frenagem.

Acabado esse tempo de centrifugação, forma-se uma mistura dividida em 4 fases. A camada gordurosa no sobrenadante é coletada e desprezada. Coleta-se, então, cuidadosamente, o anel de CMMO formado acima da camada de Ficoll, recolhendo-o em dois tubos cônicos de centrifugação de 50 mL de volume. Nas duas últimas camadas, estão o Ficoll e, mais abaixo, os granulócitos e eritrócitos. Completa-se o volume dos tubos contendo os anéis de CMMO para 45 mL com solução fisiológica de Cloreto de Sódio 0,9% estéril (HalexIstar), centrifugando-os a 200xg por 10 minutos a 15°C.

Após, transfere-se os precipitados de células para um único tubo cônico de centrifugação de 50 mL de volume e ressuspendem-se as células em solução fisiológica de Cloreto de Sódio 0,9% estéril (HalexIstar), acrescida de 5% de soro autólogo do paciente, obtido por punção venosa de sangue periférico, antes do início do procedimento de punção da medula óssea. Após, leve homogeneização manual, esse material passa por uma nova centrifugação, igual a anterior.

O precipitado formado é ressuspendido em 2 mL de solução de cloreto de sódio 0,9% contendo 5% de soro autólogo. Desse volume, retira-se uma alíquota para contagem do número das células nucleadas, em Câmara de Neubauer, utilizando líquido de Turk (solução aquosa de Violeta Genciana e ácido acético 2%) e, pelo método de exclusão, com o reagente Azul de Tripan 0,4% em solução de cloreto de sódio a 0,81% e 0,06% de fosfato de potássio dibásico (Trypan Blue, SIGMA) estima-se a viabilidade celular.

Com esses dados determinados, separam-se alíquotas da amostra para os devidos fins, segundo as concentrações abaixo:

- Imunofenotipagem: 10×10^6 células;
- Ensaio de formação de colônias: 8×10^6 células;

As amostras utilizadas na imunofenotipagem por citometria de fluxo tiveram seu procedimento realizado a fresco. As células, com as quais se realizou os ensaios de formação de colônia, foram congeladas, da mesma forma que as células de pacientes que receberam placebo no EMRTCC. Os protocolos de congelamento e descongelamento serão descritos no texto que explica os ensaios em que essas células foram utilizadas.

Na figura 14 temos representadas as etapas do procedimento de isolamento da fração de células mononucleares.

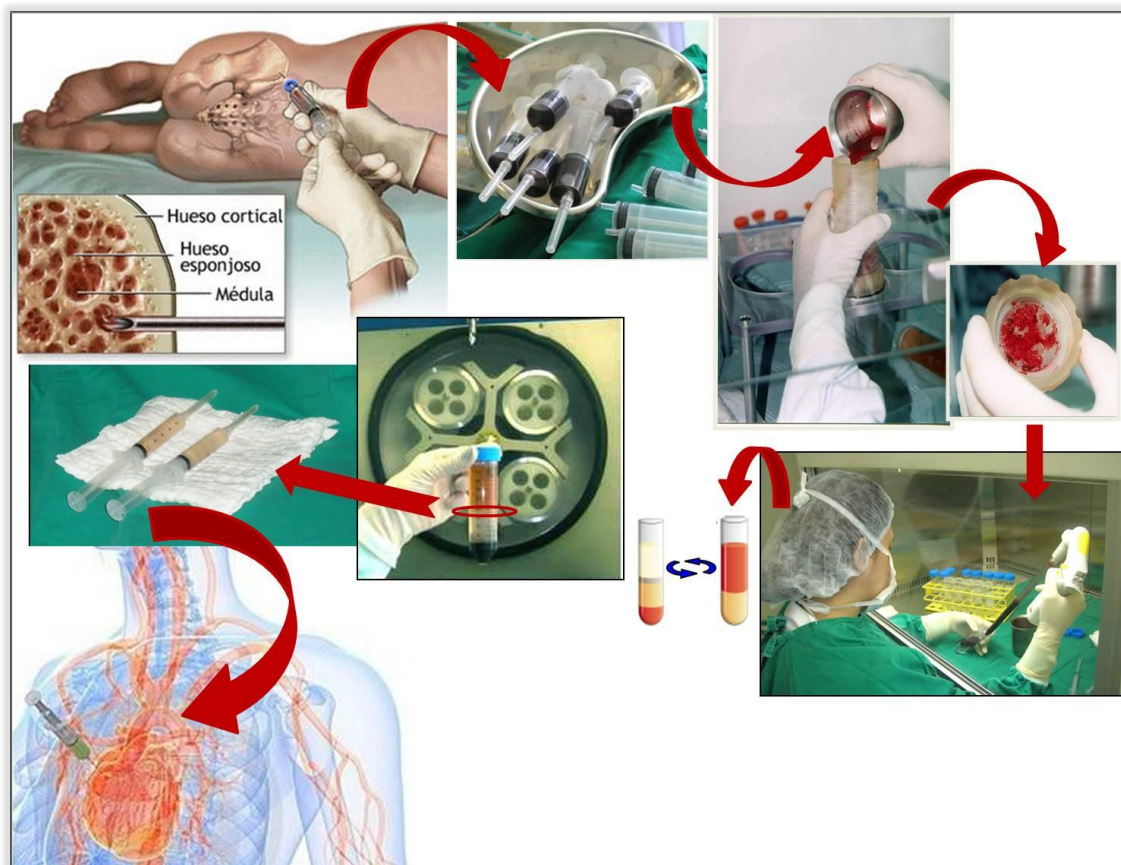


Figura 14: Etapas do aspirado e isolamento de CMMO.

É realizada punção de medula óssea da crista ilíaca dos pacientes. Em seguida este aspirado passa por um processo de diluição e é submetido à filtrações. O enriquecimento da fração de CMMO é realizado pela sua separação por gradiente de centrifugação com ficoll. As células são recolhidas, lavadas e centrifugadas até a obtenção das CMMO que são aspiradas em seringas e entregues aos responsáveis por sua liberação no coração do paciente.

4.3 Quantificação, Viabilidade e Criopreservação Celular

Esses procedimentos serão descritos nos protocolos, passo-a-passo, nos itens abaixo.

4.3.1 Contagem das Células Nucleadas Totais:

1. Diluir a suspensão de células com o Líquido de Turk. A diluição inicial deve ser de 1:100 (10 μ L de células diluídas 10X em salina contendo soro autólogo para 90 μ L de Líquido de Turk);
2. Homogeneizar com auxílio de pipetador e ponteira de 200 μ L e aplicar uma alíquota (10 μ L) na Câmara de Neubauer;
3. Observar ao microscópio. Todas as células nucleadas coram em azul. As hemácias são mortas e degradadas, por ação do ácido acético contido no Líquido de Turk e não são vistas;
4. Contar as células encontradas nos 4 quadrantes e fazer os cálculos, conforme apresentado no item 4.3.5

A diluição ideal para a contagem de células na Câmara de Neubauer é aquela que permite a contagem de 20 a 200 células por cada um dos 4 quadrantes da Câmara de Neubauer. Assim, se a contagem inicial de células não estiver dentro desta faixa, fazer nova diluição, aumentando-a ou diminuindo-a, até que seja alcançada a diluição ideal. Sugere-se que se retire uma alíquota de 10 μ L de CMMO (pellet de 1mL) e dilua em 90 μ L de salina com soro autólogo para obtenção de amostra já diluída 10X para contagem em líquido de Turk e em azul de Tripán.

4.3.2 Análise de viabilidade celular:

1. Diluir a suspensão de células em salina (soro fisiológico) suplementada com 5 a 10% de soro fetal bovino, plasma humano ou albumina humana;
2. Após estar na presença de soro fetal bovino, plasma humano ou albumina humana, diluir a suspensão de células com a Solução de Azul de Trypan 0,4%, obtendo a diluição de 1:2 (1 parte da suspensão celular para 1 parte da Solução de Azul de Trypan 0,4%);
3. Uma alíquota desta deve ser aplicada à câmara de Neubauer e observada ao microscópio;
4. As células vivas permanecem refringentes e incolores e as mortas são coradas em azul. Contar as células coradas em azul, presentes nos 04 quadrantes da Câmara de Neubauer.
5. Proceder aos cálculos para determinação da viabilidade celular conforme descrito no item 4.3.5

Com o uso da câmara de Neubauer, para que se alcance a precisão da contagem de células, a diluição total deve permitir a contagem de 20 a 200 células totais (vivas + mortas) por quadrante da câmara de Neubauer. No entanto, deve-se considerar que a 2ª diluição, com a Solução de Azul de Trypan, é sempre de 1:2. A 1ª diluição (em salina) é a que pode ser ajustada.

A mistura da suspensão celular com a Solução de Azul de Trypan deve ser feita imediatamente antes da contagem.

4.3.3 Criopreservação das Células:

Conforme mencionado anteriormente, 8×10^6 células da fração mononuclear de cada paciente foram criopreservadas para esse ensaio, em alíquotas de 2 mL em criotubos. O congelamento das células foi realizado no Instituto Nacional de Cancer (INCA) no Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário (BSCUP) em equipamento de congelamento programável com temperatura controlada da marca Custom Biogenic Systems (Michigan, EUA) em período inferior a 4 horas após procedimento.

O congelamento por esse método segue o protocolo abaixo:

Aliquotamos, em criotubo de 2 mL, com tampa rosca, o concentrado de células entre 0,5 e 5×10^8 células/mL em solução de NaCl 0,9% + soro autólogo 5%. Adicionamos a solução de criopreservação às células. Essa solução de congelamento é composta por dimetilsulfóxido 20% (DMSO- Sigma), e solução dextran 10% (Sigma). Utilizamos 200µL de DMSO em 800µL de solução de dextran a 10%. Para o congelamento, utilizamos iguais volumes do concentrado de células e da solução de criopreservação (1:1 - vol:vol) totalizando um volume menor do que 2 mL. Assim, obtivemos uma concentração final de células entre 0,25 e $2,5 \times 10^8$ células/mL em DMSO 10% e dextran 4%. Os criotubos prontos foram dispostos no freezer de congelamento programável, que utiliza os passos descritos na tabela 2, mantendo o processo controlado.

Tabela 2: Criopreservação automática

Esquema para procedimento de congelamento em equipamento de criopreservação programável

Passo	Temperatura Final (°C)	Velocidade de Resfriamento (°C /min)
1	4	2 (equilibrar a câmara)
2	4	Manter a temperatura até colocar a amostra
3	-4	1
4	-40	25
5	-12	10
6	-40	1
7	-90	10
8	-90	Manter a temperatura até retirar a amostra

As células congeladas foram retiradas do equipamento e mantidas congeladas em nitrogênio líquido (N₂), até a utilização das mesmas para os ensaios.

Conforme a necessidade de realização dos ensaios, as células foram rapidamente descongeladas utilizando banho Maria a 37°C e lavadas três vezes com RPMI1640 (GIBCO) contendo 10% de soro fetal bovino (GIBCO). Depois de lavadas, as células foram ressuspensas em PBS em uma concentração final de $1,0 \times 10^6$ células/ mL (Islam *et al*, 1995).

A viabilidade celular foi avaliada pela coloração azul Trypan (GIBCO), conforme protocolo descrito anteriormente. O material foi processado quando se observava células viáveis acima de 70%.

4.3.4 Uso da Câmara de Neubauer para Contagem e Viabilidade Celular

A câmara de Neubauer possui o desenho de uma grade, a qual é visualizada apenas ao microscópio. Esquemáticamente, esta grade é composta por 4 quadrantes localizados um em cada extremidade. No esquema representado na figura 15, os quadrantes estão nos círculos grandes. Cada quadrante possui dezesseis quadrados menores.

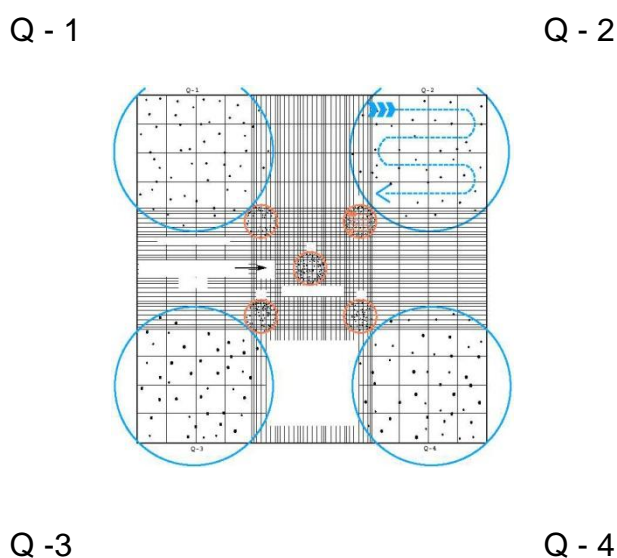


Figura 15: Câmara de Neubauer
Desenho esquemático da câmara de Neubauer e seus quatro quadrantes

Cada quadrante possui área de $0,1 \text{ mm}^2$. Ao adaptar uma lamínula de vidro à câmara de Neubauer, obtém-se altura de $0,1 \text{ mm}$. A capacidade de volume é, portanto, de $0,1 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm}^2 = 0,1 \text{ mm}^3$ ($0,1 \text{ mm}^3 = 0,0001 \text{ cm}^3 = 0,0001 \text{ mL}$ ou 10^{-4} mL).

Esta medida padronizada possibilita a quantificação da suspensão celular. Para isto deve-se contar as células presentes nos 4 quadrantes (círculos grandes),

no sentido sugerido pela seta para cada quadrante. Em seguida, o número total de células obtido nos quatro quadrantes é dividido por quatro (média) e multiplicado pelo valor da diluição realizada. Ao final, o valor encontrado é multiplicado por 1×10^4 /mL (ordem de grandeza da câmara).

$$\frac{\sum Q1Q2Q3Q4}{4} * dil * 1 \times 10^4 / mL = n^\circ \text{ de células/mL} \therefore dil \text{ é a diluição (ou a}$$

multiplicação das diluições feitas)

4.3.5 Cálculos de Número de Células Mortas:

(1) número de células mortas (azuis) por mL:

$$\frac{\sum Q1Q2Q3Q4}{4} * dil * 1 \times 10^4 / mL = n^\circ \text{ de células (azuis)/mL} \therefore dil \text{ é a diluição realizada}$$

(ou a multiplicação das diluições feitas)

(2) % de viabilidade:

$$viabilidade(\%) = \frac{vivas * 100}{totais} \therefore \text{vivas são células vivas; e, } totais \text{ são células vivas}$$

+ mortas (azuis)

4.3.6 Protocolo de Preparo de Reagentes

4.3.6.1 Líquido do Turk:

1. Misturar os reagentes:

- 97 mL de água injetável

- 1 mL de Solução Aquosa de Violeta de Genciana a 1% (em pó - SIGMA, catálogo SIGMA - G 2039)

- 2 mL de ácido acético

2. Homogeneizar;

3. Armazenar a temperatura ambiente.

4.3.6.2 Solução de Azul de Tripán

1. Misturar os reagentes:

- 0,4 g do pó de azul de Tripán (SIGMA, catálogo SIGMA - T 6146)

- 100 mL de solução NaCl 0,9% (HalexIstar)

2. Homogeneizar em agitador magnético por aproximadamente 20 min;

3. Filtrar com papel de filtro em sistema estéril, com membrana 0,22 µm (Sistema Swinex 35 mm, Millipore Inc.) e manter a solução estéril;

4. Armazenar a temperatura ambiente.

4.4 Infusão Células Mononucleares da Medula Óssea (CMMO):

Após o processamento de obtenção das CMMO, as mesmas são enviadas imediatamente para os setores de Hemodinâmica ou Centro Cirúrgico, onde era realizada a infusão ou injeção de CMMO nos pacientes com cardiomiopatia chagásica e isquêmica, respectivamente, segundo protocolos abaixo:

4.4.1 Protocolo de Infusão das CMMO para cardiomiopatia chagásica:

As CMMO foram liberadas via cateterismo no setor de hemodinâmica do INC.

4.4.1.1 Preparo do Paciente para o Cateterismo:

- 1- Punção arterial de artéria femoral ou artéria radial e introdução de bainha 6F
- 2- Administrar 10.000 UI de heparina pela bainha
- 3- Uso de contraste de baixa osmolaridade quando necessário.
- 4- Administrar Monocordil intracoronário - solução de 1 ampola de monocodil contendo 1 mL=10mg diluído em 9mL de solução NaCl 0,9% (HalexIstar) – administrar 5 mL bolus no início do procedimento e doses subseqüentes conforme julgamento clínico.
- 5- Angiografia pré-infusão de células: Em filmagem de 30 quadros/seg. Realizar ao menos uma projeção que permita avaliar o TIMI frame count tomando-se assim cuidado de visualizar marcas distais do vaso sem movimentar a mesa de exame.

4.4.1.2 Liberação por Cateterismo das CMMO

Injetou-se, no mínimo, um total de 100×10^6 células mononucleares de medula óssea (CMMO) diluídas em 20 mL de soro autólogo a 5%. Através de cateter infusional posicionado seletivamente com auxílio de guia de 0,014 e velocidade de infusão 2 mL/min. A seletividade se faz a partir da dominância descrita abaixo e da distribuição volumétrica para cada uma.

Dominância Direita

Sistema da ACD - 5mL

Sistema da ACX - 5mL

Sistema da ADA - 10 mL

Dominância Esquerda

Sistema da ACD - 2 mL

Sistema da ACX - 8 mL

Sistema da ADA - 10 mL

Observação 1: Quando havia Artéria Diagonalis as células eram implantadas nesta artéria também.

Observação 2: Quando havia uma das artérias hipotrófica, compensava-se os volumes da infusão celular na artéria maior.

Na figura 16 temos representadas esquematicamente as principais artérias coronárias.

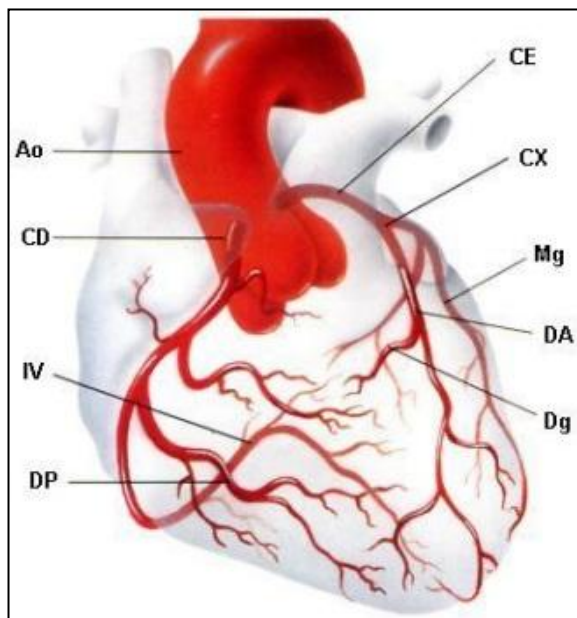


Figura 16: Visão anterior das artérias coronárias.

Os ramos principais são a coronária direita (CD) e os ramos descendente anterior (DA) e circumflexo (CX) da coronária esquerda. Ao - artéria aorta; CD - coronária direita; IV - ramo interventricular; DP - ramo descendente posterior; CE - coronária esquerda; CX - ramo circumflexo; Mg - ramo marginal; DA - ramo descendente anterior; Dg - ramo diagonal. Fonte: www.iatreion.warj.med.br

4.4.2 Protocolo de Infusão das CMMO para Cardiomiopatia

Isquêmica:

Do material celular contendo cerca de 100×10^6 células diluídas em 5mL de solução fisiológica, 4 mL foram injetados em áreas pré-determinadas como de pior perspectiva para realização de enxerto venoso/arterial, durante a cirurgia de revascularização miocárdica, realizando tantos enxertos (venosos/arteriais) fossem possíveis.

O cirurgião localiza, previamente, as áreas onde serão implantadas as células, por método não invasivo, determinando se são isquêmicas e viáveis, mas sem

possibilidade de tratamento ou de mau prognóstico cirúrgico. Nestas áreas, através de seringas de 1mL, foram injetadas o volume total de 4mL de infusão celular em pelo menos 20 pontos diferentes na área escolhida. A partir daí, o restante da cirurgia transcorre normalmente.

4.5 Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo consiste de uma tecnologia a laser que possibilita a análise simultânea de inúmeras características de uma célula ou partícula, que esteja em meio fluídico e em fluxo contínuo. Essa análise consiste na utilização de um equipamento denominado Citometro de Fluxo que apresenta três subsistemas: o fluídico, óptico e eletrônico.

Para que o citometro de fluxo faça essa análise é necessário o preparo das células a serem analisadas por metodologias de biologia celular, basicamente, através da reação antigênica entre antígeno e anticorpo.

Por último, a leitura dessas reações antigênicas no citometro de fluxo, é analisada usando a lógica multiparamétrica, a fim de se obter o maior número de informações possíveis a respeito das células em estudo.

4.5.1 Citometro de Fluxo

No nosso estudo, o citômeto de fluxo utilizado foi FACS Canto (BD - Becton, Dickinson and Company). Esse equipamento é composto de quatro componentes principais (Figura 17):

1. Câmara de fluxo
2. Sistema de óptico
3. Conversor e amplificador de sinais (fotomultiplicadores – PMTs)
4. Computador e *softwares* de análise

A câmara de fluxo introduz e alinha as células em um fluxo contínuo de modo que elas passem, uma a uma, frente ao feixe de luz, formando uma convergência hidrodinâmica controlada pela pressão fluídica.

O sistema óptico é composto por um ou mais LASER, e por lentes e filtros que moldam e alinham o feixe de luz emitida por esses LASERs. As lentes e filtros captam e conduzem a dispersão de luz fluorescente emitida pelas células marcadas para fotomultiplicadores (PMTs), gerando sinais elétricos. Esses são amplificados, de forma linear ou logarítmica, e convertidos para a forma digital, sendo enviados para um computador para análise dos sinais.

O processo de coleta de dados a partir de amostras utilizando o citômetro de fluxo é chamado de "Aquisição". Aquisição é mediada por um computador conectado fisicamente ao citômetro de fluxo e o software que manipula a interface digital com o citômetro.

O *software* é capaz de ajustar os parâmetros (sensibilidade, compensação, etc) para a amostra que está sendo testado, e também auxilia na exibição de informações de amostra inicial, enquanto a aquisição de dados de amostra para assegurar que os parâmetros estão definidos corretamente.

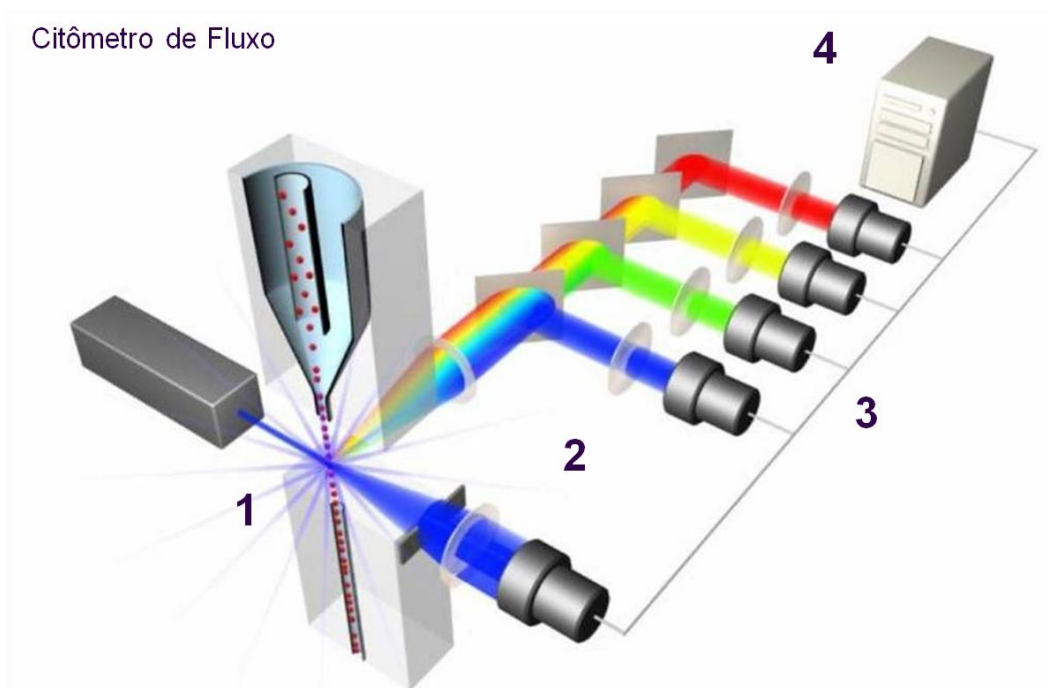


Figura 17: Citômetro de Fluxo

Desenho esquemático de um citômetro de fluxo: **(1)** Câmera de fluxo, por onde as células passam enfileiradas frente a um LASER. **(2)** Sistemas óticos que captam a luz produzida pela passagem da célula. **(3)** Conversores e amplificadores de sinais ou fotomultiplicadores (PMTs). **(4)** Computadore e software que captam os sinais eletrônicos decodificando-os para serem analisados por software específicos.

4.5.2 Marcação Imunofenotípica

A caracterização das células de CMMO, por citometria de fluxo, ocorre através da ligação entre anticorpo monoclonal e uma proteína específica da membrana celular. Este anticorpo é previamente conjugado com um fluorocromo gerando uma ligação estável em sua fração Fc. Essa conjugação tem por objetivo revelar através da emissão de fótons do fluorocromo excitados pelo LASER, do citômetro de fluxo, a presença da reação antígeno-anticorpo, caracterizando a presença do fenotipo na célula alvo (figura 18). O processo técnico que permite a ocorrência dessa reação imunológica é conhecido como marcação imunofenotípica e está descrita abaixo.

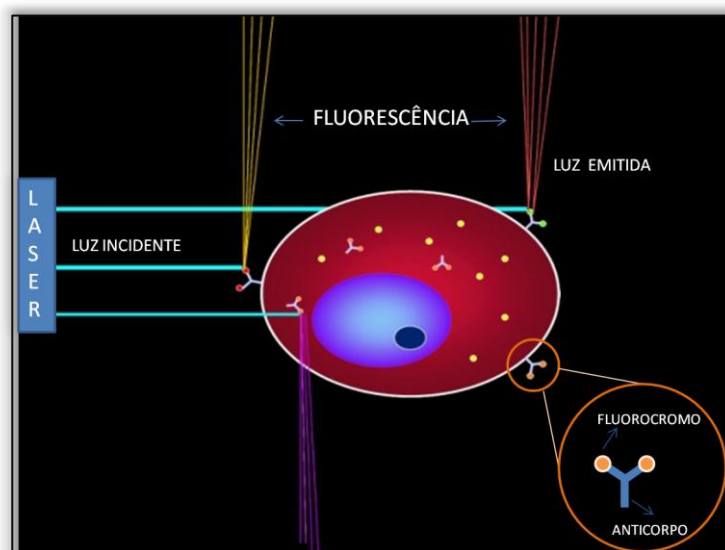


Figura 18: Marcação Imunofenotípica

Desenho esquemático da incidência do feixe de luz do LASER sobre a célula marcada em sua superfície, com anticorpos ligados a fluorocromos, os quais quando excitados emitem a fluorescência que será captada por filtros e fotomultiplicadores do citômetro de fluxo.

4.5.3 Painel Imunofenotípico

A marcação celular realizada nesse trabalho foi feita em cinco tubos de citometria para cada amostra de CMMO, seguindo as combinações de anticorpos monoclonais conjugados à fluorocromos específicos, conforme tabela 3, onde estão relacionados marcas e números de catálogo dos mesmos.

Tabela 3: Painel Imunofenotípico do estudo

Painel de anticorpos monoclonais conjugados aos diferentes fluorocromos utilizados para o estudo da fração CMMO extraído do painel do EMRTCC.

TUBO	APC	FITC	PE	PECY5	PECY7
1	CD45 BD 340942	CD8 BD 347313	CD3 BD 347347	CD4 BD 347324	CD34 BD 348801
2	CD45 BD 340942	CD19 BD 347453	CD56 BD 347747	-	CD34 BD 348801
3	CD45 BD 340942	CD105 IMMUNOSTEP 2209060105	CD73 BD PHARMIGEN 550257	CD90 BD PHARMIGEN 555597	CD34 BD 348801
4	CD45 BD 340942	CD64 BD PHARMIGEN 555527	CD34 -14 BD 348057 BD 347497	-	CD33 BD 333949
5	Branco				

Fluorocromos: APC (do inglês *allophycocyanin*), FITC (do inglês *Fluorescein isothiocyanate*), PE (do inglês *Phycoerythrin*), PE-CY5 (do inglês *Phycoerythrin cyano5*) e PE-CY7 (do inglês *Phycoerythrin cyano7*)

O painel imunofenotípico é composto com a melhor combinação entre os fluorocromos disponíveis, de forma que os mesmos tenham o mínimo de sobreposição de cores aumentando a especificidade de análise.

Nosso painel foi desenhado com o objetivo de identificar linhagens celulares conforme descritos abaixo:

- CD45-APC, CD8-FITC, CD3-PE, CD4-PECY5 e CD34 PECY7

A especificidade desse tubo foi projetada para identificar a população e subpopulações de linfócito T. O CD45 identifica a linhagem hematopoiética como um todo. O CD3 identifica a população de linfócitos T total (CD3+) e o fenótipo, CD45+CD3+CD4+CD8-, a subpopulação T auxiliar, bem como o CD45+CD3+CD8+CD4-, identifica a subpopulação T citotóxica. A tripla reatividade de CD45 fraco, CD3+CD34+ identifica precursores de linfócitos T.

- CD45-APC, CD19-FITC, CD56-PE e CD34 PE CY7

A especificidade desse tubo foi projetada para identificar a população de linfócitos B e *Natural Killers* (NK). O CD45 identifica a linhagem hematopoiética. A combinação de CD45+CD19+CD56-CD34- identifica linfócitos B maduros e a combinação CD45+CD19+CD56-CD34+ linfócitos B imaturos. As células NK maduras são identificadas com a combinação de CD45+CD56+CD19-CD34-.

- CD45-APC, CD105-FITC, CD73-PE, CD90-PE CY5 e CD34 PE CY7

Este tubo foi projetado para identificar precursores, dentre eles os hematopoiéticos, segundo o protocolo ISHAGE com fenótipo CD45+fracoCD34+forte (Barnett D, 1999). Os precursores mesenquimais, com fenótipo CD105+CD73+CD90+CD34-CD45- e os endoteliais com CD105+CD73+CD90+CD34+CD45-.

- CD45-APC, CD64-FITC, CD34-PE, CD14-PE e CD33 PE CY7. A especificidade desse tubo foi projetada para identificar a população de neutrófilos com fenótipo CD45+SSC[↑]CD64-/+CD33+CD34-CD14-, de monócitos maduros CD45+CD14+CD64+CD33+CD34- e de precursores monocíticos com o fenótipo CD45+CD33+CD64+CD14-CD34+, levando em conta o movimento ontogênico, que se dá com a positividade do CD64 no precursor CD34+ e termina com o ganho de CD14, negatizando o CD34 no mesmo.

- CMMO sem marcação (tubo branco)

Esse tubo foi projetado para subtrair a autofluorescência e ligações inespecíficas.

Em cada tubo (tubo cristal 10 x 75 mm - Eurotubo), transferiu-se o equivalente a 500.000 células de CMMO e, a essa fração, adicionou-se os AcMo, nas quantidades recomendadas pelo fabricante ou após titulação de cada anticorpo (2-3 μ L), incubando-as durante 20 minutos à temperatura ambiente e protegidas da luz. Ao término do período de incubação, procedeu-se a lavagem das células para retirar do excesso de anticorpos, ou seja, o que não se ligou às células. Assim, adicionou-se, a cada tubo, 2 mL de PBS (Hemagen Diagnostics) que posteriormente foram centrifugados a 400xg por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado ressuspensão acrescentou-se 500 μ L de PBS, em cada tubo, para proceder à leitura da reação no citometro de fluxo.

4.5.4 Análise Multiparamétrica

A análise fenotípica das diferentes populações celulares presentes nas amostras de CMMO obtidas nesse estudo foi realizada pela análise multiparamétrica por citometria de fluxo com auxílio do software Infinicyt (Citognos), seguindo os seguintes passos para realizar a análise:

- **Identificação da população de células mononucleares:**
 - Selecionamos no histograma de morfologia (FSC X SSC) as células posicionadas no primeiro quadrante de ambos os eixos.

- Dentro dessa população selecionamos no histograma de SSC X CD45 as mononucleares hematopoiéticas (CD45+) e não hematopoiética (CD45-).

• **Identificação de precursores eritróides:**

- A análise de eritroblastos foi realizada por seleção negativa. Excluímos todos os tipos celulares já previamente identificados.

- Selecionamos as células CD45-/CD34+/- e conferimos se esta população possuía as características morfológicas condizentes com a população de precursores eritróides (FSC↓) no histograma de morfologia (FSC X SSC).

- Finalmente, retornamos com todas as células excluídas anteriormente e verificamos o percentual relativo ao total da amostra analisada que corresponde aos eritroblastos.

• **Identificação da população de células-tronco hematopoiéticas (HSC):**

- Selecionamos as células CD45+fraco

- Dentro da população CD45+fraco selecionamos as células CD34+forte.

- Na população CD45+fraco CD34+forte conferimos se esta população possui as características morfológicas condizentes com a população de HSC no histograma de morfologia (FSC X SSC). O local dessa população, nesse histograma, é muito característico, pois se encontram entre as principais populações de leucócitos.

- Finalmente, retornamos com todas as células excluídas anteriormente e verificamos o percentual relativo ao total da amostra analisada que corresponde à HSC.

- Segundo o protocolo ISHAGE, procedemos com a extração, da análise, dos precursores eritróides acima descritos.

• **Identificação da população de células-tronco mesenquimais (MSC):**

- Selecionamos as células CD45- e excluímos o restante.

- Dentro da população CD45- selecionamos as células CD34-.

- Na população CD45-CD34- identificamos a população CD90+.

- Na população CD45-CD34-CD90+ selecionamos as células CD105+.
 - Dentro da população CD45-CD34-CD90+CD105+ selecionamos as células CD73+.
 - Observamos ainda se as células CD45-CD34-CD90+CD105+CD73+ eram negativas para HLA-DR e CD19.
 - Assim, conferimos se a população CD45-CD34-CD90+CD105+CD73+HLA-DR-CD19-.
 - Finalmente, retornamos com todas as células excluídas anteriormente e verificamos o percentual relativo ao total da amostra analisada que corresponde à MSC.
- **Identificação da população de células precursoras endoteliais (EPC):**
- Selecionamos as células CD45- e excluímos o restante.
 - Dentro da população CD45- selecionamos as células CD34+.
 - Na população CD45-CD34+ identificamos a população CD90+.
 - Na população CD45-CD34+CD90+ selecionamos as células CD105+.
 - Dentro da população CD45-CD34+CD90+CD105+ selecionamos as células CD73+.
 - Observamos ainda se as células CD45-CD34+CD90+CD105+CD73+ eram negativas para HLA-DR e CD19.
 - Assim, conferimos se a população CD45-CD34+CD90+CD105+CD73+HLA-DR-CD19-.
 - Finalmente, retornamos com todas as células excluídas anteriormente e verificamos o percentual relativo ao total da amostra analisada que corresponde a EPC.

- **Identificação da população de Neutrófilos:**

- Seleccionamos as células CD45+ e excluimos o restante.
- Dentro da população CD45+ seleccionamos as células granulares (SSC).
- Na população CD45+SSC \uparrow excluimos as células CD64+.
- Dentro da população CD45+SSC \uparrow CD64-/+ seleccionamos as células CD33+
- Verificamos na população CD45+SSC \uparrow CD64-/+CD33+ se não há células positivas para CD34 e CD14
- Na população CD45+SSC \uparrow CD64-/+CD33+CD34-CD14- conferimos se esta população possui as características morfológicas condizentes com a população de neutrófilos (SSC \uparrow) no histograma de morfologia (FSC X SSC).
- Finalmente, retornamos com todas as células excluídas anteriormente e verificamos o percentual relativo ao total da amostra analisada que corresponde aos neutrófilos.

- **Identificação da população de monócitos maduros:**

- Seleccionamos as células CD45+ e excluimos o restante.
- Dentro da população CD45+ seleccionamos as células CD64+.
- Dentro da população CD45+CD64+ seleccionamos as células CD14+.
- Dentro da população CD45+CD14+CD64+ seleccionamos as células CD33+.
- Na população CD45+CD14+CD64+CD33+ conferimos se esta população possui as características morfológicas condizentes com a população de monócitos, FSC e SSC intermediários, no histograma de morfologia (FSC X SSC).
- Finalmente, retornamos com todas as células excluídas anteriormente e verificamos o percentual relativo ao total da amostra analisada que corresponde aos monócitos maduros.

- **Identificação da população de precursores monocíticos:**

- Selecionamos as células CD45+ e excluimos o restante.
- Dentro da população CD45+ selecionamos as células CD33+.
- Dentro da população CD45+CD33+ selecionamos as células CD64+.
- Dentro da população CD45+CD33+CD64+ excluimos as células CD14-.
 - Dentro da população CD45+CD33+CD64+CD14- selecionamos as células CD34+.
 - Na população CD45+CD33+CD64+CD14-CD34+ conferimos se esta população possui as características morfológicas condizentes com a população de precursores monocítico, FSC e SSC intermediários, no histograma de morfologia (FSC X SSC).
 - A partir dessa população definida, analisamos o histograma CD14/34 versus CD64 e visualizamos se a população está na posição do movimento ontogênico que inicia com a positividade do CD64 no precursor CD34+ e termina com o ganho de CD14.
 - Finalmente, retornamos com todas as células excluídas inicialmente e verificamos o percentual relativo ao total da amostra analisada que corresponde aos precursores monocíticos.

- **Identificação da população de Linfócitos T:**

- Selecionamos as células CD45+ e excluimos o restante.
- Dentro da população CD45+ selecionamos as células CD3+.
- Na população CD45+CD3+ identificamos duas subpopulações: linfócitos T auxiliar (CD45+CD3+CD4+CD8-) e linfócitos T citotóxicos (CD45+CD3+CD8+CD4-).

- Na população CD45+CD3+CD4+ ou CD8+ conferimos se esta população possui as características morfológicas condizentes com a população de linfócitos (FSC↓ e SSC↓) no histograma de morfologia (FSC X SSC).

- Finalmente, retornamos com todas as células excluídas anteriormente e verificamos o percentual relativo ao total da amostra analisada que corresponde a linfócitos T.

• **Identificação da população de Linfócitos B:**

- Seleccionamos as células CD45+ e excluímos o restante.

- Dentro da população CD45+ seleccionamos as células CD19+.

- Verificamos na população CD45+CD19+ se não há células positivas para CD56

- Na população CD45+CD19+CD56- conferimos se esta população possui as características morfológicas condizentes com a população de linfócitos (FSC↓ e SSC↓) no histograma de morfologia (FSC X SSC).

- Finalmente, retornamos com todas as células excluídas anteriormente e verificamos o percentual relativo ao total da amostra analisada que corresponde aos linfócitos B.

• **Identificação da população de Natural Killer:**

- Seleccionamos as células CD45+ e excluímos o restante.

- Dentro da população CD45+ seleccionamos as células CD56+.

- Verificamos na população CD45+CD56+ se não há células positivas para CD19

- Na população CD45+CD56+CD19- conferimos se esta população possui as características morfológicas condizentes com a população de natural killer (FSC↓ e SSC↓) no histograma de morfologia (FSC X SSC).

- Finalmente, retornamos com todas as células excluídas anteriormente e verificamos o percentual relativo ao total da amostra analisada que

corresponde a natural killer (localizam-se logo acima dos linfócitos no eixo de granulosidade SSC).

5 Análises Estatísticas

Utilizamos o teste de normalidade de D'Agostino & Pearson para análise das variáveis contínuas. Para análise dos dados referentes aos tipos celulares, foi realizado o teste de Mann-Whitney. A análise estatística foi realizada através do software GraphPad PRISM 5 (EUA). O valor de significância considerado foi $\leq 0,05$.

6 Resultados

O isolamento e caracterização fenotípica da CMMO e sua posterior injeção em pacientes acometidos por doença de Chagas e doença Isquêmica Crônica fazem parte do Estudo Multicêntrico Randomizado de Terapia Celular em Cardiopatias (EMRTCC), sendo esse um subprojeto do mesmo.

6.1 Pacientes e infusão de CMMO:

Com o objetivo de isolar e caracterizar CMMO para tratamento experimental por terapia celular, pacientes acometidos por miocardiopatia dilatada chagásica (n=20) e doença isquêmica crônica (n=14), participaram deste subestudo.

6.2 Isolamento de CMMO

Através do processamento da medula, pelo método de separação por gradiente de densidade com Ficoll-Paque Premium, obteve-se o anel de células resultante do que foi recolhido e analisado por citometria de fluxo.

Nos histogramas representativos da figura 19, constatamos a presença de diversos tipos celulares nas amostras estudadas, dos quais, se destacam células mononucleares em rosa - linfócitos (T, B e NK), monócitos, precursores eritróides, MSC e EPC, e de células polimorfonucleares em amarelo, com neutrófilos.

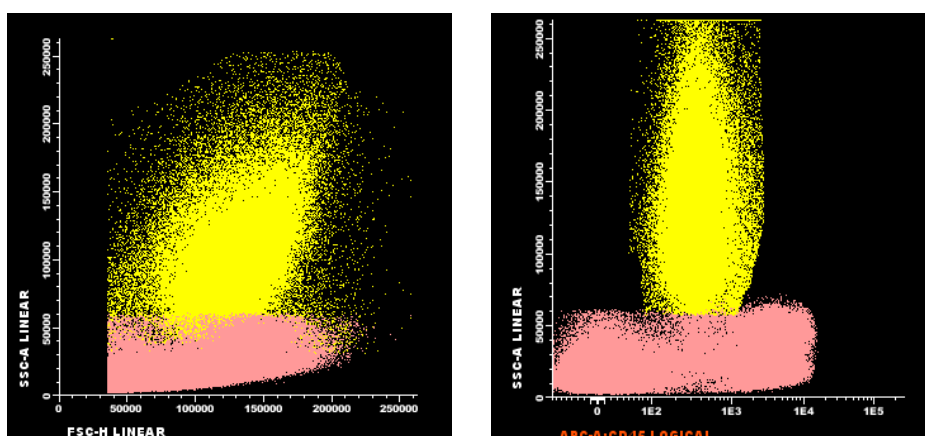


Figura 19: Fração mononuclear isoladas da medula óssea

A. Histograma FSC (forward scatter) X SSC (side scatter), histograma de distribuição, encontram-se destacadas em rosa as células mononucleares e em amarelo as células polimorfonucleares, demonstrando que as células mononucleares são pequenas e com baixa complexidade e que as polimorfonucleares são grandes e com alta complexidade, confirmando a distribuição normal dessas células. **B.** O histograma SSC (side scatter) X CD45 monoclonal caracteriza as células do pan leucocitário como um todo.

6.3 Caracterização por Citometria de Fluxo:

Através da identificação imunofenotípica - que confere um conjunto de características de expressão específica para cada tipo celular - identificamos os tipos celulares presentes na fração enriquecida em CMMO qualitativamente e quantitativamente.

6.3.1 Análise qualitativa

O fenótipo para cada linhagem analisada está resumido na tabela 4.

Tabela 4: Perfil imunofenotípico das populações celulares estudada.

LINHAGEM CELULAR	FENÓTIPO MOLECULAR DE SUPERFÍCIE
Neutrófilos	CD45+/CD33+/CD64+/CD14-/CD34-
Monócitos	CD45+/CD34-/CD64+/CD33+/CD14+
Precursores monocíticos	CD45+/CD34+/CD64+/CD33+/CD14 ^{fraco}
Linfócitos T Auxiliares	CD45+/CD34-/CD3+/CD8-/CD4+
Linfócitos T Citotóxicos	CD45+/CD34-/CD3+/CD8+/CD4-
Linfócitos B	CD45+/CD34-/CD56-/CD19+
Natural Killer	CD45+/CD34-/CD56+/CD19-
Precursores Eritróides	SSC/FSC/CD45-
Precursores Hematopoiéticos	CD45 ^{fraco} /CD34 ^{forte} /SSC↓
Precursores Mesenquimais	CD45-/CD34-/CD105+/CD90+/CD73+
Precursores Endoteliais	CD45-/CD34+/CD105+/CD90+/CD73+

Cada população obtida está representada, de forma esquemática, em histogramas nas figuras seguintes demonstrando o racional da análise realizada.

A figura 20 representa os precursores caracterizados nas CMMO. Na figura 20A, os histogramas representativos da identificação da população de precursores hematopoiéticos, destacada em laranja, demonstrando o imunofenótipo CD45^{fraco}/CD34^{forte}/SSC↓ e, em marrom, os precursores eritróides, obtidos a partir da morfologia em FSC/SSC e CD45-. Na figura 20B, temos uma análise mais detalhada da identificação da população de eritroblastos, destacada em rosa. A análise foi feita por seleção negativa, encontrando o perfil imunofenotípico precursores eritróides, CD45-, CD34-, HLA-DR-, CD31-, CD33-, CD3-,CD4-, CD8-, CD19-, CD56-, CD90-,CD73-. Na figura 20C, estão caracterizados, genericamente, os precursores mesenquimais em verde com fenótipo CD105+CD90+CD73+CD34-CD45- e em

vermelho, os precursores endoteliais de fenótipo CD105+CD90+CD73+CD34+CD45-. Na figura 20D, estão demonstrados em amarelo os precursores monocíticos que apresentam em sua superfície celular o fenótipo CD45+CD64+CD33+CD14+^{fraco}CD34+, observando-se uma perda gradual de CD34 e um aumento na expressão de CD14 a medida que vão atingindo sua maturação e, dessa forma, podemos observar o fenótipo diferente e caracterizado por CD45+CD64+CD33+CD14+CD34- nos monócitos representados em amarelo nos histogramas. A população em rosa, nesses gráficos, é composta por monócitos maduros caracterizada posteriormente.

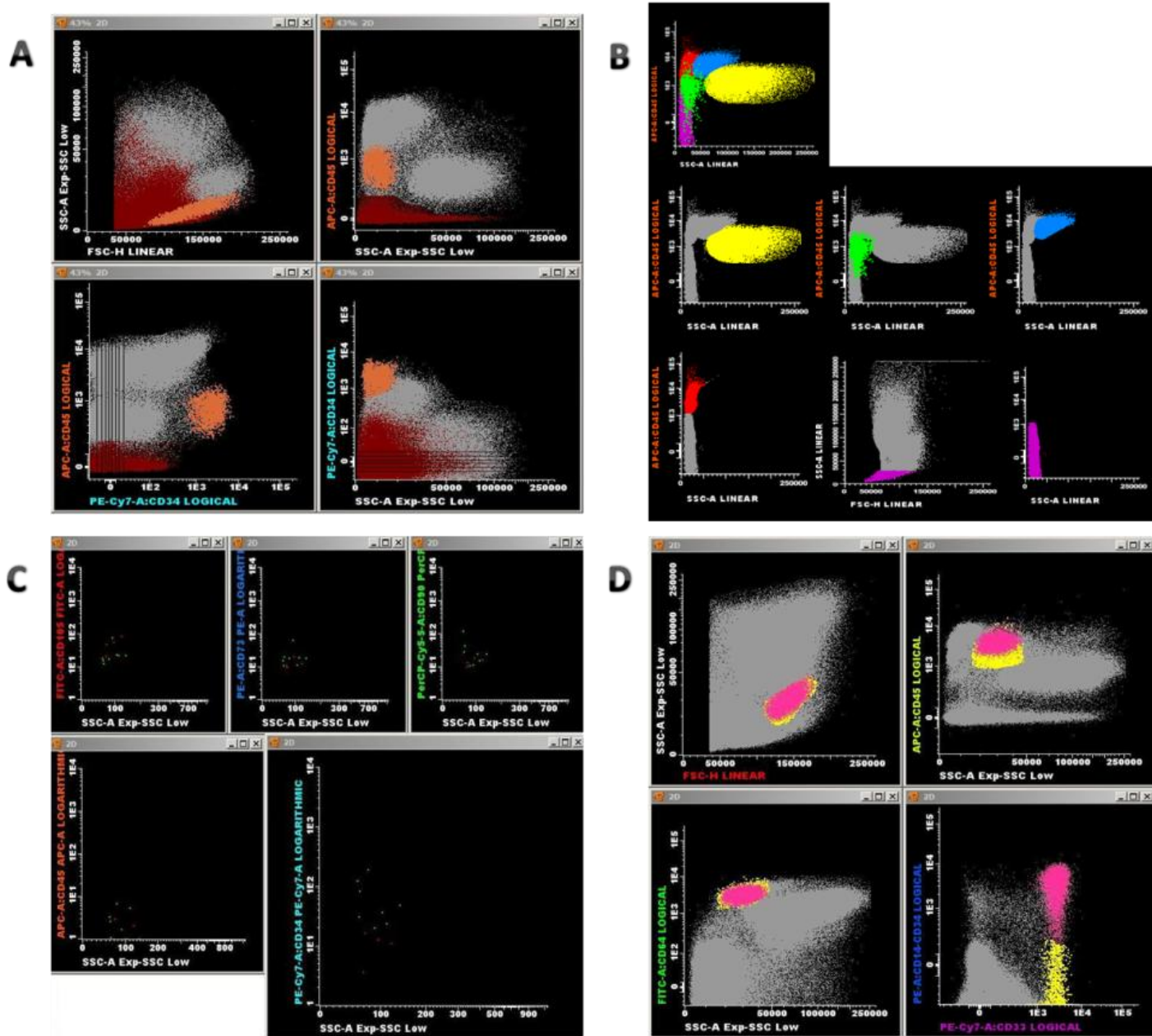


Figura 20: Precursoras da CMMMO

Observamos em na figura 22A os precursores hematopoiéticos em laranja e os precursores eritróide, obtidos por exclusão, em marrom. Na figura 22B, temos uma análise mais detalhada da obtenção dos precursores eritróides, que aparecem em rosa nos histogramas. Na figura 22C da figura, representamos as populações de precursores mesenquimais em vermelho e de precursores endotéliais em verde. E finalmente na figura 22D, observamos em amarelo os precursores monocíticos.

A identificação representativa da população de neutrófilos, destacados em laranja na figura 21, demonstra o perfil de células grandes e com alta complexidade e o imunofenótipo é típico com CD45+CD33+CD64+CD14-CD34-.

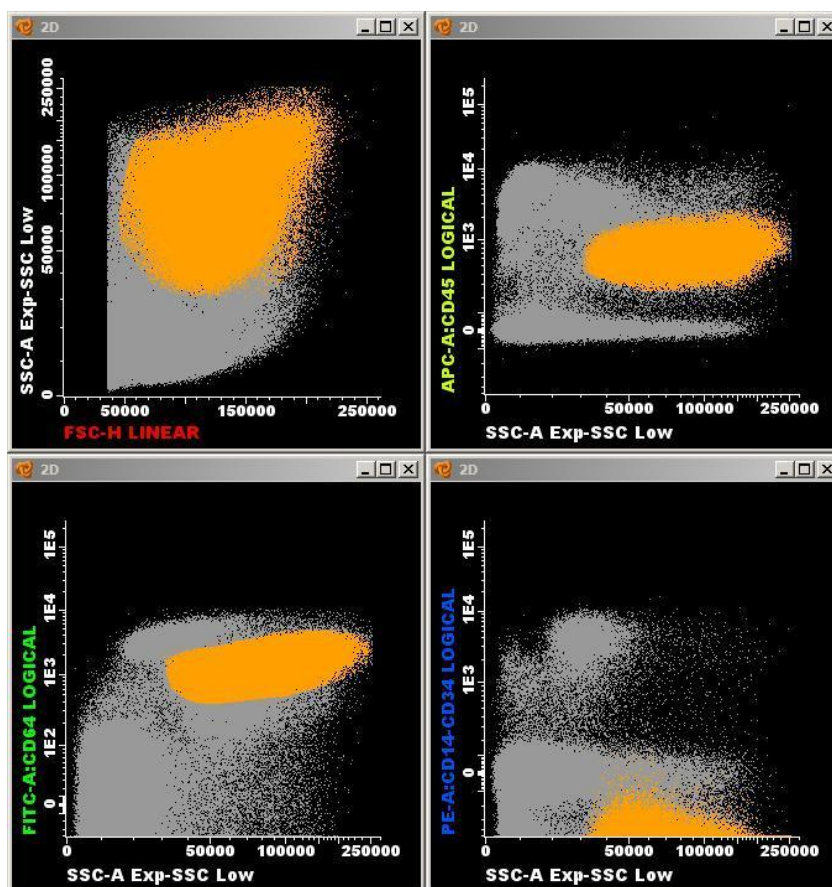


Figura 21: Neutrófilos da CMMO

Histogramas de citometria de fluxo representativos da identificação da população de neutrófilos, destacados em laranja. Perfil celular e imunofenotípico encontrado: células grandes e com alta complexidade; CD45+CD33+CD64+CD14-CD34-.

Os monócitos presentes na fração de CMMO estão representados na figura 22, onde verificamos duas populações distintas, sendo a em amarelo a de precursores monocíticos já descrita anteriormente e em rosa a população de monócitos maduros que apresentam um fenótipo do tipo CD45+CD64+CD33+CD14+CD34-.

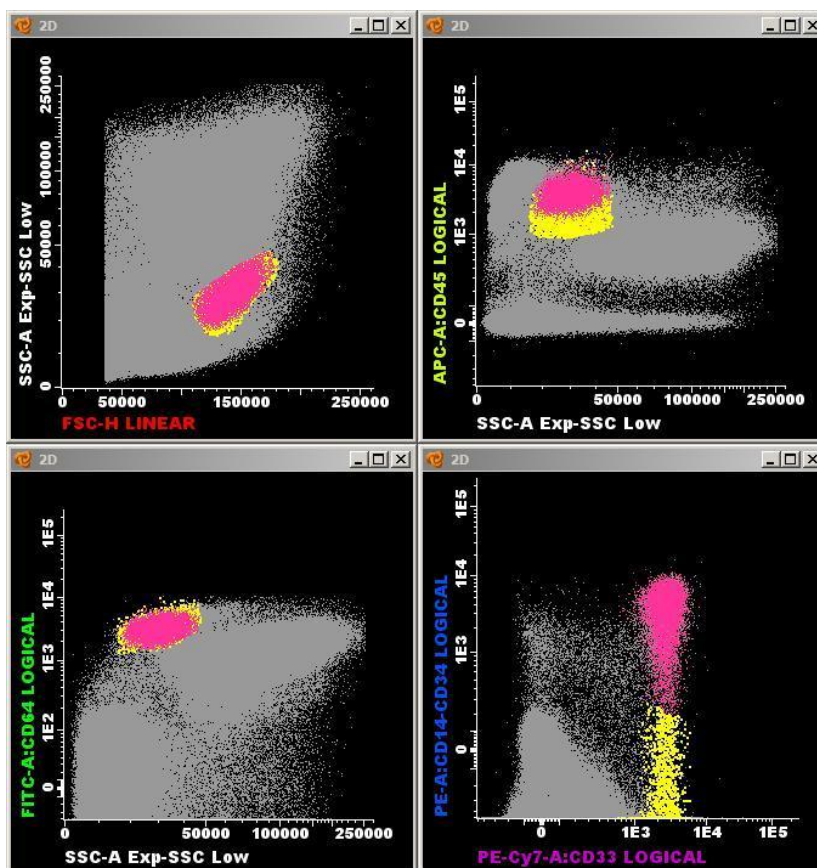


Figura 22: Monócito e precursores monocíticos da CMMO

Histogramas de citometria de fluxo representativos da identificação da população de monócitos maduros e precursores monocítico. O perfil celular, tanto para os monócitos maduros quanto para os precursores, é semelhante apresentando tamanho e complexidade celular intermediárias visualizadas no histograma de SSC X FSC; Já o imunofenótipo apresenta-se diferenciado. Os precursores monocíticos, demonstrados em rosa, apresentam em sua superfície celular o fenótipo CD45+CD64+CD33+CD14+CD34+, observando-se uma perda gradual de CD34 e aumento CD14 a medida que vão atingindo sua maturação, e dessa forma podemos observar o fenótipo diferente e caracterizado por CD45+CD64+CD33+CD14+CD34- nos monócitos representados em amarelo nos histogramas.

A população de linfócitos T, bem como suas subpopulações auxiliares e citotóxicas, aparece esquematizada na figura 23. Os linfócitos T são células mononucleares pequenas, representadas no histograma de distribuição SSC/FSC com todas as cores. Apresentam alta intensidade de expressão de CD45+ e CD3+ em seu fenótipo. As subpopulações, no histograma em destaque, estão divididas em: CD45+CD3+CD4+CD8-, em vermelho, para linfócitos T auxiliares; CD45+CD3+CD4-CD8+, em verde, para linfócitos T citotóxicos e duas outras

populações comuns na medula óssea, CD45+CD3+CD4+CD8+, em azul, e CD45+CD3+CD4-CD8- em laranja.

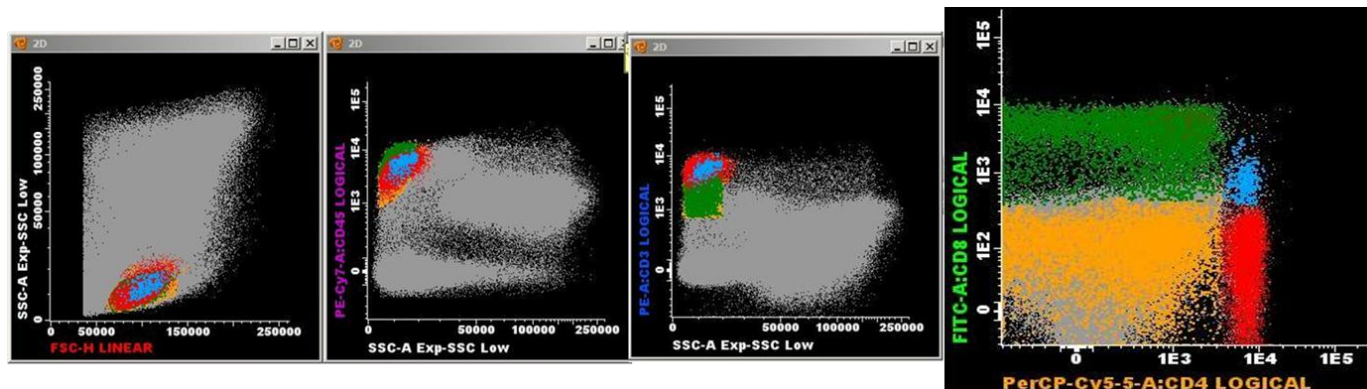


Figura 23: Linfócitos T e subpopulações da CMMO

Histogramas de citometria de fluxo representativos da identificação da população de linfócitos T e suas subpopulações. Perfis imunofenotípicos encontrados: células mononucleares, CD45+CD3+ que se dividem em subpopulações que, além desse fenótipo, apresentam CD3+CD8+CD4- (linfócito T citotóxico) em verde; duplo positivo para CD3+CD8+CD4+ em azul; duplo negativo para CD8-CD4- em laranja e CD8-CD4+ (linfócito T auxiliar) em vermelho.

Os histogramas da figura 24 representam a análise da população de Linfócitos B, destacada em amarelo e verde, sendo que, em amarelo, se identifica precursores de linfócitos B devido a menor intensidade de expressão de CD45+ que aumenta conforme a maturação dessa célula. Perfil imunofenotípico encontrado condizente com células mononucleares pequenas e com baixa complexidade celular, caracterizadas pelo fenótipo de superfície CD45+CD19+CD56-.

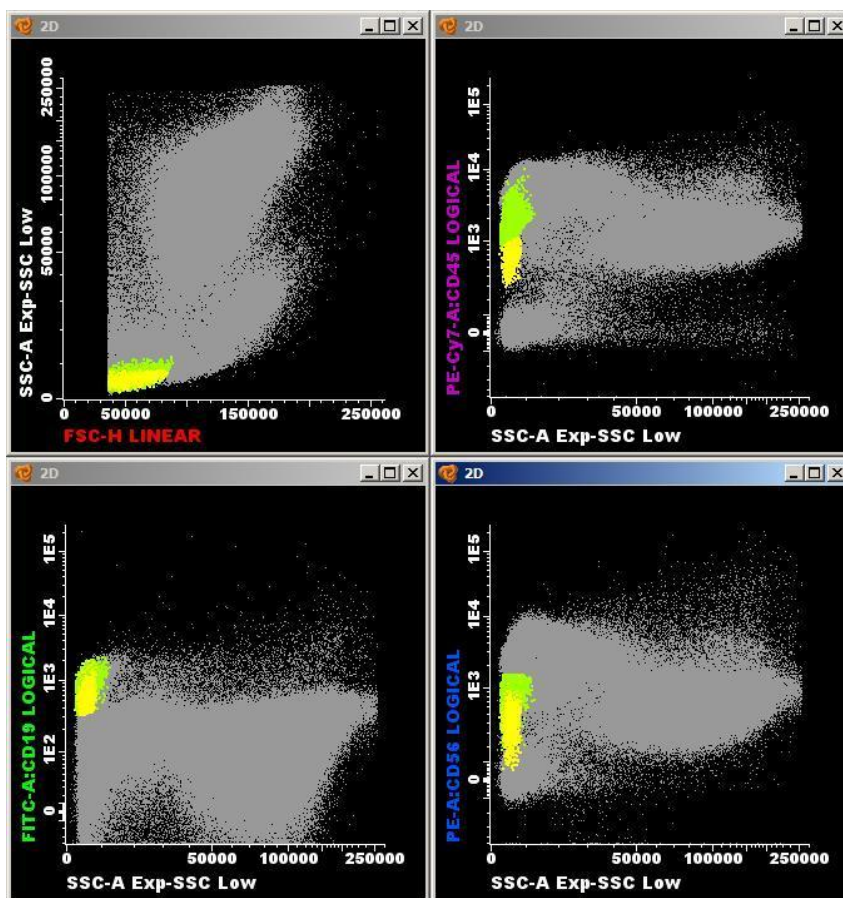


Figura 24: Linfócitos B da CMMO

Histogramas de citometria de fluxo representativos da identificação da população de Linfócitos B, destacada em amarelo e verde, sendo que em amarelo se identifica, precursores de linfócitos B devido a menor intensidade de expressão de CD45+ que aumenta conforme a maturação dessa célula. Perfil imunofenotípico encontrado condizente com células mononucleares pequenas e com baixa complexidade celular, caracterizadas pelo fenótipo de superfície CD45+CD19+CD56-.

As células *Natural Killers* são caracterizadas por apresentarem um imunofenótipo do tipo CD45+CD19-CD56+ e estão representadas em rosa na figura 25.

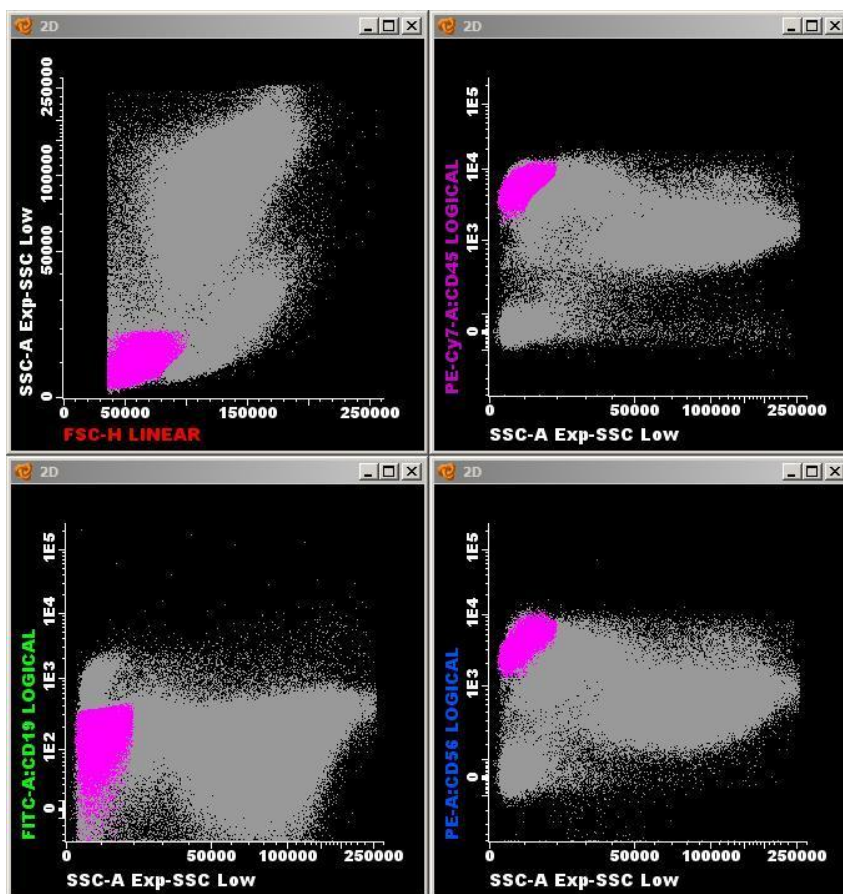


Figura 25: Células *Natural Killers* da CMMO

Histogramas de citometria de fluxo representativos da identificação da população de células NK, destacada em rosa. Perfil imunofenotípico encontrado: célula mononuclear pequena e de baixa complexidade representada no histograma SSC X FSC e com fenótipo característico, CD45+CD19-CD56+.

6.3.2 Análise Quantitativa

Os resultados obtidos para pacientes com cardiopatia chagásica (CHG) foram comparados com os dados de doadores saudáveis e com pacientes de cardiopatia isquêmica crônica, separadamente, sendo analisada sua significância estatística. Os dados dos pacientes com cardiopatia isquêmica crônica também foram comparados com doadores normais. Os resultados estão demonstrados nos gráficos a seguir, nos quais, demonstramos a mediana e os quartis, excluindo os valores outlier. Na legenda das figuras têm-se os valores de média \pm desvio padrão.

6.3.2.1 Cardiopatia Chagásica Crônica x Doadores Normais

Os percentuais de células mononucleares e de neutrófilos obtidos da fração de CMMO de pacientes portadores da doença de Chagas crônica e de doadores normais foram comparados e não foram observadas diferenças estatísticas significativas, como demonstrado na figura 26A e 26B, respectivamente.

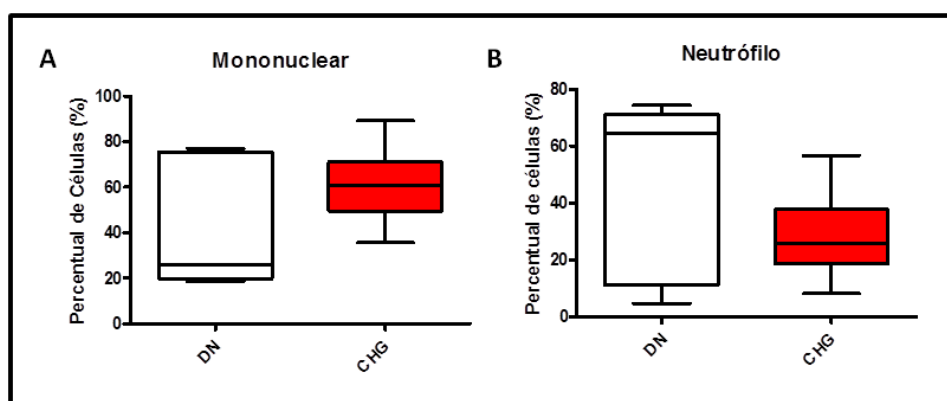


Figura 26: Mononucleares e neutrófilos da CMMO de CHG X DN

Gráfico com os percentuais de células mononucleares (43,22 \pm 29,50 DN e 60,52 \pm 15,18 CHG) (A) e neutrófilos (45,83 \pm 32,26 DN e 28,31 \pm 12,27 CHG) (B).

(Médias \pm desvio padrão). Doadores normais (DN). Pacientes portadores da doença de Chagas crônica (CHG).

Na análise dos percentuais de células precursoras da fração mononuclear de medula óssea, não encontramos nenhuma significância estatística. Na figura 27, estão demonstrados os gráficos relativos à comparação entre esses percentuais, de precursores hematopoiéticos (protocolo ISHAGE), eritróides, endoteliais e mesenquimais, além dos monocíticos.

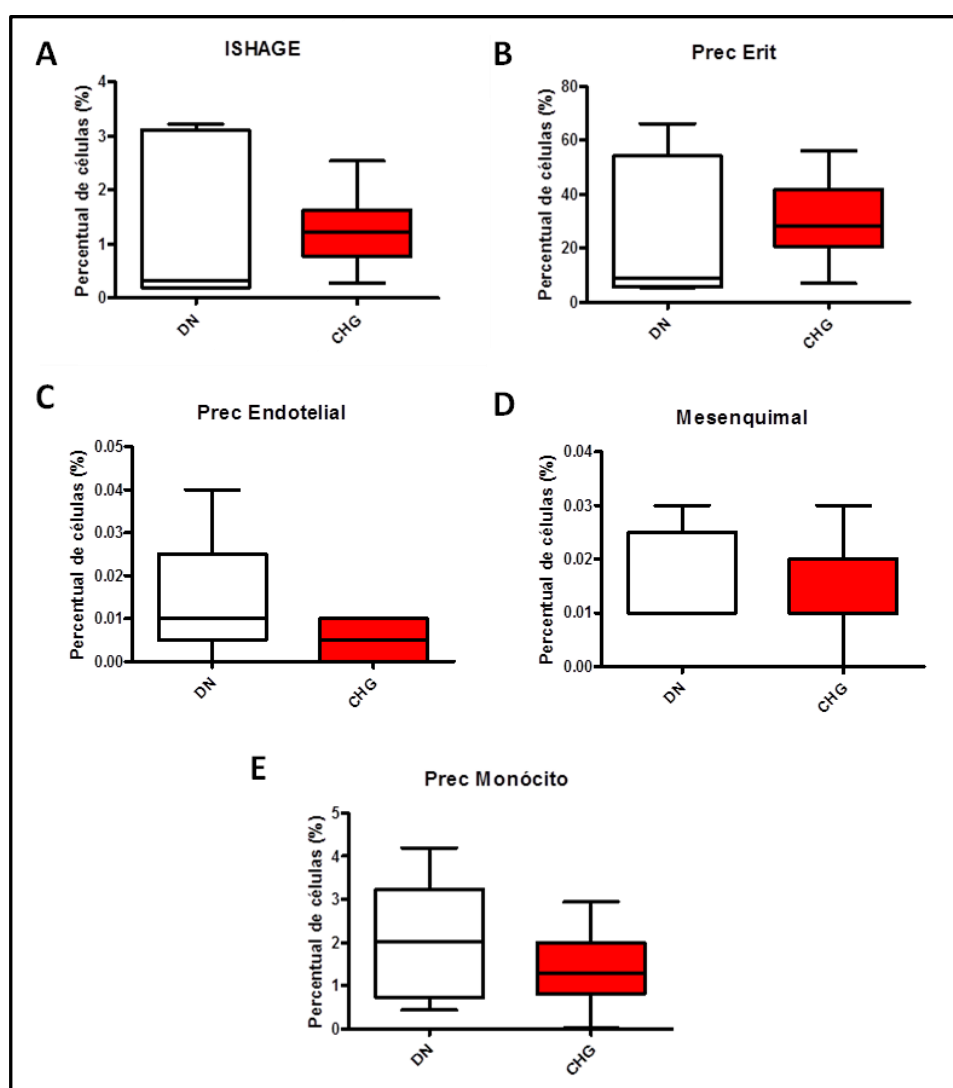


Figura 27: Linhagens de células precursoras da CMMO de CHG X DN

Gráfico com os percentuais de células precursoras hematopoiéticas obtidas a partir do protocolo ISHAGE ($1,38 \pm 1,57$ DN e $1,20 \pm 0,58$ CHG) (A), gráfico com percentuais de precursores eritróide ($25,68 \pm 27,36$ DN e $29,63 \pm 12,59$ CHG) (B), gráfico com percentuais de precursores endoteliais ($0,014 \pm 0,015$ DN e $0,005 \pm 0,005$ CHG) (C), gráfico com percentuais de precursores mesenquimais ($0,016 \pm 0,009$ DN e $0,011 \pm 0,008$ CHG) (D), gráfico com percentuais de precursores monocíticos ($1,99 \pm 1,44$ DN e $1,44 \pm 0,84$ CHG) (E). (Médias \pm desvio padrão). Doadores normais (DN). Pacientes portadores da doença de Chagas crônica (CHG).

Também não encontramos diferenças estatísticas quando comparamos os monócitos das mesmas amostras. (Figura 28).

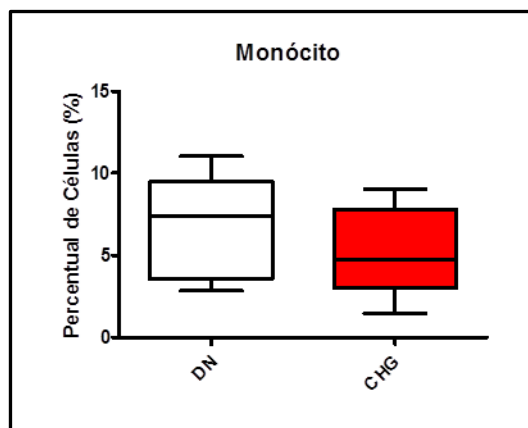


Figura 28: Monócitos da CMMO de CHG X DN

Gráfico com os percentuais de monócitos ($6,69 \pm 3,23$) de doadores normais (DN) e ($5,20 \pm 2,65$) de pacientes portadores da doença de Chagas crônica (CHG). (Médias \pm desvio padrão). Doadores normais (DN). Pacientes portadores da doença de Chagas crônica (CHG).

Na análise dos linfócitos T, por sua vez, encontramos significância estatística tanto para a população de linfócitos T totais, bem como, para sua subpopulação de linfócitos T auxiliares, demonstrando um maior percentual destas células em pacientes com cardiopatia chagásica. Em relação à subpopulação de linfócitos T citotóxicos, não encontramos diferença estatística significativa. Esses dados estão demonstrados na figura 29, onde podemos visualizar os valores de p.

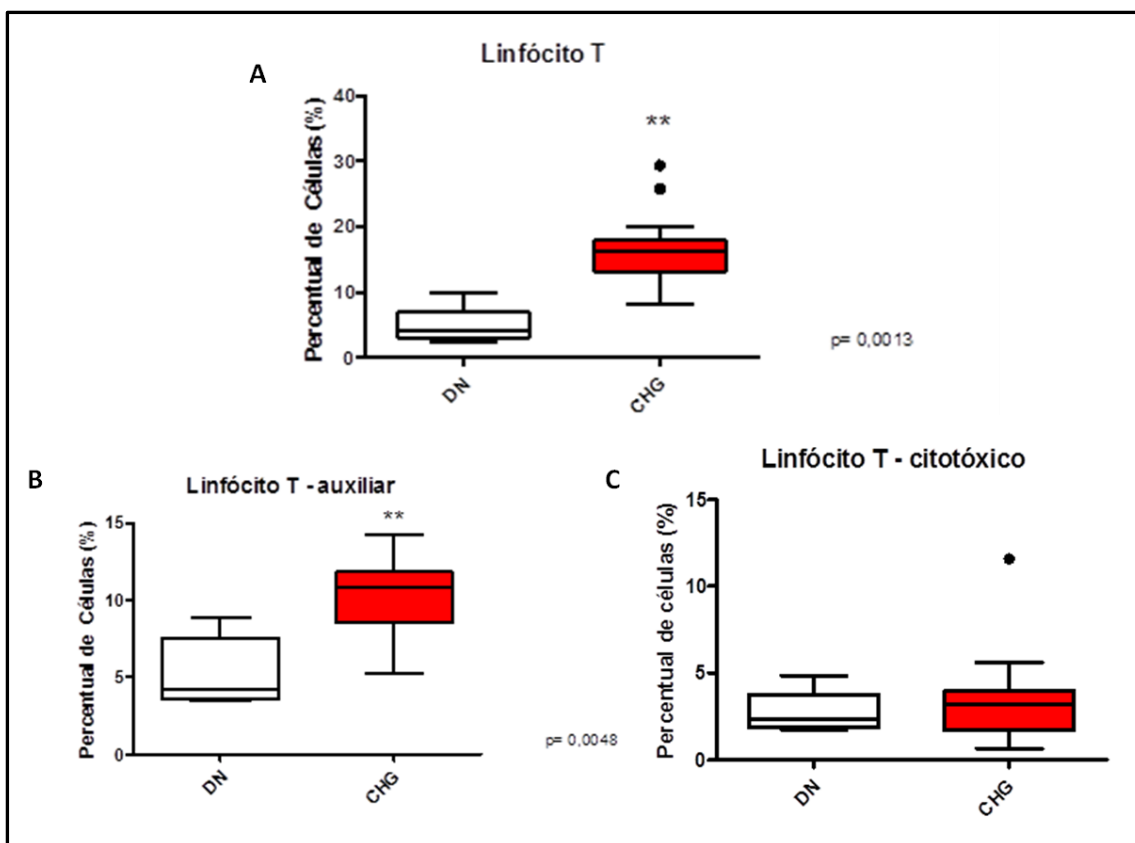


Figura 29: Linfócitos T e subpopulações da CMMO de CHG X DN

Gráfico com os percentuais de linfócitos T totais ($4,86 \pm 2,96$ DN e $16,31 \pm 5,06$ CHG) (A), gráfico de linfócitos T – auxiliar ($5,28 \pm 2,28$ DN e $10,12 \pm 2,50$ CHG) (B), gráfico de linfócitos T – citotóxico ($2,73 \pm 1,24$ DN e $3,27 \pm 2,38$ CHG) (C). (Médias \pm desvio padrão). Doadores normais (DN). Pacientes portadores da doença de Chagas crônica (CHG).

As populações de linfócitos B e de *Natural Killers* também demonstraram um maior percentual nas amostras de pacientes portadores da doença de Chagas crônica, conferindo a elas uma diferença estatística quando comparados com os doadores normais (Figura 30).

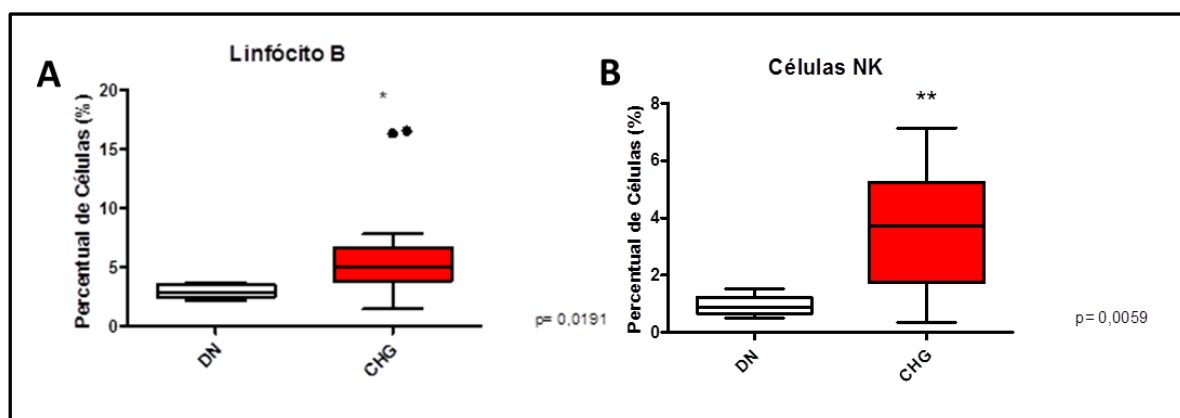


Figura 30: Linfócitos B e células NK da CMMO de CHG X DN

Gráfico com os percentuais de linfócitos B ($2,99 \pm 0,57$ DN e $5,92 \pm 3,95$ CHG) (A) e gráfico de células *natural killers* ($0,92 \pm 0,37$ DN e $3,67 \pm 2,02$ CHG) (B). (Médias \pm desvio padrão). Doadores normais (DN). Pacientes portadores da doença de Chagas crônica (CHG).

6.3.2.2 Cardiopatia Chagásica x Cardiopatia Isquêmica Crônica

Os percentuais de células mononucleares e de neutrófilos obtidos da fração de CMMO de pacientes portadores da doença de Chagas crônica e de pacientes com cardiopatia crônica foram comparados e não foram observadas diferenças estatísticas significativas, como demonstrado nas figuras 31A e 31B, respectivamente.

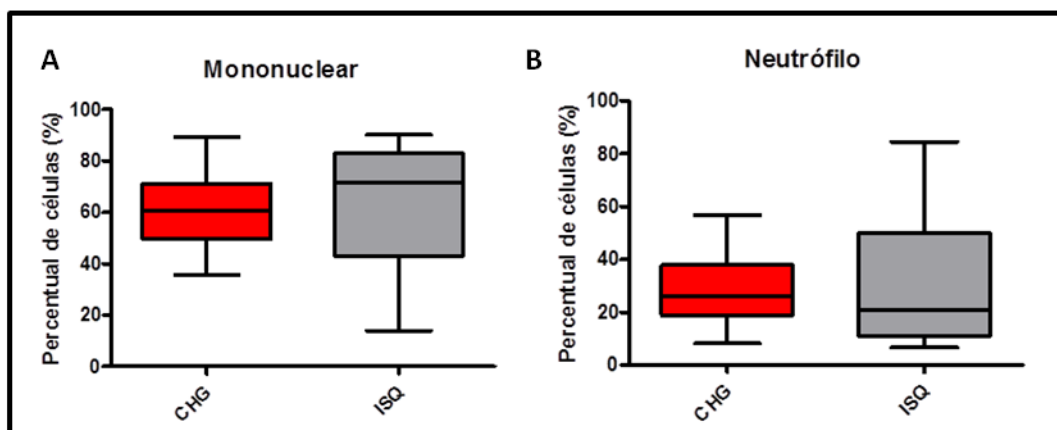


Figura 31: Mononucleares e neutrófilos da CMMO de CHG X ISQ

Gráfico com os percentuais de células mononucleares ($60,52 \pm 15,18$ CHG e $63,17 \pm 23,50$ ISQ) (A) e neutrófilos ($28,31 \pm 12,27$ CHG e $30,35 \pm 23,26$ ISQ) (B). (Médias \pm desvio padrão). Pacientes portadores da doença de Chagas crônica (CHG). Pacientes isquêmicos crônicos (ISQ).

Em contrapartida, quando analisamos comparativamente os gráficos de células precursoras, observamos significância estatística nas populações de precursores hematopoiéticos (Figura 32A) e eritróides (Figura 32B), demonstrando um maior percentual das mesmas nas amostras de pacientes isquêmicos em relação aos pacientes portadores da doença de Chagas crônica. Os precursores monocíticos das duas amostras, também, apresentaram diferença significativa, porém, com menor valor percentual nos pacientes com doença isquêmica crônica (Figura 32E). As precursoras endoteliais e mesenquimais ilustradas nas figuras 32C e 32D, respectivamente, não apresentaram diferença significativa.

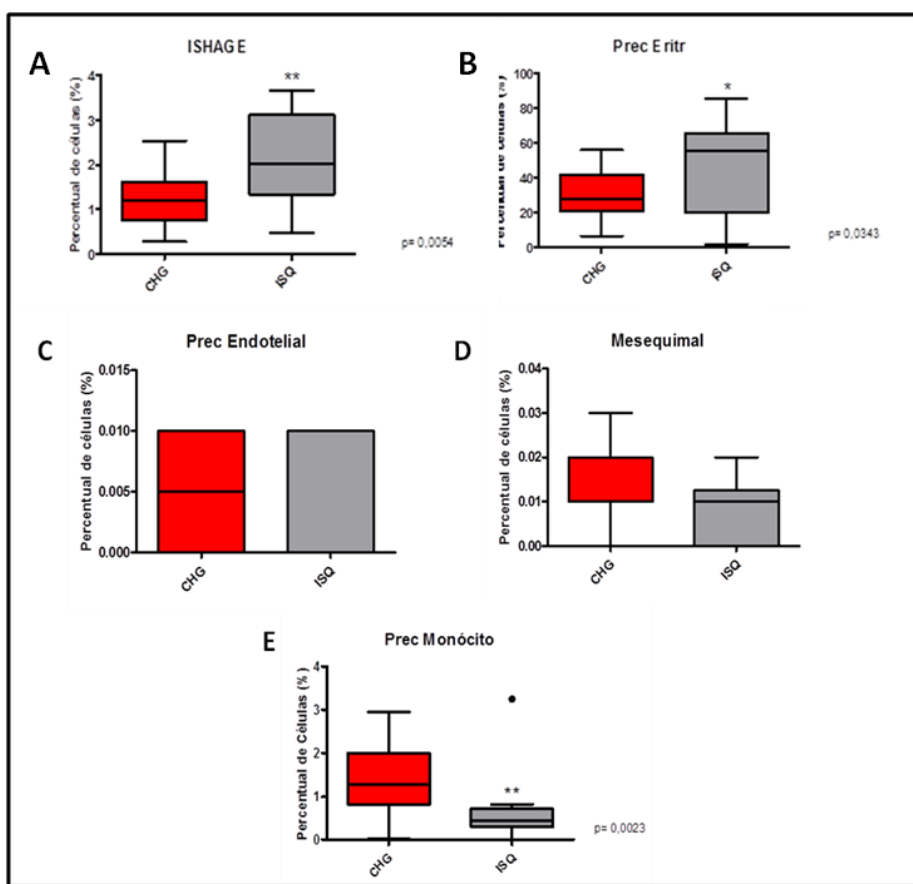


Figura 32: Linhagem de células precursoras da CMMO de CHG X ISQ

Gráfico com os percentuais de células precursoras hematopoiéticas obtidas a partir do protocolo ISHAGE ($1,20 \pm 0,58$ CHG e $2,16 \pm 1,05$ ISQ) (A), gráfico com percentuais de precursors eritróide ($29,63 \pm 12,59$ CHG e $47,38 \pm 25,81$ ISQ) (B), gráfico com percentuais de precursors endoteliais ($0,005 \pm 0,005$ CHG e $0,004 \pm 0,005$ ISQ) (C), gráfico com percentuais de precursors mesenquimais ($0,011 \pm 0,008$ CHG e $0,009 \pm 0,007$ ISQ) (D), gráfico com percentuais de precursors monocíticos ($1,44 \pm 0,84$ CHG e $0,64 \pm 0,79$ ISQ) (E). (Médias \pm desvio padrão). Pacientes portadores da doença de Chagas crônica (CHG). Pacientes isquêmicos crônicos (ISQ).

A população de monócitos diferenciados ilustrada na figura 33, também, apresentou menor percentual nas amostras de CMMO de pacientes isquêmicos, quando comparada aos chagásicos, em consonância com o mesmo achado em relação à linhagem precursora monocítica.

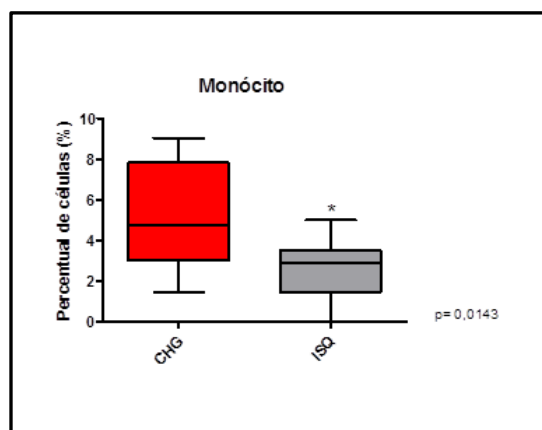


Figura 33: Monócitos da CMMO de CHG X ISQ

Gráfico com os percentuais de monócitos ($5,20 \pm 2,65$) de pacientes portadores da doença de Chagas crônica (CHG) e ($2,66 \pm 1,42$) de pacientes isquêmicos crônicos (ISQ). (Médias \pm desvio padrão). (Médias \pm desvio padrão). Pacientes portadores da doença de Chagas crônica (CHG). Pacientes isquêmicos crônicos (ISQ).

Na análise da população de linfócitos T e suas subpopulações, nas amostras de CMMO de pacientes portadores da doença de Chagas crônica versus pacientes isquêmicos crônicos, foi observada diferença estatística, com aumento de linfócitos T (Figura 34A) e sua subpopulação T auxiliar (Figura 34B), em pacientes com doença de Chagas, porém, não houve diferença na população de linfócitos citotóxicos (Figura 34C).

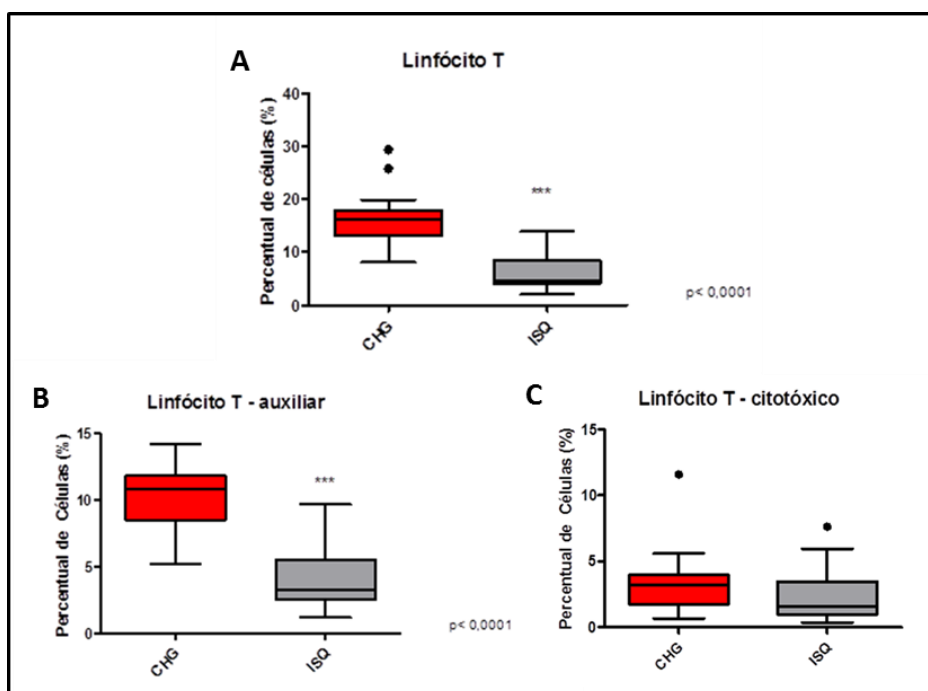


Figura 34: Linfócitos T e subpopulações da CMMO de CHG X ISQ

Gráfico com os percentuais de linfócitos T totais ($16,31 \pm 5,06$ CHG e $6,20 \pm 3,37$ ISQ) (A), gráfico de linfócitos T – auxiliar ($10,12 \pm 2,50$ DN e $4,07 \pm 2,38$ ISQ) (B), gráfico de linfócitos T – citotóxico ($3,27 \pm 2,38$ CHG e $2,41 \pm 2,17$ ISQ) (C). (Médias \pm desvio padrão). Pacientes portadores da doença de Chagas crônica (CHG). Pacientes isquêmicos crônicos (ISQ).

As populações de linfócitos B nos pacientes portadores da doença de Chagas crônica se encontram aumentadas quando comparamos com as amostras de pacientes com isquemia crônica do coração; porém quanto as células *Natural Killers*, não percebemos nenhuma diferença estatística na comparação (Figura 35).

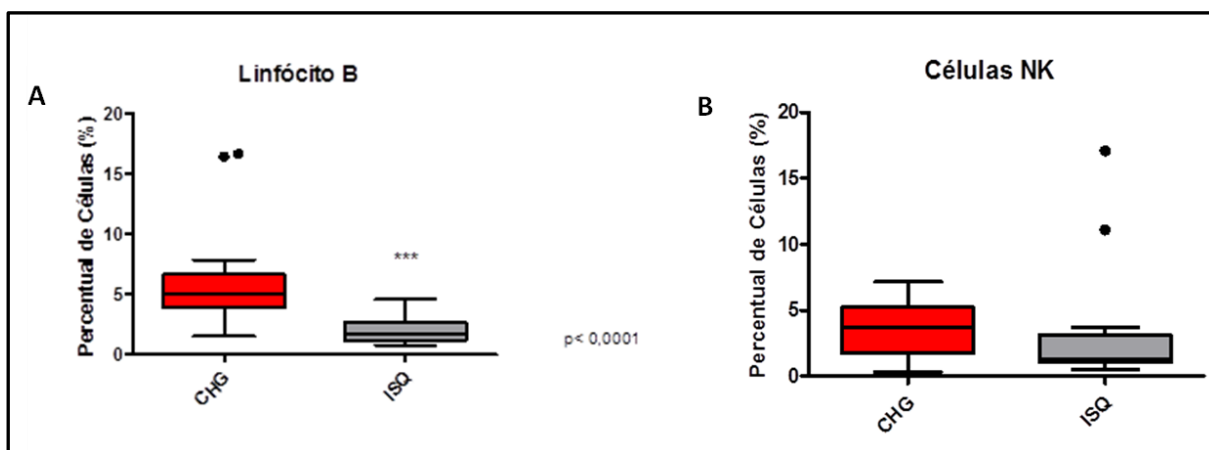


Figura 35: Linfócitos B e células NK da CMMO de CHG X ISQ

Gráfico com os percentuais de linfócitos B ($5,92 \pm 3,95$ CHG e $2,05 \pm 1,19$ ISQ) (A) e gráfico de células *natural killers* ($3,67 \pm 2,02$ CHG e $3,37 \pm 4,78$ ISQ) (B). Médias \pm desvio padrão). Pacientes portadores da doença de Chagas crônica (CHG). Pacientes isquêmicos crônicos (ISQ).

6.3.2.3 Cardiopatia Isquêmica Crônica x Doadores Normais

Os percentuais de células mononucleares e de neutrófilos obtidos da fração de CMMO de pacientes isquêmicos versus doadores normais foram comparados e não foram observadas diferenças estatísticas significativas, como demonstrado na figura 36A e 36B, respectivamente.

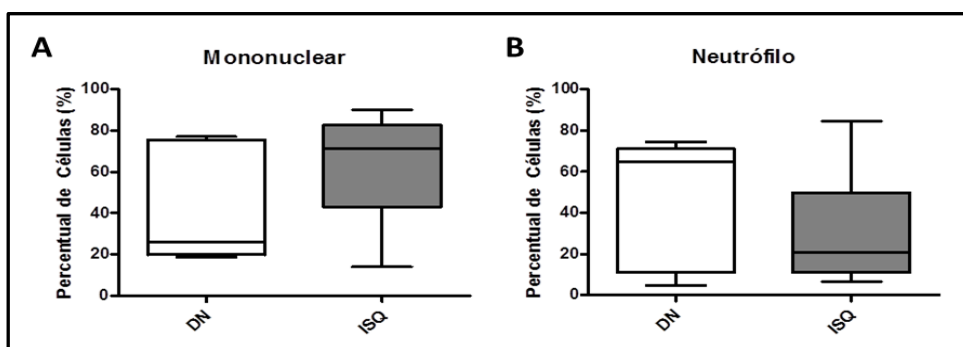


Figura 36: Mononucleares e neutrófilos da CMMO de DN X ISQ

Gráfico com os percentuais de células mononucleares ($43,22 \pm 29,50$ DN e $63,17 \pm 23,50$ ISQ) (A) e neutrófilos ($45,83 \pm 32,26$ DN e $30,35 \pm 23,26$ ISQ) (B). (Médias \pm desvio padrão). Doadores Normais (DN). Pacientes isquêmicos crônicos (ISQ).

Da mesma forma como não observamos diferenças estatísticas em relação a maioria das células precursoras, com exceção das precursoras monocíticas com valor de $p=0,0233$ (Figura 37).

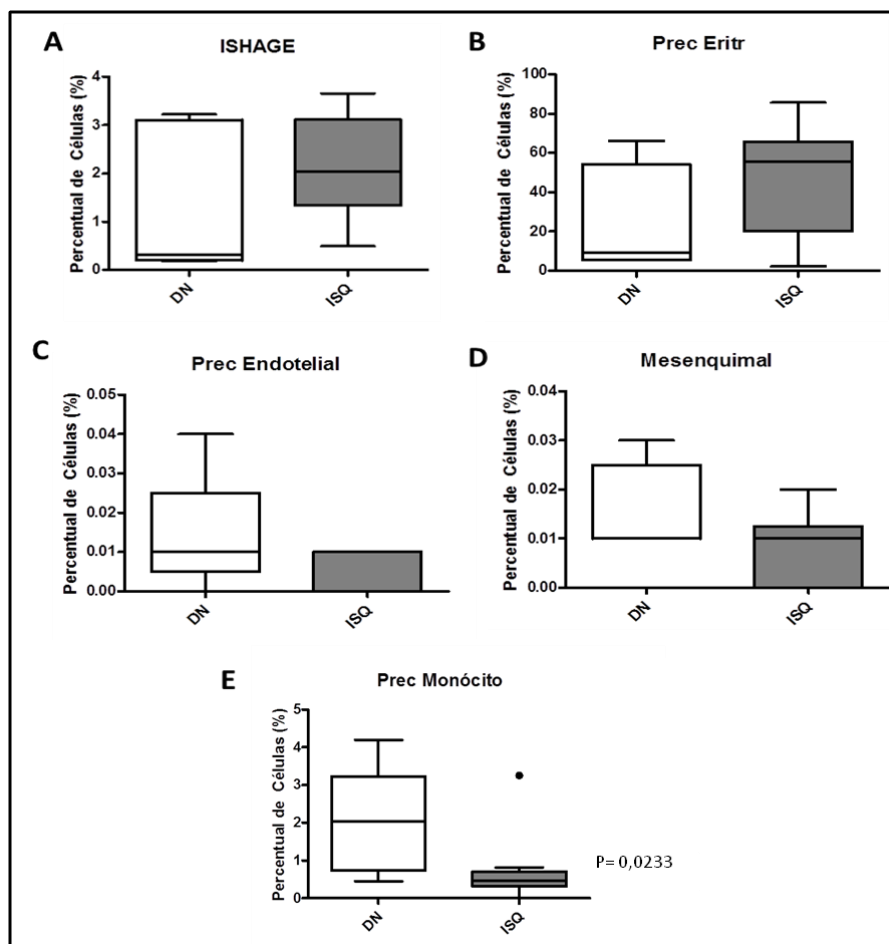


Figura 37: Linhagem de células precursoras da CMMO de DN X ISQ

Gráfico com os percentuais de células precursoras hematopoiéticas obtidas a partir do protocolo ISHAGE ($1,38\pm1,57$ DN e $2,16\pm1,05$ ISQ) (A), gráfico com percentuais de precursores eritróide ($25,68\pm27,36$ DN e $47,38\pm25,81$ ISQ) (B), gráfico com percentuais de precursores endoteliais ($0,014\pm0,015$ DN e $0,004\pm0,005$ ISQ) (C), gráfico com percentuais de precursores mesenquimais ($0,016\pm0,009$ DN e $0,009\pm0,007$ ISQ) (D), gráfico com percentuais de precursores monocíticos ($1,99\pm1,44$ DN e $0,64\pm0,79$ ISQ) (E). (Médias \pm desvio padrão). Doadores normais (DN). Pacientes isquêmicos crônicos (ISQ).

A população de monócitos diferenciados ilustrada na figura 38, também, apresentou menor percentual nas amostras de CMMO de pacientes isquêmicos, quando comparada aos doadores normais com $p=0,0182$.

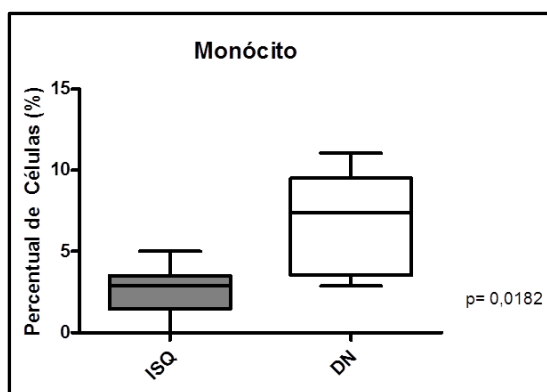


Figura 38: Monócitos da CMMO de DN X ISQ

Gráfico com os percentuais de monócitos ($6,69 \pm 3,23$) de doadores normais (DN) e ($2,66 \pm 1,42$) de pacientes isquêmicos crônicos (ISQ). (Médias \pm desvio padrão). Doadores normais (DN). Pacientes isquêmicos crônicos (ISQ).

Na análise da população de linfócitos T e suas subpopulações, foi observada apenas diferença estatística, nos linfócitos citotóxicos TCD8+ (Figura 39C) com um valor de $p=0,0074$.

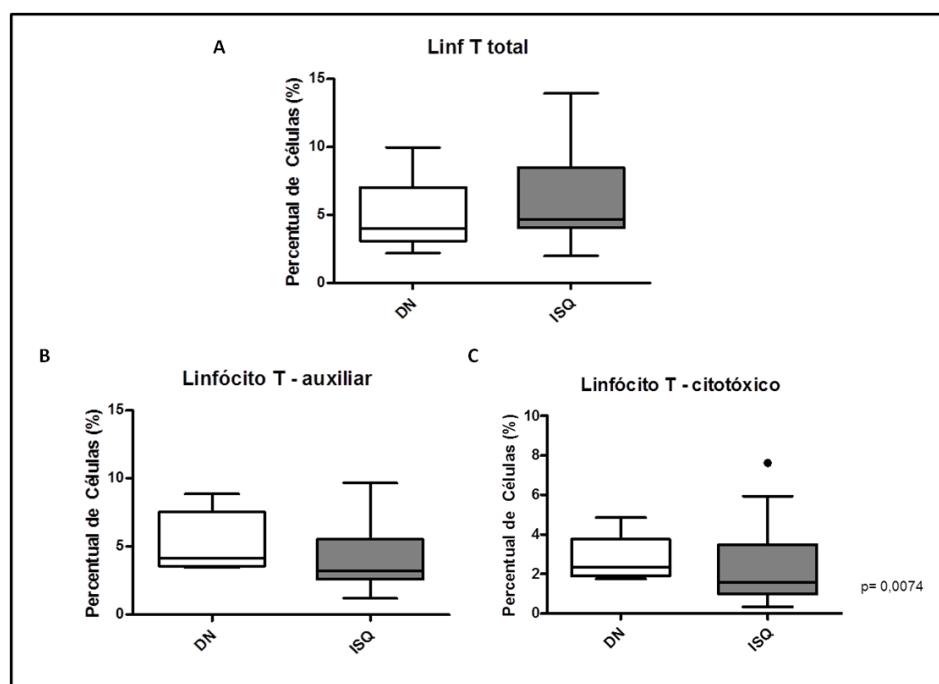


Figura 39: Linfócitos T e subpopulações da CMMO de DN X ISQ

Gráfico com os percentuais de linfócitos T totais ($4,86 \pm 2,96$ DN e $6,20 \pm 3,37$ ISQ) (A), gráfico de linfócitos T – auxiliar ($5,28 \pm 2,28$ DN e $4,07 \pm 2,38$ ISQ) (B), gráfico de linfócitos T – citotóxico ($2,73 \pm 1,24$ DN e $2,41 \pm 2,17$ ISQ) (C). (Médias \pm desvio padrão). Doadores normais (DN). Pacientes isquêmicos crônicos (ISQ).

Nas populações de linfócitos B e natural killers não encontramos significância estatística quando comparamos os valores percentuais entre pacientes isquêmicos crônicos e doadores normais. (Figura 40).

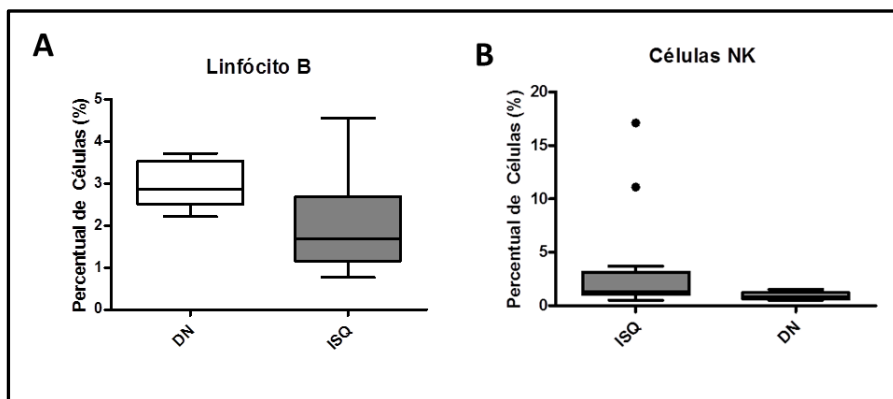


Figura 40: Linfócitos B e células NK da CMMO de DN X ISQ

Gráfico com os percentuais de linfócitos B ($2,99\pm0,57$ DN e $2,05\pm1,19$ ISQ) (A) e gráfico de células *natural killers* ($0,92\pm0,37$ DN e $3,37\pm4,78$ ISQ) (B). Médias \pm desvio padrão). Doadores normais (DN). Pacientes isquêmicos crônicos (ISQ).

7 Discussão

Neste trabalho, fomos capazes de isolar e caracterizar fenotipicamente a fração de células mononucleares de medula óssea (CMMO) isolada de pacientes com cardiopatia chagásica crônica, doença isquêmica crônica e doadores normais de medula óssea.

Este é o primeiro trabalho da literatura a utilizar a análise multiparamétrica para caracterizar a medula óssea de pacientes portadores da doença de Chagas crônica.

A técnica de separação, por gradiente de concentração de Ficoll, permite a obtenção de fração celular concentrada de células mononucleares em detrimento de células granulares. No nosso trabalho, encontramos faixa de variação de 43 a 63% de células mononucleares na fração mononuclear purificada. Assim, nesse processo, separamos, com média eficiência, neutrófilos, basófilos e eosinófilos da fração de células mononucleares, se comparado aos valores de referência do fabricante de Ficoll. Uma possível explicação para esta diferença seria a força g utilizada de 550, adotada pelo protocolo do EMRTCC, ser maior do que a indicada pelo fabricante (400g) normalmente utilizada para preparações com sangue periférico. Essa escolha foi atribuída na tentativa de compensar a diferença de densidade que existe entre o sangue periférico e a medula óssea. Adicionalmente, outro fator que pode ter interferido na eficiência do processamento de isolamento celular, foi a diluição da medula óssea com solução de NaCl 0,9%, antes da centrifugação, conforme o indicado para sangue periférico, o qual apresenta densidade bem menor que a medula óssea.

O valor percentual obtido de células mononucleares e de neutrófilos nas frações de CMMO isoladas pelos vários grupos que participaram do EMRTCC não foi distinto do obtido em nosso centro, indicando que a qualidade no processamento da medula óssea foi similar, e comprovando a padronização do método utilizado. Mesmo usando métodos automatizados (Sepax) verifica-se um percentual semelhante de contaminação da fração mononuclear com células polimorfonucleares, principalmente neutrófilos (dados não publicados).

A análise das linhagens de células precursoras dos pacientes com cardiopatia chagásica, (CHG) não demonstrou nenhuma diferença estatística quando comparada a análise, dessas mesmas linhagens, de doadores normais (DN), dentre elas a precursoras mesenquimais (MSC) e endoteliais (EPC).

A medicina regenerativa baseada no uso de células-tronco adultas representa um novo caminho para o tratamento de inúmeras doenças. De fato, estudos vêm demonstrando que as MSC e EPC podem exercer papel fundamental nos processos de regeneração tecidual. Em nosso estudo, essas células apareceram em um número, habitualmente encontrado, na fração mononuclear de medula óssea, ou seja, entre 0,01 a 0,02%, nos três tipos de amostras analisadas.

Sabemos que as MSC exercem funções imunomodulatórias que reduzem processos inflamatórios, esses processos tem efeito benéfico na fase aguda das infecções, entretanto a perpetuação dos mesmos pode levar a ocorrência de lesões no tecido cardíaco. A imunomodulação das MSC é fundamental para redução desses processos inflamatórios, tendo assim efeito protetor e podendo promover a recuperação funcional do músculo cardíaco (Krampera *et al.*, 2006; Uccelli *et al.*, 2006). Por sua vez, as células precursoras endoteliais têm importantes efeitos

angiogênicos extensamente descritos na literatura (Urbich *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2012; Reed *et al.*, 2013). A angiogênese no tecido cardíaco faz parte dos processos de remodelamento. As limitações nas estratégias terapêuticas para promover a revascularização levam à busca de novas metodologias como a terapia celular promovendo neovascularização.

Na análise das demais populações isoladas da fração mononuclear da medula óssea, observamos que não houve diferença estatística na comparação CHG versus DN para as linhagens monocíticas (monócitos maduros e seus precursores), o que era esperado. Sathler-Avelar e colaboradores relatam em seu trabalho que nos estágios iniciais da forma clínica indeterminada há um aumento expressivo, dentre outras populações, de monócitos ativados expressando altos níveis de HLA-DR que exercem atividade pró-inflamatória. Entretanto, no estágio mais tardio da forma indeterminada crônica, bem como, na forma cardíaca, os níveis dessa população voltariam ao nível basal (Sathler-Avelar *et al.*, 2006), dessa forma corroborando com o nosso achado.

Outro achado encontrado foi na comparação dos CHG com DN, quanto as populações de linfócitos T total e da subpopulação de linfócitos auxiliares TCD4+, que aparecem em maior percentual nos chagásicos, demonstrando valores de $p < 0,0013$ e $< 0,0048$, respectivamente, foi de suma importância, oferecendo segurança na avaliação dos parâmetros imunológicos ligados a essas linhagens celulares e a doença de Chagas. Em contrapartida a subpopulação de linfócitos citotóxicos T CD8+ não demonstraram a mesma significância.

Na fisiopatologia da cardiopatia chagásica crônica é relatada a presença de miocardite com cardiomiocitólise e fibrose reparativa. Observa-se também a

presença de imunoglobulinas e depósitos de complemento. A infiltração inflamatória no coração chagásico crônico inclui a migração de macrófagos e células T CD8+, que expressam granzima, e linfócitos T CD4+ (Cunha-Neto *et al*, 2006). Achados histopatológicos em pacientes portadores da doença de Chagas crônica demonstram um aumento de linfócitos auxiliares T CD4+, no tecido cardíaco, durante a fase aguda, porém, isso não ocorre na fase crônica. Recentemente, estudos têm relatado que a progressão para a fase crônica é acompanhada de um aumento na resposta celular. Na fase crônica, observa-se um aumento na frequência de células TCD4+ ativadas na circulação periférica, com elevada expressão de HLA-DR e baixa expressão de CD28. A frequência elevada de células T ativadas CD4+CD28- no sangue periférico de pacientes portadores da doença de Chagas crônica está associada com a expressão de TNF- α e IL-10 em pacientes das formas cardíaca e indeterminada, respectivamente, sugerindo papéis funcionais distintos para essas células (Dutra *et al*, 1996; Menezes *et al*, 2004). Células T CD8+ ativadas, que expressam granzima A e TNF- α , são predominantes no infiltrado inflamatório associado às lesões cardíacas na doença de Chagas (Reis *et al*, 1993). Acredita-se que produção local de citocinas como IL-15 e IL-7 contribua para a sobrevivência das células citotóxicas T CD8+ no tecido cardíaco (Fonseca *et al*, 2005). Os achados histopatológicos de aumento de subpopulações de linfócitos citotóxicos T CD8+ nos tecidos cardíacos de pacientes portadores da doença de Chagas crônica na fase crônica evidenciam que houve maior mobilização de precursores linfocíticos do tipo CD8+, o que propiciaria, possivelmente, um valor basal dessas células na medula óssea, como o encontrado por nós, visto que não houve diferença estatística na comparação da subpopulação de linfócitos citotóxicos TCD8+ na comparação entre DN e CHG.

Na caracterização fenotípica da CMMO, no nosso estudo, analisamos também, as células *natural killers* (NK). Essas células e os macrófagos possuem papel fundamental na resposta imune inata por serem fonte de IFN- γ e de IL-12 na fase aguda de infecção, respectivamente. Os macrófagos produzem IL-12 em resposta a muitos microrganismos, como o T.cruzi, por exemplo, que estimula a produção de IFN- γ pelas células NK. Na resposta imune adaptativa, a IL-12 e o IFN- γ estimulam a diferenciação de linfócitos TCD4+ de perfil Th1 produtores de IFN- γ , e as funções citotóxicas das células NK e dos linfócitos T CD8+ citotóxicos (Abbas *et al*, 2008).

Os linfócitos citotóxicos T CD8+ são considerados importantes no mecanismo protetor durante a resposta imune adaptativa nas infecções crônicas, porém em pacientes portadores da doença de Chagas crônica, estudos recentes sugerem a importância do aumento das células NK (Sathler-Avelar *et al*, 2009). Portanto, os achados do nosso estudo do aumento do percentual de células NK nos pacientes portadores da doença de Chagas crônica, em relação aos doadores normais, poderia se dar através desses mecanismos regulatórios de resposta imunológica estimulada pelos antígenos dos parasitos (Sathler-Avelar *et al*, 2008; Riganti *et al*, 2012). Estes mecanismos ocorrem, em geral, na fase aguda, porém a presença de antígenos na fase crônica pode desencadear esses processos, justificando assim o aumento de células NK na fração de células mononucleares de pacientes com cardiopatia crônica em relação aos doadores normais que não apresentam tal estímulo antigênico, bem como, em relação aos pacientes isquêmicos.

A população de linfócitos B, como as NK, também apresentaram um aumento significativo quando comparamos a CMMO de pacientes portadores da doença de

Chagas crônica versus normal. Este fato é atribuído à cronicidade da reação imunológica, que permite o estímulo para uma perpetuação de seleção clonal com a presença do estímulo antigênico causada pelo *T. cruzi*, este fenômeno demanda, a nível medular, uma diferenciação ascendente de linfócitos B para seu estágio plasmático secretor de imunoglobulina e a constante atividade de reconhecimento de antígenos.

A comparação das amostras de CMMO, a fim de caracterizar ainda melhor essa fração da medula óssea de pacientes portadores da doença de Chagas crônica, com pacientes isquêmicos crônicos surtiram dados interessantes.

Por exemplo, quanto às linhagens de células precursoras da CMMO de pacientes isquêmicos crônicos, observamos diferenças significativas quando comparada a pacientes portadores da doença de Chagas crônica, tanto entre os precursores, hematopoiéticos e eritróides, quanto para os precursores monocíticos.

Westenbrink e colaboradores demonstraram, em seu estudo com pacientes com doença isquêmica crônica do coração, a existência de disfunção da medula óssea nesses pacientes, afetando múltiplas linhagens hematopoiéticas. Além disso, foram encontrados elevados níveis de eritropoetina (EPO) nos pacientes acometidos por essa doença (Westenbrink *et al*, 2010). A eritropoetina é uma glicoproteína produzida pelo rim, no córtex renal, e sua produção é estimulada por situações de hipóxia, no caso, a diminuição do débito cardíaco. A EPO atua como fator hormonal de estimulação mitótica e de diferenciação da eritropoiese na medula óssea, aumentando a produção de precursores hematopoiéticos comissionados para linhagem eritróide e conseqüentemente de precursores totipotente hematopoiéticos. Tal fato explicaria o aumento, tanto de precursores eritróides, quanto

hematopoiéticos nos paciente isquêmicos desse estudo, demonstrados nos gráficos da figura 32. Os valores médios e desvios padrões dos precursores eritróide nos pacientes isquêmicos foram de $43,09 \pm 24,56$ e dos pacientes portadores da doença de Chagas crônica de $29,05 \pm 12,66$. Quanto aos precursores hematopoiéticos, os valores foram de $2,16 \pm 1,05$ para isquêmicos e $1,20 \pm 0,58$ para os pacientes com doença de Chagas.

Outra linhagem que aparece diminuída é a monocítica nos pacientes isquêmicos em comparação aos chagásicos. Os monócitos são mobilizados nos pacientes portadores da doença de Chagas crônica em resposta aos parasitas, porque essa linhagem celular participa da resposta imune inata, e também ao penetrar nos tecidos com injúria para participação nos processos inflamatórios e de remodelamento, fenômeno que também ocorre em pacientes isquêmicos (Nahrendorf *et al.*, 2007; Frantz *et al.*, 2013). O menor percentual de monócitos na medula dos pacientes isquêmicos quando comparados aos chagásicos pode ser devido à maior mobilização desses precursores para a periferia, por estarem envolvidos em processos de remodelamento na fase crônica da doença isquêmica (Nahrendorf *et al.*, 2007).

Proseguindo nossas análises, a linhagem de células T dos pacientes isquêmicos aparecem diminuída na comparação com os pacientes portadores da doença de Chagas crônica. Nossos dados corroboram com a literatura demonstrando significativo aumento da população T total e subpopulação auxiliar TCD4+ no sitio medular de pacientes com a doença de Chagas, em relação a doadores normais, mas, principalmente, na comparação com a amostragem isquêmica ($p < 0,0001$ e $p < 0,0001$). A diferença entre valores relacionados à doença

isquêmica e chagásica comprova uma reação imunológica dos pacientes parasitados pelo *T.cruzi* de forma distinta e exacerbada, diferente da reação na doença isquêmica crônica do coração, na qual, o processo não tem esse agente etiológico. Além disso, a linfopenia já foi caracterizada em pacientes isquêmicos na fase crônica. (Núñez *et al.*, 2011).

Na população de linfócitos B foi observada uma importante diferença quando comparamos as amostras dos pacientes portadores da doença de Chagas crônica com as dos isquêmicos ($p < 0,0001$), com valores diminuídos para essa segunda doença. Apesar de à cronicidade da reação imunológica também estar presente nesse caso, o processo isquêmico sofre outro tipo de estímulo hematopoiético gerado pela EPO que mobiliza o ambiente medular para produção eritróide diminuindo a produção das demais populações medulares.

Com a intenção de caracterizar melhor a fração mononuclear dos pacientes desse estudo, comparamos, ainda, as amostras de pacientes isquêmicos versus doadores normais. Nessa análise encontramos diferença estatística significativa em relação a linhagem monocítica, monócitos diferenciados e seus precursores, confirmando as informações que relacionam a doença isquêmica e essa linhagem celular. Além disso, as células TCD8+ apresentaram um percentual mais baixo nos pacientes com cardiopatia isquêmica crônica ($p = 0,0074$), provavelmente, pela linfopenia sugerida por Núñez e colaboradores, atingindo o sítio medular (Núñez *et al.*, 2011).

O esforço contínuo para identificar e caracterizar as células, principalmente as células-tronco, da medula óssea e outros sítios pode fornecer evidências dos tipos celulares que são principalmente envolvidos na fisiopatologia cardíaca chagásica e

isquêmica. A terapia ideal a ser utilizada em pacientes portadores da doença de Chagas crônica, visando à redução da morbimortalidade, continua sendo um desafio. Dessa forma, estudos de caracterização celular podem fornecer informações importantes sobre linhagens celulares com maior potencial terapêutico. A imunofenotipagem pode contribuir nessa avaliação estabelecendo protocolos com alta precisão e sensibilidade que são metas importantes na aplicação de novas tecnologias de terapia celular.

8 Conclusão

Nossas análises de perfil fenotípico das células da fração mononuclear de medula óssea de pacientes com doença de Chagas e doença isquêmica crônica que foram submetidos à terapia celular demonstraram que essas células apresentam um perfil hematopoiético com produção de todas as linhagens constitutivas da medula óssea, confirmando capacidade ontogênica adequada.

A análise por citometria multiparamétrica revelou um aumento significativo de células imunes, tanto de resposta inata quanto adaptativa, na medula óssea dos pacientes com cardiopatia chagásica crônica, tanto em relação a doadores normais quanto em relação aos pacientes com isquemia crônica.

9 Referência Bibliográfica

Alison M.R.; Poulsom, R.; Forbes, S.; Wright, N.A. An introduction to stem cells. 2002
J Pathol 197, 419-23.

Alvarez-Dolado M.; Pardal, R.; Garcia-Verdugo, J.M.; Fike, J.R.; Lee, H.O.; Pfeffer, K.; Lois, C.; Morrison, S.J.; Alvarez-Buylla, A. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. 2003 Nature 425, 968-73.

Andrews P.W. From teratocarcinomas to embryonic stem cells. 2002. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 357, 405-17.

Argolo AM, Félix M, Pacheco R, Costa J. Doença de Chagas e seus Principais Vetores no Brasil – Fundação Oswaldo Cruz – Programa Integrado de Doença de Chagas (PIDC)/Intituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. Ed Imperial Novo Milênio. 2008.

Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, *et al.* Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science. 1997;275:964–967.

Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, *et al.* VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. EMBO J. 1999; 18(14):3964-72.

Asahara T, Kalka C, Isner JM. Stem cell therapy and gene transfer for regeneration. Gene Ther. 2000; 7(6): 451-7.

Bacal F. *et al.* II Diretriz Brasileira de Transplante Cardíaco Arq. Bras. Cardiol. São Paulo 2010, vol.94 no.1 supl.1.

Beattie G.M.; Otonkoski, T.; Lopez, A.D.; Hayek, A. Functional beta-cell mass after transplantation of human fetal pancreatic cells: differentiation or proliferation? 1997. *Diabetes* 46, 244-8.

Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, *et al.* Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 2003;114(6):763-76.

Bianco P. Riminucci, M. The bone marrow stroma in vivo: Ontogeny, structure, cellular composition and changes in disease. *Handbooks in Practical Animal Cell Biology* 1998.

Bjornson C.R.; Rietze, R.L.; Reynolds, B.A.; Magli, M.C.; Vescovi, A.L. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. 1999. *Science* 283, 534-7.

Bongso A.; Lee, E.H. Stem cells : from bench to bedside. Forewords by Sydney Brenner & Philip Yeo World Scientific Publishing, 2005 Singapore

Brener Z, Andrade Z, Barral-Neto M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000.

Campos-de-Carvalho A de, Masuda MO, Tanowitz HB, Wittner M, Goldenberg RC, Spray DC. Conduction defects and arrhythmias in Chagas Disease: Possible role of gap junctions and humoral mechanisms. 1994 *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 5:686-698.

Caplan, A.I. The mesengenic process. *Clin Plast Surg* 1994 21, 429-35

Carvalho ACC, Goldenberg RCS, Tuche FAA e Dohmann HFR. Bases da terapia celular em cardiologia. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2009, 31:75-81.

Carvalho ACC, Sousa JMA - Cardiopatia isquêmica Rev Bras Hipertens, 2001; 8 297-305.

Charbord P.; Casteilla, L. Human mesenchymal stem cell biology. 2011 Med Sc (Paris) 27, 261-267.

Chen X, Armstrong MA, Li G. Mesenchymal stem cells in immunoregulation. Immunol Cell Biol. 2006; 84(5): 413-21.

Clarke D.L.; Johansson, C.B.; Wilbertz, J.; Veress, B.; Nilsson, E.; Karlstrom, H.; Lendahl, U.; Frisen, J. Generalized potential of adult neural stem cells. 2000 Science 288, 1660-3.

Coura J.R. *et al.* Morbidade da doença de Chagas. II Estudos seccionais em quatro áreas de campo no Brasil. 1984 Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 79, n. 1, p. 101-124.

Coura JR, Borges-Pereira J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. Acta Trop. 2010 Jul-Aug;115(1-2):5-13. doi: 10.1016/j.actatropica.2010.03.008. Epub 2010 Apr 9.

Coura JR, Borges-Pereira J. Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review. Rev Soc Bras Med Trop. 2012 Jun;45(3):286-96.

Crea F, Camici PG, De Caterina R, Lanza GA. Chronic Ischaemic Heart Disease The European Society of Cardiology Textbook of Cardiovascular Medicine 2012, (2 ed.) DOI: 10.1093/med/9780199566990.003.017

Cunha-Neto E, Bilate AM, Hyland KV, Fonseca SG, Kalil J, Engman DM. Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry. *Autoimmunity*. 2006;39:41–54.

Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol*. 2000; 28(8): 875-84.

Dexter T.M.; Wright, E.G.; Krizsa, F.; Lajtha, L.G. Regulation of haemopoietic stem cell proliferation in long term bone marrow cultures. 1977 *Biomedicine* 27, 344-9 ().

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.

Dias JC. Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 44 (3):375-379, mai-jun, 2011

Dias, J.C.P. Epidemiological surveillance2000 of Chagas disease.*Cadernos de Saúde Pública*.Rio de Janeiro16. (suppl.2), p.43-59,2000.

Dias, J.C.P. Epidemiology of Chagas' disease. In: Wendel, S.; Brener, Z.; Camargo, M. E.; Rassi, A. Chagas disease (american trypanosomiasis): Its Impact onTranfusion And Clinical Medicine. São Paulo: Ed. ISBT BRAZIL – Sociedade Brasileira Hematologia Hemoterapia, 1992. cap. 5, p.49-80.

Dias, J.C.P. Globalização, iniquidade e doença de Chagas.*Cadernos de Saúde Pública*.Rio de Janeiro. 2007.(suppl1),p.13-22,2007.

Dutra W.O. *et al.* 1996. Chagasic patients lack CD28 expression on many of their circulating T lymphocytes. *Scand J Immunol*. 43, 88-93

Elizari M.V.; Chiale, P.A. Cardiac arrhythmias in Chagas' heart disease 1993. *J Cardiovasc Electrophysiol*, v. 4, n. 5, p. 596-608.

Fonseca SG, Moins-Teisserenc H, Clave E, Ianni B, Nunes VI, Mady C, Iwai LK, Sette A, Sidney J, Marin ML, Goldberg AC, Guilherme L, Charron D, Toubert A, Kalil J, Cunha-Neto E. Identification of multiple HLA-A*0201-restricted cruzipain and FL-160 CD8 epitopes recognized by T cells from chronically *Trypanosoma cruzi*-infected patients *Microbes Infect*. 2005;7:688–697.

Frantz S, Hofmann U, Fraccarollo D, Schäfer A, Kranepuhl S, Hagedorn I, Nieswandt B, Nahrendorf M, Wagner H, Bayer B, Pachel C, Schön MP, Kneitz S, Bobinger T, Weidemann F, Ertl G, Bauersachs J. Monocytes/macrophages prevent healing defects and left ventricular thrombus formation after myocardial infarction. *FASEB J*. 2013 Mar; 27(3):871-81. doi: 10.1096/fj.12-214049. Epub 2012 Nov 16.

Friedenstein A.J.; Chailakhjan, R.K.; Lalykina, K.S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. 1970. *Cell Tissue Kinet* 3, 393-403.

Gardner R.L. Stem cells: potency, plasticity and public perception. 2002 *J Anat* 200, 277-82.

Gronthos S.; Zannettino, A.C.; Graves, S.E.; Ohta, S.; Hay, S.J.; Simmons, P.J. Differential cell surface expression of the STRO-1 and alkaline phosphatase antigens on discrete developmental stages in primary cultures of human bone cells. 1999 *J Bone Miner Res* 14, 47-56.

Jackson K.A.; Mi, T.; Goodell, M.A. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. 1999 *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14482-6.

Jiang Y.; Jahagirdar, B.N.; Reinhardt, R.L.; Schwartz, R.E.; Keene, C.D.; Ortiz-Gonzalez, X.R.; Reyes, M.; Lenvik, T.; Lund, T.; Blackstad, M.; Du, J.; Aldrich, S.; Lisberg, A.; Low, W.C.; Largaespada, D.A.; Verfaillie, C.M. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. 2002 Nature 418, 41-9.

Jiang, Y.; Jahagirdar, B.N.; Reinhardt, R.L.; Schwartz, R.E.; Keene, C.D.; Ortiz-Gonzalez, X.R.; Reyes, M.; Lenvik, T.; Lund, T.; Blackstad, M.; Du, J.; Aldrich, S.; Lisberg, A.; Low, W.C.; Largaespada, D.A.; Verfaillie, C.M. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. 2002 Nature 418, 41-9.

Jones D.L.; Wagers, A.J. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. 2008 Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 9, 11-21.

Junqueira LC, Carneiro J. Histologia Básica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1999, 9ª edição, pp 206-220.

Khan SS, Solomon MA, McCoy JP Jr. Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry. Cytometry B Clin Cytom. 2005;64(1):1-8.

Krampera M, Pasini A, Pizzolo G, Cosmi L, Romagnani S, Annunziato F. Regenerative and immunomodulatory potential of mesenchymal stem cells. Curr Opin Pharmacol. 2006 Aug;6(4):435-41. Epub 2006 Jun 13.

Krause Ds. Plasticity of marrow-derived stem cells. Gene Therapy, 2002; 9:754-758.

Le Blanc K.; Tammik, C.; Rosendahl, K.; Zetterberg, E.; Ringden, O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal 2003 Stem cells. Exp.Hematol. 31, 890-6.

Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simões MV. Pathogenesis of Chronic Chagas Heart Disease. *Circulation*, 2007 mar. 6; 115 (9): 1109-23.

Matesanz-Isabel J, Sintès J, Llinàs L, de Salort J, Lázaro A, Engel P. New B-cell CD molecules *Immunol Lett.* 2011Jan 30; 134(2):104-12. doi: 10.1016/j.imlet.2010.09.019.

Maya JD, Orellana M, Ferreira J, Kemmerling U, López-Muñoz R, Morello A. Chagas disease: Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. 2010. *Biol Res* 43: 323-331.

Menezes C.A. *et al.* Phenotypic and functional characteristics of CD28+ and CD28- cells from chagasic patients: distinct repertoire and cytokine expression. 2004. *Clin. Exp. Immunol.* 137, 129-38.

Mitchell K.E.; Weiss, M.L.; Mitchell, B.M.; Martin, P.; Davis, D.; Morales, L.; Helwig, B.; Beerenstrauch, M.; Abou-Easa, K.; Hildreth, T.; Troyer, D.; Medicetty, S. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. 2003. *Stem Cells* 21, 50-60.

Moore, K.A.; Lemischka, I.R. Stem cells and their niches. 2006 *Science* 311, 1880-5.

Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med.* 2007 Nov 26;204(12):3037-47. Epub 2007 Nov 19.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH (NIH) Disponível em www.nih.gov. Acesso realizado em 25 de abril de 2011. NIH 2009.

Núñez J, Miñana G, Bodí V, Núñez E, Sanchis J, Husser O, Llàcer A. Low lymphocyte count and cardiovascular diseases. *Curr Med Chem*. 2011;18(21):3226-33.

Nuttall M.E.; Patton, A.J.; Olivera, D.L.; Nadeau, D.P.; Gowen, M. Human trabecular bone cells are able to express both osteoblastic and adipocytic phenotype: implications for osteopenic disorders. 1998 *J Bone Miner Res* 13, 371-82.

Orfao, A; Buitrago, JMG. (1995). Fundamentos de la citometria de flujo. In: Orfao, A; Buitrago, JMG. *La Citometria de flujo en el Laboratorio Clinico*. Salamanca: SEQC; 11-30.

Orfao, A; Ruiz-Arguelles, A; Lacombe, F; Ault, K; Basso, G; Danova, M. (1995). Flow Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, Silva SA, Sousa AL, Mesquita CT, Rossi MI, Carvalho AC, *et al* – Transendocardial autologous bone marrow cell transplantation for severe chronic ischemic heart failure- *Circulation*. 2003; May 13;107(18):2294-302.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION Guía de Diagnóstico, Tratamiento y Prevención de la Enfermedad de Chagas 2010. Acceso realizado em 05 de fevereiro de 2013. <http://www.paho.org>

Petry K, Van Voorhis Wc. “Antigens of *Trypanosoma cruzi* that mimic mammalian nervous tissues: investigations of their role in the autoimmune pathophysiology of chronic Chagas' disease.” 1991. *Res Immunol*. 142(2):151-6

Picot J, Guerin CL, Kin CLV, Boulanger CM. Flowcytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology*. 2012 March; 64(2): 109–130. Published online 2012 January 21. doi: 10.1007/s10616-011-9415-0

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284(5411): 143-7.

Powell TM, Paul JD, Hill JM, Thompson M, Benjamin M, Rodrigo M, *et al.* Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes functional endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(2):296-301

Rassi A, Rassi JA, Rassi GG 2000. Fase aguda. In: *Trypanossoma cruzi e a doença de Chagas*. 2.^a Edição. Brener Z, Andrade ZA, Barral-Netto M. Rio de Janeiro, 231-244.

Rassi, A. Clínica: Fase aguda. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. *Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1979. cap. 7, p.249-264.

Reed DM, Foldes G, Harding SE, Mitchell JA. Stem cell-derived endothelial cells for cardiovascular disease: a therapeutic perspective. *Br J Clin Pharmacol.* 2013 Apr;75(4):897-906. doi: 10.1111/j.1365-2125.2012.04361.x.

Reis, D. D. *et al.* Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of TNF-A-alfa+ cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. 1993. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 43, 637-642.

Reynolds B.A.; Weiss, S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. 1992 *Science* 255, 1707-10.

Ribeiro Dos Santos R, Rassi S, Feitosa G, Grecco OT, *et al*; Chagas Arm of the MiHeart Study Investigators (Chagas arm of the multicenter randomized trial

of cell therapy in cardiopathies study a multicenter randomized trial) *Circulation*, 2012; May 22;125(20):2454-61.

Riganti J, Maqueda MG, Piñero MC, Volonteri VI, Galimberti RL. Reactivation of Chagas' disease: cutaneous manifestations in two immunosuppressed patients. *Int J Dermatol*. 2012 Jul;51(7):829-34. doi: 10.1111/j.1365-4632.2011.05224.x.

Santos RR, Soares MB, Carvalho AC. Transplante de células da medula óssea no tratamento da cardiopatia chagásica crônica. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2004; 37(6): 490-495.

Sathler-Avelar R, Lemos EM, Reis DD, Medrano-Mercado N, Araújo-Jorge TC, Antas PR, Corrêa-Oliveira R, Teixeira-Carvalho A, Elói-Santos SM, Favato D, Martins-Filho OA. Source. Phenotypic features of peripheral blood leucocytes during early stages of human infection with *Trypanosoma cruzi*. *Scand J Immunol*. 2003 Dec; 58(6):655-63.

Sathler-Avelar R, Vitelli-Avelar DM, Massara RL, de Lana M, Pinto Dias JC, Teixeira-Carvalho A, Elói-Santos SM, Martins-Filho OA. Etiological treatment during early chronic indeterminate Chagas disease incites an activated status on innate and adaptive immunity associated with a type 1-modulated cytokine pattern. *Microbes Infect*. 2008 Feb;10(2):103-13. doi: 10.1016/j.micinf.2007.10.009. Epub 2007 Oct 22.

Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. 1978 *Blood Cells* 4, 7-25.

Serafini, M.; Dylla, S.J.; Oki, M.; Heremans, Y.; Tolar, J.; Jiang, Y.; Buckley, S.M.; Pelacho, B.; Burns, T.C.; Frommer, S.; Rossi, D.J.; Bryder, D. Hematopoietic

reconstitution by multipotent adult progenitor cells: precursors to long-term hematopoietic stem cells. 2007 J. Exp. Med. 204, 129-39.

Shamblott, M.J.; Axelman, J.; Littlefield, J.W.; Blumenthal, P.D.; Huggins, G.R.; Cui, Y.; Cheng, L.; Gearhart, J.D. Human embryonic germ cell derivatives express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 113-8 (2001).

Shapiro HM, Practical Flow Cytometry. United States of America: John Wiley & Sons, 2005, 3rd Edition.

Short B, Brouard N, Occhiodoro-Scott T, Ramakrishnan A, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells. *Arch Med Res* 2003; 34(6): 565-71.

Silva J; Rocha NG; Nóbrega ACL da. Mobilização de células progenitoras endoteliais com o exercício em sadios: uma revisão sistemática. *Arq. Bras. Cardiologia*, 2012; vol.98 no.2.

Smith A.G. Embryo-derived stem cells: of mice and men. 2001. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 435-62.

Soares MB, Lima RS, Rocha LL, Takyia CM, Pontes-de-Carvalho L, Carvalho ACC *et al*. Transplanted bone marrow cell repair heart tissue and reduce myocarditis in chronic chagasic mice. *Am J Pathol* 2004, 164 (2):441-447.

Sohni A.; Verfaillie, C.M. Multipotent adult progenitor cells. 2011 *Best Pract Res Clin Haematol* 24,3-11.

Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I - The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. *J Hematother.* 1996 Jun;5 (3):213-26.

Tafuri, W.L Pathogenesis of lesions of the autonomic nervous system of the mouse in experimental acute Chagas' disease. Light and electron microscope studies. 1970 *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v.19(3), p.405-417,.

Tafuri, W.L. Patogenia da doença de Chagas. 1987 *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.29, p.194-199.

Takahashi, K.; Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. 2006 *Cell* 126, 663-76.

Teixeira AR, Nascimento RJ, Sturm NR. Evolution and pathology in Chagas disease- a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101(5): 463-91.

Teixeira, A.R.L., Teixeira, M.L. and Santos-Buch, C.A. (1975) The immunology of experimental Chagas disease. IV. Production of lesions in rabbits similar to those of chronic Chagas disease in man. *Am. J. Pathol.* 80, 163 -179.

Trentin, J. Hematopoietic microenvironments: Historical perspectives, status and projections. In: Tavassoli, M. ed. *Handbook of the Hemopoietic Microenvironment* 1989 (Clifton, NJ:Humana Press), 1-87.

Tropepe, V.; Coles, B.L.; Chiasson, B.J.; Horsford, D.J.; Elia, A.J.; McInnes, R.R.; van der Kooy, D. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. 2000 *Science* 287, 2032-6.

Tura BR, Martino HF, Gowdak LH, dos Santos RR, Dohmann HF, Krieger JE, Feitosa G, Vilas-Boas F, Oliveira SA, Silva SA, Bozza AZ, Borojevic R, de Carvalho AC. Multicenter randomized trial of cell therapy in cardiopathies - MiHeart Study. *Trials*. 2007 Jan 18;8:2.

Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol*. 2006 Oct;36(10):2566-73. Review.

Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res*. 2004 Aug 20;95(4):343-53.

Van der Kooy, D.; Weiss, S. Why stem cells? 2000 *Science* 287, 1439-41.

Vilas-Boas F, Feitosa GS, Soares MB, Pinho-Filho JA, Mota A, Almeida AJ, *et al*. Bone marrow cell transplantation to the myocardium of a patient with heart failure due to Chagas' disease. *Arq Bras Cardiol* 2004; 82(2): 185-7, 181-4.

Vilas-Boas F, Feitosa GS, Soares MB, Pinho-Filho JA, Mota A, Almeida AJ, *et al*. Bone marrow cell transplantation in chagas' disease heart failure: report of the first human experience. *Arq Bras Cardiol*. 2006 Mar 4. pii: S0066-782X2011005000028.

Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, Weissman IL. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 2002; 297(5590): 2256-9.

Weissman, I.L.; Anderson, D.J.; Gage, F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. 2001 *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 387-403.

Wilson, A.; Trumpp, A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. 2006 *Nat Rev Immunol* 6,93-106.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Control of Chagas disease. Geneva: World Health Organization; 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: report of a joint WHO/FAO expert consultation. 2002. Disponível em <http://www.who.int> Acesso realizado em 25 de janeiro de 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control, 2011. Acesso realizado em 05 de fevereiro de 2013. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241564373_eng.pdf.

Xu S, Zhu J, Yu L, Fu G. Endothelial progenitor cells: current development of their paracrine factors in cardiovascular therapy. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2012 Apr;59(4):387-96. doi: 10.1097/FJC.0b013e3182440338.

Yoder MC, Mead LE, Prater D, Krier TR, Mroueh KN, Li F, *et al*. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood*. 2007;109 (5):1801-9.

Zulewski, H.; Abraham, E.J.; Gerlach, M.J.; Daniel, P.B.; Moritz, W.; Muller, B.; Vallejo, M.; Thomas, M.K.; Habener, J.F. Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. 2001 *Diabetes* 50, 521-33.

10 Anexos

Anexo I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**“Estudo Multicêntrico, Randomizado de Terapia Celular em Cardiopatias –
Cardiopatía Chagásica.”**

11 Informações iniciais

O coração é, sem dúvida, o órgão mais lesado na doença de Chagas. Baqueando aos poucos, o órgão vai se dilatando e crescendo, atingindo amiúde tamanhos enormes (coração de boi). São comuns, nessa fase avançada, as grandes inchações das pernas e do restante do corpo, as sensações de fraqueza e de cansadas, as batadeiras, falta de ar. Não são raras, infelizmente, as mortes súbitas neste estágio da doença. Até aqui, o médico conseguiu melhorar a qualidade de vida e aumentar a sobrevivência dos pacientes através das unidades clínicas para tratamento da insuficiência cardíaca. No entanto, se você já participa desta unidade clínica, e porém continua com uma qualidade de vida ruim apesar de cumprir regularmente com as orientações de seu médico assistente, estamos propondo um tratamento alternativo.

Hoje em dia, felizmente, nos indivíduos com formas graves da doença no coração, existe uma nova proposta de tratamento. Estudos experimentais, em animais, sobre o uso de células tronco de medula óssea no tratamento da doença de Chagas na forma cardíaca avançada vêm sendo desenvolvidos no Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (FIOCRUZ-BA). Resultados iniciais são promissores. Estes resultados, juntamente com os dados disponíveis na literatura médica, justificam ainda que de forma experimental esta estratégia de manejo nos pacientes, como voce, com a forma cardíaca avançada da doença de Chagas. Esta estratégia de tratamento utiliza as células tronco da sua própria medula óssea.

Baseado nestes achados, o Ministério da Saúde está realizando uma pesquisa pioneira no mundo e você está sendo convidado a participar de um estudo visando o transplante de células tronco da medula óssea para o coração. Antes de você decidir participar deste estudo,

é importante que você leia as informações a seguir referentes ao estudo para o qual você está sendo convidado a participar. O investigador do estudo discutirá com você as dúvidas que você tenha sobre este consentimento ou sobre o estudo.

A **cardiomioplastia com células de medula óssea** é um procedimento experimental que consiste numa tentativa de implantar no seu coração células da sua medula óssea. Estas células, as chamadas células-tronco, teriam a capacidade de criar novas células musculares e vasos no seu coração, substituindo aquela área de células musculares mortas (fibrosadas ou cicatrizadas) por células musculares vivas, com capacidade de contração e bombeamento do sangue necessário para todo o organismo.

12 Explicação do estudo

Primeiramente, deve ficar claro que voce está sendo convidado para participar de um estudo que vai testar a segurança e a eficácia da “cardiomioplastia com células de medula óssea”. É importante dizer que, não há qualquer garantia de que voce terá qualquer benefício direto deste estudo. Ainda mais, é um estudo que não pode prever com certeza os seus riscos porque o número de pacientes já submetidos a este procedimento é ainda muito pequeno.

Por outro lado, nas pesquisas feitas em animais, em nenhum momento se observou qualquer tipo de complicação decorrente deste procedimento. Ainda mais, uma vez aceitando participar deste estudo, voce será submetido a vários exames antes do implante das células. Todos estes exames (por exemplo, ressonância magnética, ecocardiograma, e exames de sangue) são exames de rotina no dia-a-dia da medicina, e servirão para termos a certeza de que voce terá a maior chance possível de se beneficiar com implante das células, e com o menor risco possível. Todos estes exames serão realizados no Hospital aprovado pelo Ministério da Saúde para realização deste estudo. Voce não terá qualquer despesa com a realização destes testes, que serão custeados pelo Ministério da Saúde.

Uma vez que voce concorde em participar do estudo, será submetido(a) a retirada de células da sua medula óssea através de uma punção por agulha realizada sob efeito de sedativos e analgésicos, por um especialista em Hematologia. A preparação das células que serão injetadas no coração será feita no laboratório enquanto voce estará sendo submetido(a) a

um cateterismo, por meio do qual nós iremos liberar as células tronco da medula óssea dentro das coronárias que levam o sangue para todo o coração. Depois do implante de células voce ficará internado(a) por mais 48 horas. Neste período voce será observado(a) e serão realizados mais 2 ecocardiogramas e mais exames de sangue.

Você continuará tomando todas as medicações que tomava anteriormente. Como esta é uma nova forma de tratamento para o coração, existe a possibilidade de complicações relacionadas ao procedimento, incluindo aquelas relacionadas ao cateterismo e complicações relacionadas às injeções das células purificadas. É por isso, também, que você será submetido aos vários exames após o tratamento. Depois da alta hospitalar serão realizadas consultas no hospital 15 dias após o procedimento, e então, mensalmente do primeiro até o segundo mês de acompanhamento. Após o segundo mês as consultas serão realizadas a cada 2 meses até o sexto mes, e a partir daí a cada trimestre até completar 1 ano após o procedimento, quando o estudo termina. Em todas estas consultas serão realizados um ecocardiograma e um eletrocardiograma. Nas consultas do terceiro mês, sexto mês e 1 ano todos os exames realizados inicialmente serão repetidos, incluindo a ressonância magnética, para avaliarmos se a área de fibrose diminuiu.

Dentre os exames que precisam ser feitos para que o Sr.(a) possa participar do estudo, a punção de medula óssea e o cateterismo cardíaco são considerados invasivos. A punção já foi explicada acima. O cateterismo cardíaco consiste na colocação de um cateter em uma artéria na virilha, o que permite levá-lo até as artérias coronárias para visualização destas.

Durante todo o período do estudo voce terá acesso 24 h por dia a uma enfermeira pesquisadora, do hospital, para tirar qualquer dúvida. Em alguns momentos, esta enfermeira fará contato com voce independente de ter sido chamada.

Este estudo é randomizado e duplo cego e isso quer dizer que se voce aceitar participar dele, vai ser submetido a um sorteio, por uma técnica especial, com o objetivo de nos dizer se vai fazer parte do grupo de pacientes que vai implantar no coração as células tronco retiradas da medula óssea ou se vai fazer parte do grupo controle, que vai ser submetido ao cateterismo mas não receberá as células. O estudo é considerado duplo cego, pois nem voce e nem o

médico que o estiver acompanhando saberão antes do término do estudo (após ter completado 1 ano de acompanhamento) se o que o voce recebeu foi a solução de soro fisiológico contendo células ou se foi o soro fisiológico puro.

Caso voce faça parte do grupo controle, suas células tronco serão armazenadas no Hemocentro do Instituto Nacional do Câncer, situado no Rio de Janeiro, ou no Hospital onde foi realizado o procedimento, até o término da pesquisa. Caso a hipótese da pesquisa se confirme e, haja da sua parte o desejo de receber tais células, as mesmas serão implantadas. Caso contrário elas permanecerão armazenadas de acordo com a resolução do CONEP nº 347/2005.

Como não temos certeza se esse tipo de tratamento vai trazer lhe benefícios, precisamos ter um grupo chamado controle, a fim de avaliarmos a real eficácia do tratamento que estamos propondo, através da comparação dos resultados entre os dois grupos. A participação neste estudo, seja no grupo controle ou no grupo tratado com células tronco da medula óssea, é extremamente importante para o avanço da ciência nesta área de pesquisa com potencial benefício para milhares de pacientes que tenham o mesmo problema que voce e que futuramente possam ser submetidos a este tipo de tratamento, se os resultados positivos do implante de células da medula óssea se confirmarem. Sua participação ou não neste estudo não afetará de nenhuma forma a qualidade do seu tratamento presente ou futuro. Você poderá solicitar a seu médico o seu desligamento do estudo a qualquer momento. Se você tiver dúvidas, pergunte ao seu médico, e ele lhe explicará com detalhes tudo o que você quiser saber sobre este estudo. Somente através de estudos como este é que os médicos poderão descobrir novas e melhores formas de tratar este tipo de problema em você e em outros pacientes que tenham problemas semelhantes.

Além disso, voce terá o benefício de estar sendo acompanhado por especialistas em cardiologia, além de seu próprio médico, incluindo exames complementares diversos para avaliação do seu coração, sem qualquer ônus adicional.

13 Explicação sobre o procedimento e seus riscos

O procedimento é dividido em duas etapas: a retirada de células da medula óssea, e o implante das células-tronco no seu coração.

A retirada das células será realizada sob anestesia, através de punção da medula (parte interna) do seu osso da bacia. Este procedimento é semelhante aos já realizados para transplantes de medula utilizados em larga escala na medicina de hoje. Não constitui nenhuma novidade no meio médico, além de oferecer baixíssimo risco de complicações. Estes riscos envolvem perfuração óssea e infecção do osso, e ocorrem em menos de 1% dos casos. A preparação das células que serão injetadas no coração será feita no laboratório enquanto o cateterismo está sendo realizado

O implante das células-tronco no seu coração será realizado durante o cateterismo por um especialista em medicina intervencionista.

As células da medula serão liberadas dentro das artérias coronárias que levam sangue para todo o seu coração. Acreditamos que tais células terão a capacidade de substituir áreas de fibrose por células musculares saudáveis, capazes de exercer sua função normal de contração. Após 25 dias do tratamento, durante 05 dias será administrada, por via subcutânea, uma medicação para estimular a produção de células medulares, medicação esta que é de uso comum na prática médica e cujo perfil de segurança está bem estabelecido.

Os riscos do implante de células em seres humanos são muito pouco conhecidos. Existem seres humanos que já receberam células da medula óssea no coração, através de procedimento cirúrgico, durante operações de ponte de safena, e ainda outros que as receberam por meio de um procedimento igual ou semelhante ao que estamos lhe propondo. Não houve qualquer complicação relatada até o momento. Observe que apenas poucos pacientes já se submeteram a este procedimento previamente o que é muito pouco para que possamos afirmar qualquer coisa com respeito às complicações.

No entanto, podemos imaginar algumas complicações possíveis de ocorrer, além das já descritas acima: inflamação no coração, levando a um enfraquecimento do seu músculo,

com possível rompimento deste músculo, aparecimento de arritmias graves, infecção no coração e crescimento de tecidos não cardíacos no seu coração.

14 Benefícios que você pode obter

Embora não haja nenhuma garantia de que você terá benefícios com este estudo, é possível que ocorra melhora parcial ou total da função do músculo do coração e dos sintomas decorrentes destas anormalidades tais como sensação de cansaço, falta de ar, inchaço nas pernas e outros.

Da mesma forma, o acompanhamento clínico muito detalhado que você receberá durante os doze meses de duração do estudo poderão ser de auxílio no tratamento da sua doença, independente do benefício direto do procedimento. Este acompanhamento clínico poderá permitir a identificação de complicações naturais ou de agravamento da sua doença de forma mais precoce, permitindo uma ação médica mais eficaz nestes casos.

15 Direitos do paciente

A sua participação é inteiramente voluntária. Durante o estudo você deve se sentir livre para questionar o que desejar, e caso não se considere suficientemente esclarecido pelo profissional que o(a) estiver atendendo, poderá solicitar o contato direto com o investigador responsável por este estudo, o Dr. _____, ou fazê-lo diretamente no telefone (0**)_____.

Uma vez aceitando participar desta pesquisa, você deverá se sentir livre para abandonar o estudo a qualquer momento do curso deste, sem que isto afete o seu cuidado ou tratamento futuro neste hospital. O seu médico também poderá retirá-lo do estudo a qualquer momento, se ele julgar que seja necessário para o seu bem estar.

Caso surja alguma dúvida quanto à ética do estudo, você deverá se reportar ao Comitê de Ética em Pesquisas envolvendo seres humanos – subordinado ao Conselho Nacional de Ética em Pesquisa, órgão do Ministério da Saúde, através de solicitação à enfermeira pesquisadora, que estará sob contacto permanente, ou contactando diretamente o coordenador do referido comitê deste hospital, que lhe será informado pela enfermeira pesquisadora. Você tem direito

ao completo sigilo de sua identidade quanto a sua participação neste estudo, incluindo a eventualidade da apresentação dos resultados deste estudo em congressos médicos e jornais científicos.

Diante do exposto nos parágrafos anteriores eu, firmado abaixo, (primeiro nome e sobrenome) residente à (endereço)..... concordo em participar do estudo **“Estudo Multicêntrico, Randomizado de Terapia Celular em Cardiopatias – Cardiopatia Chagásica.”**

Eu fui completamente orientado pelo Dr. (nome do médico)que está realizando o estudo, de acordo com sua natureza, propósito e duração. Eu pude questioná-lo sobre todos os aspectos do estudo. Além disto, ele / ela me entregou uma cópia da folha de informações para os participantes, a qual li, compreendi e me deu plena liberdade para decidir acerca da minha espontânea participação nesta pesquisa.

Depois de tal consideração, concordo em cooperar com o Dr.e informá-lo imediatamente sobre qualquer anormalidade observada.

Estou ciente que sou livre para sair do estudo a qualquer momento, se assim desejar.

Minha identidade jamais será publicada e os dados colhidos permanecerão confidenciais. Concordo que estes poderão ser examinados por pessoas envolvidas no estudo com autorização delegada do investigador e por pessoas representantes do Ministério da Saúde. Assim como, não restringirei a publicação dos resultados obtidos com a pesquisa.

Data e assinatura procede que este tenha sido “Lido e Aprovado”.

Investigador: Data:.....

Assinatura:.....

Testemunha: Data:.....

Assinatura:.....

Participante: Data:.....

Assinatura:.....

Anexo II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

“Estudo Multicêntrico, Randomizado de Terapia Celular em Cardiopatias - Doença Isquêmica Crônica.”

16 Informações iniciais

O coração é um órgão que, como qualquer outro do corpo humano, precisa receber sangue na quantidade adequada para poder funcionar bem. O sangue que alimenta o coração chega através de vasos sanguíneos, as chamadas artérias coronárias, que vão se afinando e formando uma grande rede e passam a se chamar capilares. Muitas vezes, ocorre o entupimento das artérias do coração por placas de gordura. Isto faz com que o coração deixe de receber sangue em quantidade adequada e passe a funcionar mal. Quando isto ocorre, o paciente pode sentir um desconforto no peito aos esforços físicos, o que os médicos chamam de angina. Outras vezes, o entupimento leva ao ataque cardíaco (infarto do miocárdio) e como consequência, o coração enfraquece e o paciente passa a se cansar mais facilmente.

Existem várias maneiras de os médicos tratarem os pacientes com angina e enfraquecimento do coração: são utilizados medicamentos, um cateter especial pode dilatar a artéria entupida (angioplastia) ou uma cirurgia pode ser realizada para criar uma “ponte”. Infelizmente, em alguns casos, estes tratamentos não podem ser oferecidos ou são oferecidos parcialmente aos pacientes por dificuldades técnicas e assim os sintomas e a progressão da doença só se resolvem em parte.

O Ministério da Saúde está realizando um estudo pioneiro no mundo e você está sendo convidado a participar deste estudo porque existe indicação de implantação de pelo menos uma ponte de safena no seu coração e existe uma parte doente do órgão onde não existe a possibilidade de utilizar métodos habituais para dilatar e desobstruir o vaso ou mesmo colocar uma ponte de safena no local. Por isso, você foi escolhido para participar deste estudo

que vai testar uma nova forma de melhorar a irrigação do coração e de substituir o tecido lesado naquela região.

A **cardiomioplastia com células de medula óssea** é um procedimento experimental que consiste numa tentativa de implantar no seu coração células da sua medula óssea. Estas células, as chamadas células-tronco, têm a capacidade de criar novas células musculares e vasos no seu coração, substituindo aquela área de células musculares mortas (fibrosadas ou cicatrizadas) por células musculares vivas, com capacidade de contração e bombeamento do sangue necessário para todo o organismo.

17 Explicação do estudo

Primeiramente, deve ficar claro que voce está sendo convidado(a) para participar de um estudo que vai testar a segurança e a eficácia da “cardiomioplastia com células de medula óssea”. É importante dizer que, não há qualquer garantia de que voce terá qualquer benefício direto deste estudo. Ainda mais, é um estudo que não pode prever com certeza os seus riscos porque o número de pacientes já submetidos a este procedimento é ainda muito pequeno.

Por outro lado, nas pesquisas feitas em animais, em nenhum momento se observou qualquer tipo de complicação decorrente deste procedimento. Ainda mais, uma vez voce aceitando participar deste estudo, será submetido a vários exames antes do implante das células. Todos estes exames (por exemplo, ressonância magnética, ecocardiograma, e exames de sangue) são exames de rotina no dia-a-dia da medicina, e servirão para termos a certeza de que voce terá a maior chance possível de se beneficiar com implante das células , e com o menor risco possível. Todos estes exames serão realizados no Hospital aprovado pelo Ministério da Saúde para realização deste estudo. Voce não terá qualquer despesa com a realização destes testes, que serão custeados pelo Ministério da Saúde.

Uma vez que voce concorde em participar do estudo, será submetido(a) a retirada de células da sua medula óssea através de uma punção por agulha realizada sob efeito de sedativos e analgésicos, por um especialista em Hematologia. A preparação das células que

serão injetadas no coração será feita no laboratório enquanto a cirurgia de ponte está sendo realizada. Todo o procedimento que envolve a cirurgia cardíaca será realizado dentro dos padrões habituais do hospital. A única diferença é que, depois de colocadas as pontes, o cirurgião vai injetar com uma seringa, no local doente do coração onde há impossibilidade de tratamento pelas técnicas habituais, as células purificadas da sua medula. Depois de terminado o procedimento, a equipe vai proceder o fechamento do tórax como de costume e você será encaminhado para a sala de recuperação pós-operatória, também como de rotina.

Depois da cirurgia, você fará mais exames para saber se está tudo bem, como os médicos normalmente fazem. Deverá ficar internado por 7 a 10 dias. Depois da alta, você terá consultas freqüentes no ambulatório para seguimento. Neste período uma série de exames não invasivos, que incluem eletrocardiograma, ecocardiograma, cintilografia e ressonância magnética, serão feitos para saber como está evoluindo o seu coração. Você continuará tomando todas as medicações que tomava anteriormente. Como esta é uma nova forma de tratamento para o coração, existe a possibilidade de complicações relacionadas ao procedimento, incluindo aquelas relacionadas diretamente à cirurgia cardíaca (como qualquer outra cirurgia do coração) e complicações relacionadas às injeções das células purificadas. É por isso, também, que você será submetido aos vários exames após a cirurgia. Existe a possibilidade de insucesso deste novo tratamento, mas você ainda receberá os mesmos benefícios que qualquer outro paciente decorrentes da cirurgia para colocação das pontes. Depois da alta hospitalar serão realizadas consultas no hospital 15 dias após o procedimento, e então, mensalmente do primeiro até o terceiro mês de acompanhamento. Após o terceiro mês as consultas serão realizadas a cada 3 meses até completar 1 ano após o procedimento, quando o estudo termina. Em todas estas consultas serão realizados um ecocardiograma e um eletrocardiograma. Nas consultas do terceiro mês, sexto mês e 1 ano todos os exames realizados inicialmente serão repetidos, incluindo a ressonância magnética, para avaliarmos se a área de fibrose diminuiu. Um novo cateterismo cardíaco, para checarmos se está tudo bem com o músculo do seu coração e com as coronárias, será repetido somente no sexto mês após o procedimento.

Dentre os exames que precisam ser feitos para que o Sr.(a) possa participar do estudo, a

punção de medula óssea e o cateterismo cardíaco são considerados invasivos. A punção já foi explicada acima. O cateterismo cardíaco consiste na colocação de um cateter em uma artéria na virilha, o que permite levá-lo até as artérias coronárias para visualização destas.

Durante todo o período do estudo voce terá acesso 24 h por dia a uma enfermeira pesquisadora, do hospital, para tirar qualquer dúvida. Em alguns momentos, esta enfermeira fará contato com voce independente de ter sido chamada.

Este estudo é randomizado e duplo cego e isso quer dizer que se voce aceitar participar dele, vai ser submetido a um sorteio, por uma técnica especial, com o objetivo de nos dizer se vai fazer parte do grupo de pacientes que vai implantar no coração as células tronco retiradas da medula óssea ou se vai fazer parte do grupo controle, que vai ser submetido a cirurgia mas não receberá as células. O estudo é considerado duplo cego, pois nem voce e nem o médico que o estiver acompanhando saberão antes do término do estudo (após ter completado 1 ano de acompanhamento) se o que voce recebeu foi a solução de soro fisiológico contendo células ou se foi o soro fisiológico puro.

Caso voce faça parte do grupo controle, suas células tronco serão armazenadas no Hemocentro do Instituto Nacional do Câncer, situado no Rio de Janeiro, ou no Hospital onde foi realizado o procedimento, até o término da pesquisa. Caso a hipótese da pesquisa se confirme e, houver da sua parte o desejo de receber tais células, as mesmas serão implantadas. Caso contrário elas permanecerão armazenadas de acordo com a resolução do CONEP nº 347/2005.

Como não temos certeza se esse tipo de tratamento vai lhe trazer benefícios, precisamos ter um grupo chamado controle, a fim de avaliarmos a real eficácia do tratamento que estamos propondo, através da comparação dos resultados entre os dois grupos. A

participação neste estudo, seja no grupo controle ou no grupo tratado com células tronco da medula óssea, é extremamente importante para o avanço da ciência nesta área de pesquisa com potencial benefício para milhares de pacientes que tenham o mesmo problema que voce e que futuramente possam ser submetidos a este tipo de tratamento, se os resultados positivos do implante de células da medula óssea se confirmarem. Sua participação ou não neste estudo não afetará de nenhuma forma a qualidade do seu tratamento presente ou futuro. Você poderá solicitar a seu médico o seu desligamento do estudo a qualquer momento. Se você tiver dúvidas, pergunte ao seu médico, e ele lhe explicará com detalhes tudo o que você quiser saber sobre este estudo. Somente através de estudos como este é que os médicos poderão descobrir novas e melhores formas de tratar este tipo de problema em você e em outros pacientes que tenham problemas semelhantes.

Além disso, voce terá o benefício de estar sendo acompanhado por especialistas em cardiologia, além de seu próprio médico, incluindo exames complementares diversos para avaliação do seu coração, sem qualquer ônus adicional.

18 Explicação sobre o procedimento e seus riscos

O procedimento é dividido em duas etapas: a retirada de células da medula óssea, e o implante das células-tronco no seu coração.

A retirada das células será realizada sob anestesia, através de punção da medula (parte interna) do seu osso da bacia. A preparação das células que serão injetadas no coração será feita no laboratório enquanto a cirurgia de ponte está sendo realizada. Este procedimento é semelhante aos já realizados para transplantes de medula utilizados em larga escala na medicina de hoje. Não constitui nenhuma novidade no meio médico, além de oferecer baixíssimo risco de complicações. Estes riscos envolvem perfuração óssea e infecção do osso, e ocorrem em menos de 1% dos casos.

O implante das células-tronco no seu coração será realizado durante a cirurgia. As células da medula serão injetadas na parte do coração que não puder receber as pontes. Acreditamos que tais células terão a capacidade de criar novos vaso e substituir aquela área de fibrose por células musculares saudáveis, capazes de exercer sua função normal de contração.

Os riscos deste implante de células em seres humanos são muito pouco conhecidos. Existem seres humanos que já receberam células da medula óssea no coração, através de procedimento cirúrgico, durante operações de ponte de safena, como no seu caso, e ainda outros que receberam células de medula óssea através de cateter (tubo que leva as células até o coração). Não houve qualquer complicação relatada até o momento. Observe que apenas poucos pacientes já se submeteram a este procedimento previamente o que é muito pouco para que possamos afirmar qualquer coisa com respeito às complicações.

No entanto, podemos imaginar algumas complicações possíveis de ocorrer, além das já descritas acima: inflamação no coração, levando a um enfraquecimento do seu músculo, com possível rompimento deste músculo, aparecimento de arritmias graves, infecção no coração e crescimento de tecidos não cardíacos no seu coração.

19 Benefícios que você pode obter

Embora não haja nenhuma garantia de que você terá benefícios com este estudo, é possível que ocorra melhora parcial ou mesmo total das crises de angina (sensação de desconforto no tórax), melhora parcial ou total da função do músculo do coração e dos sintomas decorrentes destas anormalidades tais como sensação de cansaço, falta de ar, inchaço nas pernas e outros.

Da mesma forma, o acompanhamento clínico muito detalhado que você receberá durante os doze meses de duração do estudo poderão ser de auxílio no tratamento da sua doença, independente do benefício direto do procedimento. Este acompanhamento clínico poderá permitir a identificação de complicações naturais ou de agravamento da sua doença de forma mais precoce, permitindo uma ação médica mais eficaz nestes casos.

20 Direitos do paciente

A sua participação é inteiramente voluntária. Durante o estudo você deve se sentir livre para questionar o que desejar, e caso não se considere suficientemente esclarecido pelo profissional que o(a) estiver atendendo, poderá solicitar o contato direto com o investigador responsável por este estudo, o Dr. _____, ou fazê-lo diretamente no telefone (0** __) _____.

Uma vez aceitando participar desta pesquisa, voce deverá se sentir livre para abandonar o estudo a qualquer momento do curso deste, sem que isto afete o seu cuidado ou tratamento futuro neste hospital. O seu médico também poderá retirá-lo do estudo a qualquer momento, se ele julgar que seja necessário para o seu bem estar.

Caso surja alguma dúvida quanto à ética do estudo, voce deverá se reportar ao Comitê de Ética em Pesquisas envolvendo seres humanos – subordinado ao Conselho Nacional de Ética em Pesquisa, órgão do Ministério da Saúde, através de solicitação à enfermeira pesquisadora, que estará sob contacto permanente, ou contactando diretamente o coordenador do referido comitê deste hospital, que lhe será informado pela enfermeira pesquisadora. Voce tem direito ao completo sigilo de sua identidade quanto a sua participação neste estudo, incluindo a eventualidade da apresentação dos resultados deste estudo em congressos médicos e jornais científicos.

Diante do exposto nos parágrafos anteriores eu, firmado abaixo, (primeiro nome e sobrenome) residente à (endereço)..... concordo em participar do estudo **“Estudo Multicêntrico, Randomizado de Terapia Celular em Cardiopatias - Doença Isquêmica Crônica.”**

Eu fui completamente orientado pelo Dr. (nome do médico)que está realizando o estudo, de acordo com sua natureza, propósito e duração. Eu pude questioná-lo sobre todos os aspectos do estudo. Além disto, ele / ela me entregou uma cópia da folha de informações para os participantes, a qual li, compreendi e me deu plena liberdade para decidir acerca da minha espontânea participação nesta pesquisa.

Depois de tal consideração, concordo em cooperar com o Dr.e informá-lo imediatamente sobre qualquer anormalidade observada.

Estou ciente que sou livre para sair do estudo a qualquer momento, se assim desejar.

Minha identidade jamais será publicada e os dados colhidos permanecerão confidenciais. Concordo que estes poderão ser examinados por pessoas envolvidas no estudo com autorização delegada do investigador e por pessoas representantes do Ministério da Saúde. Assim como, não restringirei a publicação dos resultados obtidos com a pesquisa.

Data e assinatura procede que este tenha sido “Lido e Aprovado”.

Investigador: Data:.....

Assinatura:.....

Testemunha: Data:.....

Assinatura:.....

Participante: Data:.....

Assinatura:.....