



Gabriel Artur Maia Alves

Medicina Regenerativa: uma visão geral no pós-enfarte do miocárdio

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Sónia Silva Santos apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Gabriel Artur Maia Alves

Medicina Regenerativa: uma visão geral no pós-enfarte do miocárdio

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas,
orientada pela Professora Doutora Sónia Silva Santos apresentada à Faculdade de
Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Gabriel Artur Maia Alves, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2009010556, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 7 de julho de 2015.

(Gabriel Artur Maia Alves)

A tutora,

Maia Alves
FARMÁCIA NUNES DE SÁ
DIRETORIA TÉCNICA
DR. MADALENA JACINTO NUNES DE SÁ
Cont. n.º 130 830 130
Rua da Escola n.º 1 - Fátima
4200-098 GUIMARÃES

(Dr.ª **Maria Madalena Nunes de Sá**)

○ estudante,

(Gabriel Artur Maia Alves)

Agradecimentos

À Professora Doutora Sónia Silva Santos, agradeço a disponibilidade, a simpatia, o acompanhamento e todos os conhecimentos transmitidos que tornaram possível a realização deste trabalho.

À minha família, namorada e amigos que, de uma ou outra forma, contribuíram para o meu desempenho e estadia em Coimbra.

Índice

Lista de Abreviaturas	6
Resumo	7
Abstract	7
1. Introdução	8
2. Medicina Regenerativa.....	9
3. Terapêutica.....	9
4. Métodos de medição dos parâmetros terapêuticos.....	11
5. Ensaio pré-clínicos	12
6. Ensaio clínicos	14
6.1. Estudos e resultados	16
7. Acompanhamento do doente	19
8. Perspetivas futuras	19
8.1. Novos tipos celulares	20
8.2. Células estaminais fenotipicamente modificadas	20
8.3. Terapia cardíaca com pulsos elétricos	20
8.4. Engenharia de tecidos	21
8.5. Sinalização Parácrina	21
9. Conclusões	22
10. Bibliografia	23

Lista de Abreviaturas

WHO – World Health Organization

EUA – Estados Unidos da América

bMSC – Bone Marrow Mesenquimal Stem Cell

ASC – Adipose tissue derived stem cell

MSC – Mesenchymal Stem Cell

EPC – Endothelial Progenitor Cell

MNC – Mononuclear Cell

EAM – Enfarte Agudo do Miocárdio

BMMNC – Bone Marrow Mononuclear Cell

NHLBI – National Heart Lung and Blood Institute

CCTRN – Cardiovascular Cell Therapy Research Network

Resumo

Ao longo dos anos, assistimos a uma grande evolução das terapêuticas cardíacas celulares, partindo dos ensaios clínicos realizados nos animais, onde foram obtidos promissores resultados, a nível de regeneração do miocárdio, conseguindo-se recuperar a funcionalidade e restaurar vascularização, até aos mais recentes ensaios clínicos realizados em humanos onde, embora mais modestos, também foram demonstradas melhorias na função global do tecido cardíaco. Vários tipos de células foram utilizadas nestes estudos, sendo administradas, maioritariamente, por infusão intracoronária e intramiocardial. A importância do método de medição de resultados e a necessidade de um acompanhamento dos doentes tratados ao longo dos anos são fatores de grande importância. O objetivo dos futuros estudos será caminhar para uma padronização das técnicas envolvidas na terapêutica cardíaca celular, determinando qual o tipo de célula mais eficaz ao mesmo tempo que, o acompanhamento e número de doentes por estudo são aumentados.

A presente monografia tem como objetivo fazer um apanhado geral da terapêutica celular cardíaca, apresentando os resultados de muitos ensaios clínicos realizados, bem como possíveis perspectivas terapêuticas futuras.

Abstract

Over the years we have seen a great evolution of cardiac cell therapies, starting from clinical trials in animals, where were obtained promising results, in the level of myocardial regeneration, achieving regain functionality and restore vascularization, until latest clinical trials in humans which, although modest, were also demonstrated improvements in the overall function of the cardiac tissue. Various types of cells were used in these studies and been administered mainly by intramyocardial and intracoronary infusion. The importance of the outcome measurement method and the need for monitoring of patients treated over the years are very important factors. The goal of future studies will be to move towards a standardization of the techniques involved in cell cardiac therapy, determining what type of cell is more effective while follow up time and number of patients per study are increased.

This monograph aims to give an overview of cardiac cell therapy, presenting the results of many clinical trials as well as possible future therapeutic perspectives.

I. Introdução

O enfarte agudo do miocárdio, comumente chamado de “ataque cardíaco” é uma urgência médica resultante da lesão do músculo cardíaco causada por uma obstrução das artérias coronárias. O deficiente suprimento sanguíneo originado por esta obstrução vai fazer com que as células musculares cardíacas não obtenham o oxigénio e nutrientes necessários para realizarem a sua, tão vital, função contráctil, podendo mesmo levar à destruição do tecido cardíaco.

Estes doentes representam um grupo de risco uma vez que, ao contrário de outros órgãos, como o fígado, o coração apresenta uma reduzida capacidade de autorregeneração e dependendo da extensão e do tempo de isquémia podem ser perdidos mais de mil milhões de cardiomiócitos, sujeitando as restantes células cardíacas a um esforço adicional para manter o fluxo sanguíneo regular condicionando o aparecimento de arritmias e insuficiências cardíacas. O transplante cardíaco era nestas situações a única hipótese de tratamento, porém, a impossibilidade de existência de um fluxo de dadores e os avultados custos e riscos dos procedimentos cirúrgicos, fizeram com que esta opção se torne cada vez mais inviável. É, então, imperativa a procura de novos métodos e estratégias de tratamento que levem à restauração do normal funcionamento do músculo cardíaco[2].

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*, WHO) relativos ao ano de 2012, as doenças cardiovasculares foram responsáveis por 17,5 milhões de mortes em todo o mundo[3]. É a principal causa de morte no planeta. Em Portugal, no ano de 2012, estima-se que tenham morrido cerca de 4348 pessoas vítimas de enfarte agudo do miocárdio, número este que tem vindo a diminuir, baixando 10,5% desde o ano de 2008[4]. Para além destes dramáticos números, os tratamentos comportam um grande impacto económico nos sistemas de saúde; por exemplo, estima-se que, no ano de 2009 nos Estados Unidos da América (EUA) foram gastos, tanto direta como indiretamente, mais de 312.6 mil milhões de dólares (285,5 mil milhões de euros) nos tratamentos das doenças cardiovasculares[5]. As terapêuticas convencionais diminuem a mortalidade, atenuando os sintomas e abrandando a deterioração do miocárdio, porém não conseguem restaurar nem a estrutura nem a função cardíaca[6].

2. Medicina Regenerativa

Desde há séculos que o termo auto-cúrável é usado, porém, na atualidade pode dizer-se que este conceito representa a reversão dos efeitos de uma ou mais doenças no ser humano, que é, nem mais nem menos, o objetivo principal da medicina regenerativa. Ela é aplicada nos tratamentos de uma vasta panóplia de doenças. Um exemplo da sua aplicação é no tratamento de doentes que sofreram enfarte agudo do miocárdio.

A medicina regenerativa aliada às terapêuticas celulares, utilizando células estaminais, tem apresentado evidência que poderá ser uma hipótese para o tratamento destes doentes.

Existem vários tipos de células estaminais e todas elas apresentam três importantes características: são pluripotentes, pois dão origem a várias células filhas que por sua vez se diferenciam em vários tipos celulares específicos sob a influência do microambiente em que estão inseridas; têm grande capacidade de proliferação e de divisão; têm grande capacidade de autorrenovação[7].

As células estaminais podem ser obtidas de variadas fontes, a medula óssea contém uma grande variedade de células progenitoras que vão desde células hematopoiéticas, a células progenitoras adultas multipotentes e células estaminais mesenquimatosas. Da circulação sanguínea periférica podemos obter células progenitoras que vão ser utilizadas na reparação miocárdica ou na terapêutica angiogénica da doença vascular periférica. Para além das células anteriormente referidas, as células estaminais pluripotentes derivadas do tecido adiposo, subpopulações minúsculas de células pluripotentes da medula óssea e do músculo esquelético, células estaminais somáticas e células progenitoras residentes no coração, são também utilizadas nas terapêuticas com células pluripotentes [2, 8-14].

3. Terapêutica

A medicina regenerativa cardiovascular tem como principal objetivo desenvolver novas estratégias terapêuticas capazes de regenerar o funcionamento do músculo cardíaco após um episódio de falência cardiovascular. A principal estratégia passa pelo transplante de células com capacidade proliferativa e de diferenciação. Existem varias vias para fazer chegar estas células ao coração: elas podem ser entregues por injeção intramiocárdica, injeção intraventricular, via intravenosa, via intracoronária ou até por transplante de tecido gerado por engenharia celular. As vias intracoronária e intramiocárdica assumem-se como as mais utilizadas nos ensaios clínicos em humanos, sendo a intracoronária a via de eleição,

apresentando vantagens em relação à via intramiocárdica pois, é menos complexa, mais barata e apresenta maior utilidade.

Após o enfarte, as células do miocárdio vão secretar moléculas pró-inflamatórias (*interleukin (IL)-1 β* , *interleukin (IL)-8*, *tumor necrosis factor (TNF)- α*) responsáveis pela ativação e migração de neutrófilos para a zona afetada. Entre 4 a 12 horas após início da morte celular, o tecido miocárdico afetado começa a sofrer necrose isquêmica, caracterizada por inchaço celular, desagregação de organelos e desnaturação de proteínas. Após cerca de 18 horas, os neutrófilos entram na zona do enfarte. O seu número atinge um pico após cerca de 5 dias, e em seguida, diminuem. Após 3-4 dias, aparece nas bordas da zona do enfarte o tecido de granulação composto por fibroblastos e fagócitos, estes últimos responsáveis por fagocitarem material necrosado mas também constituem o processo inflamatório. O intervalo de tempo entre a ocorrência do enfarte agudo do miocárdio e o início da terapêutica celular difere entre ensaios clínicos, acreditando-se que, iniciar a terapêutica, dentro da janela temporal de 5 a 30 dias após o enfarte traz maiores benefícios para os doentes (maior fração de ejeção ventricular esquerda e diminuição da área de tecido afetada) em comparação com estratégias com administração celular mais precoce. Este intervalo temporal após o enfarte tem como objetivo permitir a eliminação do plasma das moléculas pró-inflamatórias e inflamatórias acima referidas, características do pós-enfarte e que podem influenciar as terapêuticas celulares instituídas[1, 15].

Para que as estratégias celulares produzam efeitos terapêuticos, as células têm de se fixar nos tecidos alvo, aderir e migrar através do endotélio e finalmente invadir o miocárdio lesado[16]. Após o enfarte o micro ambiente do tecido cardíaco varia entre fases de inflamação e de cura levando à expressão de citocinas cardíacas que promovem a migração e a fixação de células estaminais. Estas vão secretar outras substâncias com efeitos parácrinos (*transforming growth factor (TGF)- β* , *interleukin (IL)-6*, *vascular endothelial growth factor (VEGF)*, *fibroblast growth factor (FGF)-2*, *insulin-like growth factor (IGF)*, *angiopoietin (Ang)-1*, *stromal cell-derived factor (SDF)-1*, *matrix metalloproteinase (MMP)-9*, entre outros) que são plausíveis de possuírem efeitos terapêuticos na promoção da angiogênese, proliferação endógena de células vasculares, diminuição da matriz fibrótica extracelular, diminuição da apoptose de cardiomiócitos e regulação da resposta inflamatória[17-19].

Aliada aos efeitos da sinalização parácrina, está a capacidade das células estaminais se diferenciarem em células miocárdicas funcionais, pois a suplementação do miocárdio com células estaminais exógenas pode resultar num enxerto de tecido constituído por

cardiomiócitos funcionais com capacidade contráctil sincronizada com as células já existentes. As células estaminais podem também diferenciar-se em células endoteliais vasculares contribuindo para a revascularização da zona afetada. Este restabelecimento dos cardiomiócitos perdidos e o aumento da vascularização na zona da lesão vão contribuir para evitar ocorrência de novos danos no tecido cardíaco, devido à isquemia, e melhorar a função cardíaca[20].

4. Métodos de medição dos parâmetros terapêuticos

A medição dos parâmetros terapêuticos é uma parte integrante de todos os ensaios clínicos e assume uma fulcral importância, pois se estes parâmetros não forem bem medidos ou calculados com um método menos apropriado, podem surgir resultados falseados que não traduzem o que se passou no ensaio clínico.

Na medição da eficácia da terapêutica cardíaca regenerativa no Homem, a maior questão, está relacionada com a grande diversidade de parâmetros que necessitam ser medidos. Respeitante à eficácia, o principal parâmetro é a ejeção ventricular que pode ser determinada recorrendo a uma ecocardiografia transtorácica (ETT), uma tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) ou uma ressonância magnética cardíaca. De igual modo, a medição da área afetada pelo enfarte pode ser medida por SPECT ou por cMRI, enquanto que para medir a viabilidade do miocárdio são utilizados métodos muito diferentes como a cintilografia de perfusão do miocárdio, tomografia de emissão de positrões (PET) e mapeamento endocardial tridimensional eletromecânico (tecnologia Noga[®]). O processo de administração celular também influencia o tipo de método utilizado na medição dos resultados. Por exemplo a administração celular intramiocardial percutânea difere bastante da transferência celular intracoronária, sendo desta forma necessário um método padronizado de análise imagiológica e quantitativa da área de miocárdio tratada. Ainda que, muitos destes métodos tenham sido realizados em massa nos ensaios clínicos envolvendo animais (PET, SPECT, cMRI e 3D Noga[®]) carecem de uma padronização com o intuito de serem aplicados nos ensaios envolvendo participantes humanos.

Na América do Norte, com o intuito de superar os problemas relacionados com a heterogeneidade dos doentes nos estudos e com vista à padronização dos métodos de preparação de amostras celulares e métodos de medição de resultados, foi criado pelo *National Heart Lung and Blood Institute (NHLBI)* o *Cardiovascular Cell Therapy Research Network*

(CCTRN) constituído por 5 centros clínicos responsáveis por organizar ensaios clínicos de fase I/II baseados na terapia celular cardíaca. Na Europa, está em andamento um estudo de fase III chamado BAMl (*The Effect of Intracoronary Reinfusion of Bone Marrow-derived Mononuclear Cells (BM-MNC) on All Cause Mortality in Acute Myocardial Infarction*), (Identificação *clinical trial gov*: NCT01569178) baseado na terapêutica celular cardíaca em doentes com enfarte do miocárdio com fração de ejeção ventricular esquerda diminuída e após reperfusão coronária arterial. Neste estudo são administradas células progenitoras autólogas originárias da medula óssea por infusão intracoronária. Este estudo, patrocinado pela EU, está em execução em países como Espanha, Inglaterra, Alemanha, Finlândia, Dinamarca, entre outros, não sendo prevista a sua execução no nosso país. Tem como objetivo a inclusão de 3000 doentes e o seu término está programado para o ano de 2017[1, 2].

5. Ensaios pré-clínicos

A aliança milenar que a experimentação animal tem com a evolução científica também aqui foi preponderante, pois foi graças aos bons resultados alcançados nos inúmeros estudos realizados em modelos animais que foi possível avançar tão rapidamente para estudos em humanos.

Várias espécies de animais foram utilizados nestes estudos, desde pequenos roedores, até animais de maior porte como os coelhos e até omnívoros como o porco. Diversos tipos de células foram utilizadas pelos diferentes investigadores, em 2001, *Orlic et al.* transplantou para modelos de enfarte de miocárdio em ratos, células c-Kit⁺ que são células progenitoras endoteliais (EPCs) derivadas da medula óssea que expressam na sua superfície um recetor tirosina quinase (também conhecido por CD117). Este, após se conjugar com o seu ligando sofre autofosforilação que é um pré-requisito para que haja efluxo de EPCs da medula óssea. *Orlic et al.* denotou a formação de novos cardiomiócitos e regeneração miocárdica, a revelação destes resultados desencadeou a realização de inúmeros ensaios clínicos utilizando células derivadas da medula óssea, porém estes resultados obtidos por *Orlic et al.* acabaram por ser postos em causa por outros grupos de investigadores que utilizaram métodos mais sensíveis para detetar a diferenciação celular[2]. Células estaminais de origem embrionária também foram testadas em modelos de roedores, onde a função miocárdica foi melhorada embora de modo temporário e o aparecimento de

teratomas (um tipo de tumor de células estaminais derivado de células pluripotentes e constituído de elementos de diferentes tipos de tecido de uma ou mais das três camadas de células germinais) resultantes desta terapêutica foi também um dos fatores que levou a que não se realizassem maior número de ensaios com este tipo de células.

Células estaminais mesenquimais foram uma das populações de células mais estudadas e pode dividir-se em duas grandes subpopulações, as células estaminais mesenquimais derivadas da medula óssea e as células estaminais mesenquimais derivadas do tecido adiposo. Ambos tipos de células apresentam uma infinidade de estudos clínicos realizados onde foram obtidos resultados animadores. *Kamita et al.* demonstrou que a injeção intramiocardial de células estaminais mesenquimais derivadas da medula óssea (bMSC) em modelos de rato, levou a uma melhoria global no fluxo sanguíneo e aumento da densidade capilar da zona afetada pela isquemia, traduzindo-se num aumento da fração de ejeção do ventrículo esquerdo[22].

O tecido adiposo é uma das fontes utilizadas para obtenção de células estaminais que vem sendo muito usada uma vez que, em comparação com os restantes locais de proveniência destas células, apresenta vantagens por a obtenção das células é mais simples, menos invasiva; causa menos transtorno e lesões ao dador; é mais rentável pois recorrendo a uma simples lipoaspiração conseguimos obter uma considerável quantidade de células; o tecido adiposo é abundante na maioria das pessoas e apresenta maior concentração de células estaminais do que a medula óssea numa razão de 5% para 0.01%[23]. Estes fatores levaram à realização de inúmeros estudos utilizando este tipo de células, sendo que o primeiro, realizado por *Yamada et al.* no ano de 2006 foi o ponto de partida para que, até 2013, fossem publicados mais 38 estudos em modelos animais descrevendo os efeitos das células estaminais derivadas do tecido adiposo (*adipose tissue derived stem cells, ASCs*) na terapêutica pós enfarte agudo do miocárdio (em modelos animais). Em nove estudos foram usados animais imunodeficientes verificando-se uma redução do tamanho do enfarte em 89%, melhoria na fração de ejeção ventricular esquerda em 90% e aumento da vascularização na zona afetada em 100% dos estudos. Nos restantes 30 estudos foram utilizados animais imunocompetentes, fazendo com que os resultados sejam um pouco diferentes: os estudos efetuados em modelos de pequenos animais apenas 47% destes apresentaram uma significativa redução do tamanho do enfarte, 61% demonstraram melhoria na fração de ejeção ventricular e apenas 56% exibiram aumento da vascularização da zona afetada[12].

A descoberta das células progenitoras endoteliais (*endotelial progenitor cells*, EPCs) também conhecidas por células mononucleares CD34+ (antigénio de superfície) forneceu a possibilidade de explorar as estas células como uma poderosa ferramenta para terapia vascular. Vários autores encontraram evidências de regeneração vascular após injeção com EPCs. Um deles, e pioneiro, foi *Asahara et al.* [24] que usou ratinhos nus atímicos, submeteu-os a uma excisão da artéria femoral e foram injetados com CD34+ MNCs marcadas com um indicador fluorescente. Estas células marcadas foram, posteriormente, localizadas nos capilares sanguíneos locais onde teria ocorrido neovascularização. Inúmeros outros estudos se sucederam que corroboraram estes resultados alcançados por *Asahara et al.* [11].

6. Ensaios clínicos

Tendo em conta a reprodutibilidade dos resultados obtidos em modelos animais e depois de aperfeiçoadas todas as técnicas envolvidas nos processos envolvidos neste tipo de terapêuticas, estas começaram a ser testadas em humanos. Porém os resultados obtidos nos ensaios clínicos de terapia celular cardíaca demonstraram um sucesso moderado quando comparados com os anteriores estudos efetuados em modelos animais. No cerne destas discrepâncias estão as diferenças nos modelos de enfarte agudo do miocárdio (nos roedores é um modelo de peito aberto com oclusão coronária crónica enquanto que, nos humanos é EAM com reperfusão), a forma de administração das células estaminais (que nos roedores foi feita por injeção intramiocardial ou intravenosa e no Homem foi percutânea, intracoronária ou por administração intramiocardial), a origem das células implantadas (células alogénicas ou heterogénicas no lugar de autólogas nos roedores requerendo dessa forma, potente tratamento prévio imunossupressor ou uso de animais geneticamente modificados enquanto que são utilizadas células autólogas nos humanos) e o número de células administradas a ambas as espécies (a razão entre o número de células administradas e o peso da espécie é menor no humano)[1].

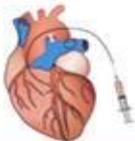
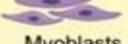
Stem cell origin/ percutaneous delivery route		Intracoronary	Percutaneous intramyocardial	Coronary sinus
				
BM-origin SC	 Mononuclear	Strauer et al ²¹ , Topcare-AMI ¹¹ , Repair-AMI ⁶³ , BOOST ⁶⁴ , TCT-STAMI ⁶⁵ , ASTAMI ⁶⁶ , FINCELL ⁶⁷ , DanCell-CHF ⁶⁸ , BONAMI ⁶⁹ , CELLWAVE ⁷⁰ , HEBE ⁷¹ , LATE TIME ⁷² , MySTAR ⁷³	PROTECT-CAD ⁷⁴ , MYSTAR ⁷³	NA
	CD 34	REGENT ²¹	Losordo et al ⁷⁵	NA
	CD 133	Bartunek et al ²⁸ , COMPARE AMI ⁷⁶	NA	NA
	 Mesenchymal	Chen et al ⁷⁷ , RELIEF ³⁷ (ongoing)	POSEIDON ⁴⁰ , MSC-HF ⁷⁸ , TAC—HFT ³⁸	NA
 Adipose-derived stem cells	ADVANCE ⁷⁹ , APOLLO ⁴⁷	PRECISE ⁴⁸	NA	
 Endometrial regenerative cells		NA	RECOVER-ERC ⁶⁰ (ongoing)	
 Circulating peripheral blood endothelial progenitor cells G-CSF mobilized	Choi et al ⁸⁰ , Li et al ²⁴ , MAGIC ²⁵ , TOPCARE-AMI ²⁷ , TOPCARE-CHD ³⁰	NA	NA	
 Multipotent Cardiac Stem cells	SCPIO ⁵⁵	NA	NA	
 Cardiosphere-derived cells	CADUCEUS ⁵⁶ , ALLSTAR ⁵⁷ (ongoing)	NA	NA	
 Myoblasts	NA	CauSMIC ⁸¹ , Smits et al ¹¹	NA	
 Phenotypically modified	NA	C-CURE ⁸²	NA	
 Allogenic	NA	POSEIDON ⁴⁰	NA	

Fig. 1- Tipos de células e vias de administração nos ensaios clínicos em humanos. Retirado de Pavo et al.[1].

6.1. Estudos e resultados

Na ansia de encontrar a melhor terapêutica foram realizados bastantes ensaios clínicos em vários tipos celulares. O estudo de fase II aberto e randomizado SEISMIC (*Safety and Effects of Implanted Skeletal Myoblasts Using an Injection Catheter*) transplantou mioblastos para o miocárdio de 40 doentes insuficientes cardíacos de ambos os sexos com idades compreendidas entre os 18 e os 75 anos. Não foram obtidas melhorias na fração de ejeção ventricular porém houve uma melhoria no teste da caminhada de 6 minutos que mede a distância que um doente pode andar rapidamente sobre uma superfície plana, rígida num período de 6 minutos, avaliando as respostas globais e integradas de todos os sistemas envolvidos durante o exercício, incluindo os sistemas pulmonares e cardiovasculares, circulação sistêmica, circulação periférica, unidades neuromusculares e metabolismo muscular[25]. Todavia os resultados negativos e os problemas relacionados com a saúde dos participantes nos ensaios fizeram com que, a via terapêutica com mioblastos fosse cada vez menos estudada.

Células mononucleares não fracionadas originárias da medula óssea são o tipo celular mais utilizado em estudos. No REPAIR-AIM (*Reinfusion of Enriched Progenitor cells And Infarct Remodelling in Acute Myocardial Infarction*), (maior estudo de terapia celular cardíaca efetuado até hoje), multicêntrico com dupla ocultação, as BMMNCs foram infundidas intracoronariamente após intervenção coronária percutânea em 204 doentes, com enfarte agudo do miocárdio, de ambos os sexos e com idades que iam dos 18 aos 80 anos. Os resultados foram positivos, tendo-se observado 4 meses depois uma melhoria absoluta na fração de ejeção ventricular nos doentes tratados com BMMNCs em comparação com grupo controlo (5.5% vs. 3.0%; $p=0.01$). Retirou-se ainda a elação de que a melhoria foi mais acentuada nos doentes que tinham a pior fração de ejeção ventricular antes da administração celular[26]. Outro estudo também com infusão de BMMNCs chamado BOOST (*Bone Marrow Transfer to Enhance ST-Elevation Infarct Regeneration*) englobou 40 doentes dos dois sexos, com doença coronária e com idade superior a 18 anos. Foi alcançada relativa melhoria significativa na fração de ejeção ventricular após 6 meses; porém insignificante aos 18 meses. No geral, os ensaios clínicos usando BMMNCs apresentam modestos resultados de melhoria da função ventricular como resultado da diminuição do tamanho da área afetada e remodelação celular. A terapêutica com este tipo de células apresenta também, comparando com os que receberam placebo, menos ocorrência de situações clínicas incluindo enfarte do miocárdio recorrente, trombozes e até mesmo a morte[21].

No estudo TOPCARE-CHD (*Transplantation of Progenitor Cells and Recovery of LV Function in Patients with Chronic Ischemic Heart Disease*), aleatório e cruzado, 121 doentes (de ambos os sexos e com mais de 18 anos) apresentando cardiomiopatia de dilatação sem isquemia foram tratados com aproximadamente 200 milhões de BMMNCs observando-se, a 3 meses, uma modesta melhoria na fração de ejeção ventricular de $3.7 \pm 4\%$. Este estudo avaliou também outro tipo de células, chamadas células progenitoras endoteliais (EPCs). Vinte e quatro doentes receberam EPCs, 28 foram administrados com BMMNCs e 23 constituíram o grupo controlo, sendo que, os que obtiveram uma melhoria mais significativa da fração de ejeção ventricular foram os doentes que receberam a infusão de BMMNCs[27].

Para além da obtenção de melhorias na fração de ejeção ventricular, as EPCs têm também influência na angiogênese. *Erbs et al.* estudou o efeito destas células em doentes submetidos a recanalização da obstrução coronária total crónica. Foi um estudo randomizado com dupla ocultação onde 26 doentes (dos dois sexos e com idade média de 62 anos) foram divididos entre grupo terapêutico e grupo controlo (recebe infusão sem conteúdo celular). A infusão intracoronária de EPCs resultou num aumento do fluxo sanguíneo coronário de 43% (comparando com valores do grupo controlo e prévios à infusão), numa redução do tamanho da área afetada pelo enfarte em 16% e ainda num aumento de 14% da fração de ejeção ventricular esquerda no grupo que recebeu a terapêutica celular[28].

As células estaminais mesenquimais também têm sido utilizadas no tratamento de doentes cardíacos. O ensaio clínico POSEIDON (*Percutaneous Stem Cell Injection Delivery Effects on Neomyogenesis*) de fase I/II randomizado permitiu comparar se as MSCs de origem alogénica seriam tão seguras e eficazes como as MSCs de origem autóloga numa amostra de 30 doentes de ambos os sexos, com idades entre os 21 e os 90 anos e apresentando disfunção ventricular esquerda resultante de doença cardíaca isquémica. Quinze doentes receberam MSCs alogénicas e os restantes 15 MSCs autólogas. Vinte milhões, 100 milhões e 200 milhões de células foram administradas a cada 5 doentes por grupo celular e por nível de dosagem, sendo entregues por via de injeção transendocardial em 10 locais no interior do ventrículo esquerdo. Em um ano a incidência de efeitos adversos graves foi de 33.3% no grupo administrado de alogénicas e 53.3% no grupo que recebeu células autólogas. Foi demonstrado que as dosagens celulares mais baixas (20 milhões de células) produziram grandes reduções no volume ventricular esquerdo e contribuíram para o aumento da fração de ejeção[29].

O ensaio clínico APOLLO (*Adipose-derived Stem cells in the Treatment of Patients with ST-elevation Myocardial Infarction*) foi realizado tendo como arma terapêutica um outro tipo de células mesenquimais, as células regenerativas originárias do tecido adiposo (ASCs ou ADRCs). Foi um ensaio de fase I/IIa randomizado com dupla ocultação e um grupo placebo. Englobou 14 doentes de ambos os sexos com idades entre os 20 e os 80 anos e teve como objetivo determinar a segurança e viabilidade da infusão intracoronária de ASCs no tratamento de doentes na fase aguda de uma significativa elevação do segmento ST com enfarte agudo do miocárdio. O resultados demonstraram uma melhoria de 4% na fração de ejeção ventricular esquerda nos doentes tratados com ASCs, enquanto que no grupo placebo houve uma deterioração de -1.7%. A percentagem de ventrículo esquerdo afetado foi reduzida 52% no grupo administrado de ASCs e ficou inalterada no grupo placebo. O defeito de perfusão foi também diminuído no grupo celular (de 16.9% para 10.9%) tendo piorado no grupo placebo (de 15% para 16.8%)[30].

Também foram realizados estudos que demonstraram que as células progenitoras cardíacas c-kit⁺ podiam ser isoladas a partir de tecido cardíaco humano e posteriormente clonadas e expandidas *in vitro* até obtenção de células suficientes para utilização na terapêutica celular[31,32].

Um destes ensaios foi o CADUCEUS (*Cardiosphere-Derived Autologous Stem Cells to Reverse Ventricular Dysfunction*), no qual foram injetadas cardioesferas autólogas (pequena população de células c-Kit⁺/lin⁻ mas também outros tipo de células progenitoras tais como CD105⁺ e CD90⁺) na artéria coronária afetada de 31 doentes (de ambos os sexos e idades compreendidas entre 18 e 80 anos) algumas semanas após a ocorrência do enfarte de miocárdio. Após 6 meses, os investigadores constataram um grande aumento do miocárdio viável e um pequeno efeito na fração de ejeção que apenas melhorou de 38.8% para 41.2%[31].

No ensaio SCIPIO (*Cardiac Stem Cell Infusion in Patients with Ischemic Cardiomyopathy*) foram testadas as células c-Kit⁺/lin⁻ autólogas que após isolamento a partir do apêndice atrial direito foram ampliadas *ex vivo* e injetadas por infusão intracoronária alguns meses após ser aplicado o *bypass* na artéria coronária afetada de 33 doentes de ambos os sexos com idades entre 18 e 75 anos que sofriam de insuficiência cardíaca congestiva. Os resultados a 4 meses demonstraram melhorias significativas no funcionamento do ventrículo esquerdo e redução da área afetada pelo enfarte. Após 8 meses e até um ano, estes resultados tornaram-se ainda mais relevantes com uma impressionante melhoria de 13.6% na fração de ejeção ventricular esquerda acompanhada de um aumento da massa ventricular esquerda viável[32]. Embora

estes resultados sejam entusiasmantes e promissores, precisam de ser testados em maior escala, em ensaios clínicos com maior número de participantes.

7. Acompanhamento do doente

As terapêuticas cardíacas regenerativas utilizando células estaminais necessitam de um acompanhamento ao longo dos anos, pois, sem que nada aponte para tal, pode ocorrer uma perda do efeito positivo inicial da terapêutica de regeneração do miocárdio[33].

Até hoje poucos foram os estudos que realizaram este acompanhamento ao longo dos anos: o ensaio BOOST com acompanhamento de 5 anos[21], o REPAIR-AMI com 3 anos de seguimento[26], o estudo TOPCARE-AMI também com 5 anos de acompanhamento[27], entre outros.

8. Perspetivas futuras

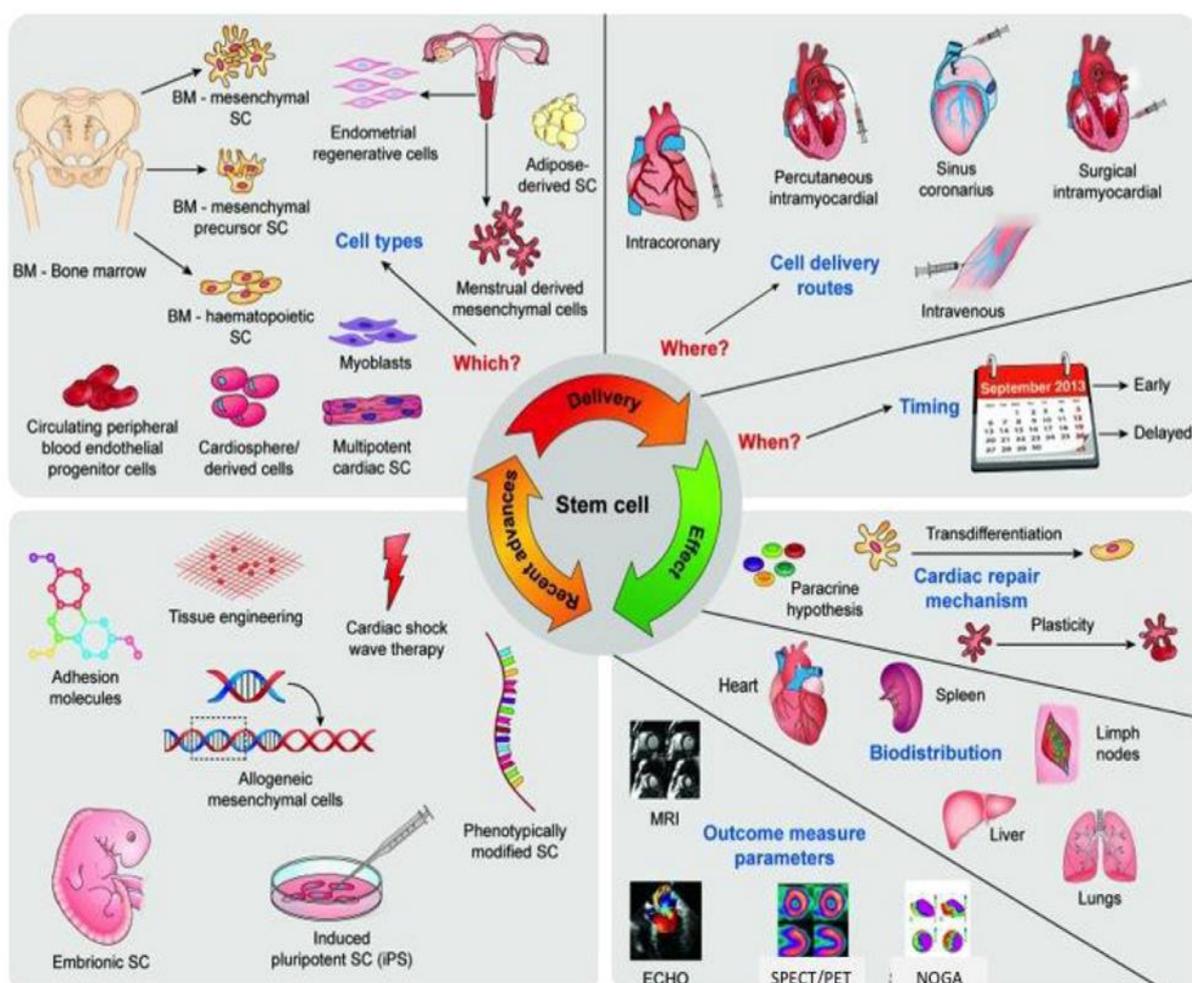


Fig. 2 - Questões e perspetivas da terapêutica celular cardíaca. Retirado de Pavo et al. [1].

8.1. Novos tipos celulares

Com o objetivo de melhorar a eficácia das terapêuticas regenerativas há um conjunto de estratégias e métodos inovadores que têm vindo a ser postos em prática.

As células estaminais de origem embrionária apresentam uma grande capacidade de proliferação podendo representar potenciais armas terapêuticas. Porém carecem de dados experimentais suficientes no que diz respeito à terapêutica cardíaca, estando a ser utilizadas noutros tipos de terapias como é o caso dos tratamentos de fertilidade (*Derivation of New Human Embryonic Stem Cell Lines Lines for Clinical Use*, NCT00353197).

A compreensão profunda do modo como as diferentes terapêuticas celulares atuam continua a ser o principal objetivo dos investigadores. As células estaminais pluripotentes induzidas podem ser geradas a partir de todo o tipo de células somáticas adultas e possuem grande facilidade de expansão quando cultivadas em meio celular porém, quando injetadas em modelos animais foram registados episódios de rejeição celular nos animais onde não houve imunossupressão prévia[1].

8.2. Células estaminais fenotipicamente modificadas

Os resultados promissores com células estaminais não modificadas obtidos pelos inúmeros ensaios clínicos realizados são uma realidade, porém existe a possibilidade de melhorar as características regenerativas destas células através de modificações fenotípicas. A análise genómica permite identificar fatores críticos na regulação do processo de diferenciação cardíaca celular. O ensaio clínico C-CURE (*Cardiopoietic Stem Cell Therapy in Heart Failure*) utilizou MSCs pré tratadas *in vitro* com um *cocktail* cardiogénico antes de serem injetadas intramiocardialmente em certas zonas de disfunção ventricular. Participaram 240 doente de ambos os sexos com idades compreendidas entre 18 e 75 anos. Foram obtidas melhorias na fração de ejeção ventricular esquerda, diminuição do tamanho do ventrículo esquerdo pós-sístole e maior tolerância ao exercício medidos pela caminhada de 6 minutos[34].

8.3. Terapia cardíaca com pulsos elétricos

A fundamentação desta estratégia terapêutica assenta no facto de pulsos elétricos extracorporais direcionados ao ventrículo esquerdo (mais propriamente para a parede ventricular anterior), desencadearem a libertação de um fator quimiotático muito potente

no processo de implantação de células estaminais (*cardiac stromal-derived factor-1*). Visto isto, o ensaio clínico CELLWAVE (*Combined Extracorporeal Shock Wave Therapy and Intracoronary Cell Therapy in Chronic Ischemic Myocardium*) dividiu aleatoriamente os 103 participantes (de ambos os sexos e idades entre os 18 e 80 anos) com falência cardíaca crônica em dois grupos. Ambos iriam receber os “shocks” elétricos, seguindo-se a administração intracoronária de BMMNCs autólogas a um grupo e placebo a outro. Os resultados demonstram aumento na fração de ejeção ventricular esquerda no grupo que recebeu os “shocks” + BMMNCs em comparação com o grupo “shocks” + placebo (3.2% vs 1.0% respetivamente) e ainda melhorias na espessura da parede miocárdica e redução da ocorrência de eventos cardíacos no grupo de doentes em estudo[35].

8.4. Engenharia de tecidos

A engenharia de tecidos tem como objetivo produzir materiais porosos e biodegradáveis onde seja possível integrar células e/ou nutrientes necessários a estas, com a finalidade de serem administradas à superfície do miocárdio, em regiões afetadas pelo enfarte ou por via intracoronária e intramiocárdica. Estes tecidos sintéticos apresentam vantagens, nomeadamente, uma produção facilmente reprodutível com preços relativamente acessíveis porém, os possíveis acontecimentos adversos fazem com que esta estratégia necessite de maior desenvolvimento, uma vez que, comparando com os tecidos de origem natural, os de origem sintética apresentam grande bio incompatibilidade que leva ao desenvolvimento de processos inflamatórios[1].

8.5. Sinalização Parácrina

Vários estudos providenciam evidências de que a libertação, por intermédio das células utilizadas nas terapêuticas celulares, de fatores com efeito parácrino, tem impacto na regulação de eventos celulares cardíacos como a apoptose, neovascularização, fibrose e até no recrutamento, diferenciação e fixação de células cardíacas endógenas. Por exemplo, está demonstrado em inúmeros estudos que, as MSCs excretam vários fatores com eficácia terapêutica no tratamento do enfarte do miocárdio. São eles: *activin A*, *epiregulin*, *endothelin*, *glypican-3*, *insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP)-7*, *lipoprotein receptor-related protein (LRP)-6*, *osteoprotegerin*, *secreted frizzled-related protein (sFRP)-4*, *Smad4/7*, *thrombospondin-1*,

tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1/2, vascular endothelial growth factor (VEGF), insulin-like growth factor (IGF)-1 e vários outros fatores de crescimento [17,18].

O benefício, aparentemente, indireto destes fatores, quer na regeneração quer na neovascularização do miocárdio afetado, assume grande importância uma vez que, só por si, a diferenciação das células injetadas em novos cardiomiócitos, é insuficiente para alcançar os resultados observados nos vários ensaios clínicos efetuados ao longo dos anos.

O futuro passará por estudar e entender melhor estes fatores envolvido na sinalização parácrina de modo a conseguir tirar o maior proveito de cada fator, e quem sabe, criar, a partir deles, um medicamento ou uma terapêutica, acessível a todos os doentes, com a finalidade de regenerar o tecido cardíaco[1].

9. Conclusões

Grandes avanços foram alcançados desde que se iniciou a pesquisa e o estudo das células estaminais como arma terapêutica com vista à regeneração do tecido cardíaco. Olhando o passado conseguimos ter uma perceção das dúvidas e questões que foram esclarecidas ao longo das inúmeras investigações, por outro lado, se olharmos o presente e o futuro ficamos com a ideia que imensas questões continuam ainda hoje sem resposta.

Há, atualmente, o reconhecimento que a mesma terapêutica celular tem diferentes resultados em diferentes doentes, traduzindo-se na necessidade de estabelecimento de orientações precisas acerca da forma como são escolhidos os doentes para integração dos ensaios clínicos, bem como a escolha do tipo de célula e a via de administração mais adequada a cada um, de modo a caminhar para uma individualização da terapêutica celular cardíaca.

À medida que novos ensaios vão sendo realizados, novos dados são acrescentados ao estudo desta temática, sempre com o entusiasmo e a esperança de que um dia, a regeneração cardíaca utilizando terapêuticas celulares seja implementada em grande escala e não só em ensaios clínicos. Para que isto aconteça deveriam ser realizados estudos abrangendo um maior número de doentes, com períodos de acompanhamento mais longos de modo a conseguirmos obter resultados verdadeiramente conclusivos acerca da terapêutica instituída. Apostar na realização de ensaios tendo em conta as novas perspetivas terapêuticas, objectivando o desenvolvimento da terapêutica recorrendo à engenharia tecidual e aos fatores quimiotáticos responsáveis pela sinalização parácrina, com a finalidade de criar um potente e eficaz produto celular.

10. Bibliografia

1. Pavo, N., et al., *Cell therapy for human ischemic heart diseases: critical review and summary of the clinical experiences*. J Mol Cell Cardiol, 2014. **75**: p. 12-24.
2. Yi, B.A., O. Wernet, and K.R. Chien, *Pregenerative medicine: developmental paradigms in the biology of cardiovascular regeneration*. J Clin Invest, 2010. **120**(1): p. 20-8.
3. WHO, *Global status report on noncommunicable diseases 2014*. 2014.
4. DGS, *Doenças Cérebro-Cardiovasculares em números*. 2014.
5. Go, A.S., et al., *Executive summary: heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association*. Circulation, 2013. **127**(1): p. 143-52.
6. Mazo, M., et al., *Adipose-derived stem cells for myocardial infarction*. J Cardiovasc Transl Res, 2011. **4**(2): p. 145-53.
7. Shah, K., *Encapsulated stem cells for cancer therapy*. Biomatter, 2013. **3**(1).
8. Matsuzaki, Y., et al., *Unexpectedly efficient homing capacity of purified murine hematopoietic stem cells*. Immunity, 2004. **20**(1): p. 87-93.
9. Pittenger, M.F. and B.J. Martin, *Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics*. Circ Res, 2004. **95**(1): p. 9-20.
10. Assmus, B., et al., *Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI)*. Circulation, 2002. **106**(24): p. 3009-17.
11. Miller-Kasprzak, E. and P.P. Jagodzinski, *Endothelial progenitor cells as a new agent contributing to vascular repair*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2007. **55**(4): p. 247-59.
12. Naaijken, B.A., et al., *Therapeutic application of adipose derived stem cells in acute myocardial infarction: lessons from animal models*. Stem Cell Rev, 2014. **10**(3): p. 389-98.
13. Jiang, Y., et al., *Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain*. Exp Hematol, 2002. **30**(8): p. 896-904.
14. Kogler, G., et al., *A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential*. J Exp Med, 2004. **200**(2): p. 123-35.
15. Schachinger, V., et al., *Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction*. N Engl J Med, 2006. **355**(12): p. 1210-21.
16. Mummery, C.L., R.P. Davis, and J.E. Krieger, *Challenges in using stem cells for cardiac repair*. Sci Transl Med, 2010. **2**(27): p. 27ps17.
17. Timmers, L., et al., *Human mesenchymal stem cell-conditioned medium improves cardiac function following myocardial infarction*. Stem Cell Res, 2011. **6**(3): p. 206-14.

18. Dimmeler, S., A.M. Zeiher, and M.D. Schneider, *Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair*. J Clin Invest, 2005. **115**(3): p. 572-83.
19. Li, N., et al., *Heart regeneration, stem cells, and cytokines*. Regen Med Res, 2014. **2**(1): p. 6.
20. Reejhsinghani R, S.H., Lotf AS, *Stem Cell Therapy in Acute Myocardial Infarction*. Journal of Clinical & Experimental Cardiology, 2012.
21. Young, P.P. and R. Schafer, *Cell-based therapies for cardiac disease: a cellular therapist's perspective*. Transfusion, 2015. **55**(2): p. 441-51; quiz 440.
22. Kamihata, H., et al., *Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines*. Circulation, 2001. **104**(9): p. 1046-52.
23. Fraser, J.K., et al., *Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology*. Trends Biotechnol, 2006. **24**(4): p. 150-4.
24. Asahara, T., et al., *Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis*. Science, 1997. **275**(5302): p. 964-7.
25. Duckers, H.J., et al., *Final results of a phase IIa, randomised, open-label trial to evaluate the percutaneous intramyocardial transplantation of autologous skeletal myoblasts in congestive heart failure patients: the SEISMIC trial*. EuroIntervention, 2011. **6**(7): p. 805-12.
26. Schachinger, V., et al., *Intracoronary infusion of bone marrow-derived mononuclear cells abrogates adverse left ventricular remodelling post-acute myocardial infarction: insights from the reinfusion of enriched progenitor cells and infarct remodelling in acute myocardial infarction (REPAIR-AMI) trial*. Eur J Heart Fail, 2009. **11**(10): p. 973-9.
27. Assmus, B., et al., *Transcoronary transplantation of functionally competent BMCs is associated with a decrease in natriuretic peptide serum levels and improved survival of patients with chronic postinfarction heart failure: results of the TOPCARE-CHD Registry*. Circ Res, 2007. **100**(8): p. 1234-41.
28. Erbs, S., et al., *Transplantation of blood-derived progenitor cells after recanalization of chronic coronary artery occlusion: first randomized and placebo-controlled study*. Circ Res, 2005. **97**(8): p. 756-62.
29. Hare, J.M., et al., *Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial*. JAMA, 2012. **308**(22): p. 2369-79.
30. Houtgraaf, J.H., et al., *First experience in humans using adipose tissue-derived regenerative cells in the treatment of patients with ST-segment elevation myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 2012. **59**(5): p. 539-40.

31. Makkar, R.R., et al., *Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial*. Lancet, 2012. **379**(9819): p. 895-904.
32. Chugh, A.R., et al., *Administration of cardiac stem cells in patients with ischemic cardiomyopathy: the SCIPIO trial: surgical aspects and interim analysis of myocardial function and viability by magnetic resonance*. Circulation, 2012. **126**(11 Suppl 1): p. S54-64.
33. Jeevanantham, V., et al., *Adult bone marrow cell therapy improves survival and induces long-term improvement in cardiac parameters: a systematic review and meta-analysis*. Circulation, 2012. **126**(5): p. 551-68.
34. Bartunek, J., et al., *Cardiopoietic stem cell therapy in heart failure: the C-CURE (Cardiopoietic stem Cell therapy in heart failURE) multicenter randomized trial with lineage-specified biologics*. J Am Coll Cardiol, 2013. **61**(23): p. 2329-38.
35. Assmus, B., et al., *Effect of shock wave-facilitated intracoronary cell therapy on LVEF in patients with chronic heart failure: the CELLWAVE randomized clinical trial*. JAMA, 2013. **309**(15): p. 1622-31.