

# **Novas Tecnologias na Genética Humana:**

---

## **Avanços e Impactos para a Saúde**

Maria Celeste Emerick  
Karla Bernardo Mattoso Montenegro  
Wim Degrave

**2007**

Todos os direitos reservados. É permitida a reprodução parcial desta obra desde que citada a fonte e que não seja para venda ou qualquer fim comercial.  
Tiragem 1ª edição: 2.100 exemplares

**Distribuição e informações:**

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ

Projeto Ghente/GESTEC-NIT/Vice-Presidência de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico

Av. Brasil, 4365 – Castelo Mourisco – Salas. 01,03 e 06 – Manguinhos

Rio de Janeiro – RJ – CEP: 21040-360 – Tel: (21) 38851721/1731/163-3

Email: ghente@ghente.org - Home page: <http://www.ghente.org>

Administrador e Webmaster Projeto Ghente – Leonardo Silva Leite

**Novas Tecnologias na Genética Humana: Avanços e Impactos para a Saúde**

Organização: Maria Celeste Emerick, Karla Bernardo Mattoso Montenegro e Wim Degraeve

Edição: Karla Bernardo Mattoso Montenegro

Colaboração: Leonardo Silva Leite e Marcos Lins Langenbach

Projeto Gráfico: Capa: Adriana Montenegro. Desenho e pintura, com apropriação de “O homem vitruviano”, Leonardo da Vinci.

Diagramação: Antonielle Nunes e Impressão: Edil Artes Gráficas

---

**Seminário: Células-Tronco: Possibilidades, riscos e limites no campo das terapias no Brasil (Maio de 2006)**

Realização: Projeto Ghente/GESTEC-NIT/FIOCRUZ

Apoio: DECIT e CESUPA

Comissão Organizadora: Eliane Moreira (CESUPA), Karla Bernardo M. Montenegro (FIOCRUZ), Leonardo Leite (FIOCRUZ), Marlene Braz (IFF), Maria Celeste Emerick (FIOCRUZ), Maria Helena Lino (FIOCRUZ), Wim Degraeve (FIOCRUZ)

**Seminário: Novas Tecnologias da Genética Humana: Avanços e Impactos para Saúde (Março de 2007)**

Realização: Projeto Ghente/GESTEC-NIT/FIOCRUZ

Apoio: DECIT e OPAS

Comissão Organizadora: Karla Bernardo M. Montenegro (FIOCRUZ), Leonardo Leite (FIOCRUZ), Maria Celeste Emerick (FIOCRUZ), Silvio Valle (FIOCRUZ), Wim Degraeve (FIOCRUZ)

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

N936 Novas tecnologias na genética humana : avanços e impactos para a saúde / organizadores Maria Celeste Emerick, Karla Bernardo Mattoso Montenegro [e] Wim Degraeve. – Rio de Janeiro : [GESTEC-Nit], 2007. 252 p.

Projeto Ghente/GESTEC-Nit.

1. Genoma humano. 2. Células-Tronco. 3. Farmacogenética. 4. Bioética. 5. Nanobiotecnologia. 6. Terapia gênica. 7. Biotecnologia – Patentes. I. Emerick, Maria Celeste. II. Montenegro, Karla Bernardo Mattoso. III. Degraeve, Wim.

CDD: 611.0181663

# Aplicação de células-tronco em Cardiopatias

**Hans Dohmann**

*Diretor Técnico do Centro de Ensino e Pesquisa do Hospital Pró Cardíaco*

Antes de mostrar nosso material próprio, gostaria de começar mostrando alguns dados da literatura, em humanos, que nos trazem informações relevantes.

Observando pacientes no primeiro mês pós-infarto agudo do miocárdio, temos: O paciente sofre o infarto, é internado, colhe-se sangue periférico desse paciente e se consegue observar que na primeira semana pós infarto o número de células progenitoras endoteliais circulantes, células com origem da medula óssea e que participam da neovascularização, sobem na circulação periférica. Isso nos mostra que o organismo naturalmente, fisiologicamente, sem nenhuma intervenção, de alguma forma reage ao insulto cardíaco agudo, jogando células da medula óssea na periferia. Isso é interessante porque muda a quantidade dessas células e a sua funcionalidade nesse período de tempo.

Outro dado relevante é o quimerismo observado em pacientes submetidos a transplantes cardíacos. Pacientes do sexo masculino que recebem um coração de um paciente do sexo feminino e vive bem com aquele coração, evolui bem, retoma a sua vida e, por uma infelicidade, a doença cardíaca volta a se desenvolver, ele volta a desenvolver um infarto, falece e aquele coração que era feminino vai a estudo patológico, encontramos cardiomiócitos com cromossomo Y mostrando que aquele coração que era de mulher de alguma forma foi capaz de gerar cardiomiócitos. Esse é um dado interessante. Existem outros grupos da literatura que não conseguiram reproduzir esse dado e outros grupos que reproduziram esse dado. Há uma série de considerações técnicas que poderíamos aqui fazer, mas esta é efetivamente uma informação relevante na medida em que dá, num modelo absolutamente humano, uma sugestão bastante forte de que o organismo é capaz de gerar cardiomiócitos independentemente da nossa ação injetando células ou fatores. Não só cardiomiócitos, mas, como era de se esperar, estruturas vasculares nesse coração são achadas a partir de uma formação, de uma geração própria tecidual daquele organismo.

Dentro do que foi falado, resalto que a capacidade angiogênica dessas células e a diferenciação principalmente, porque nessas células são progenitores endoteliais já conhecidos há bastante tempo, me parece algo pouco discutido durante todo esse período. E, sob o ponto de vista clínico, essa capacidade é absolutamente

fundamental, principalmente em alguns modelos especificamente onde boa parte do efeito que se espera destas células passa exatamente por esse efeito angiogênico.

Mais interessante ainda é que esse mesmo raciocínio se dá, ou pelo menos um grupo foi capaz de demonstrar isso, quando falamos de transplante de medula. Encontramos um coração com cardiomiócitos, com cromossomo Y igual ao da medula. Então, o que sugere esses estudos de quimerismo é que o organismo adulto humano é efetivamente capaz de gerar cardiomiócitos e estruturas vasculares e provavelmente a medula óssea participa, pelo menos parcialmente, desse processo. Essas informações e sugestões, eu insisto, são observações práticas de seres humanos sem nenhuma injeção de células, sem nenhuma intervenção de qualquer natureza.

Baseado num modelo animal desenvolvido pelo professor Antônio Carlos Campos de Carvalho na Universidade Federal do Rio de Janeiro – estamos falando dos anos 2000, 2001 – tivemos a oportunidade de, ao trabalhar com doença isquêmica crônica, ter a primeira experiência com insuficiência cardíaca e células de medula óssea e, hoje, posso falar com tranquilidade, do mundo. Isso foi bastante relevante porque naquele momento tínhamos o relato do uso de mioblasto pelo professor Menache, na França, alguns meses antes, e tínhamos uma discussão grande de em qual modelo iniciar esta caminhada. Uma série de considerações entram na escolha desse modelo quando não se tem uma porta para bater e perguntar, ou já se tem um caminho para pegar uma brecha e seguir. E, dentre várias discussões, acabou prevalecendo o que nos parecia eticamente naquele momento mais relevante, adequado e interessante e que acabou se juntando com as informações pré-clínicas, que foi seguir na direção de um modelo de pacientes com uma doença muito avançada, doença coronariana; esses pacientes já tinham sido submetidos a cirurgias cardíacas, já tinham feito várias angioplastias, já tinham curso de evolução grande; vários deles estavam aguardando o transplante cardíaco que é o mesmo problema que Ricardo Ribeiro dos Santos comentou no texto anterior em relação a transplante hepático. Uma minoria desses pacientes consegue chegar ao transplante cardíaco. E nesses pacientes não se tinha nada mais a fazer, não tínhamos mais o que oferecer: eles não eram mais operáveis, não havia mais como tratá-los por cateter, os remédios eram administrados nas maiores doses possíveis. Foi nessa população que demos início à experiência clínica com células de medula óssea. Para isso utilizamos um sistema de cateter. Pela gravidade dos pacientes, imaginar abrir o peito para fazer uma injeção de células era algo que na minha cabeça não fazia sentido, mas o Texas Heart Institute, junto com uma companhia, nos trouxe a possibilidade de trabalhar com esse cateter; na época não havia muita disponibilidade dele. Na época, um cateter que entrava pela aorta, ia dentro da cavidade ventricular esquerda e era capaz de buscar informações elétricas e mecânicas do que estava acontecendo ponto a ponto no ventrículo esquerdo. Sob o comando, ele é capaz de instruir uma pequena agulha, através da qual é possível

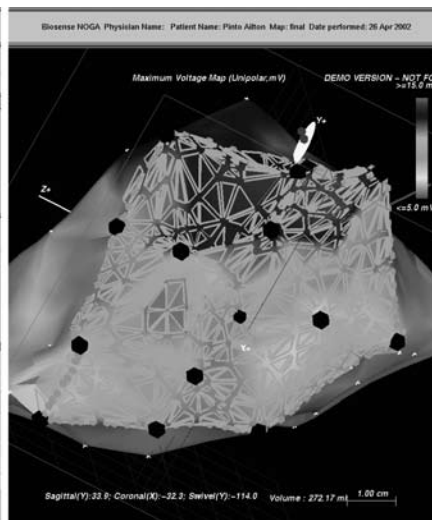
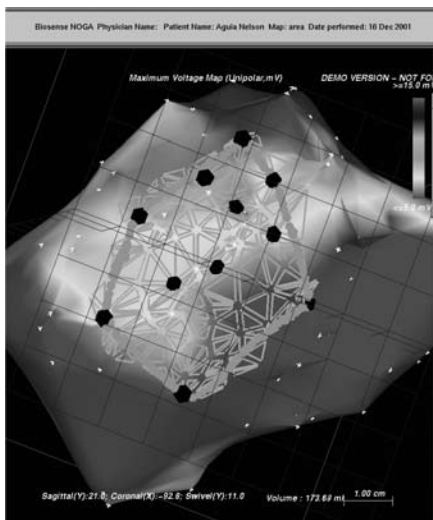
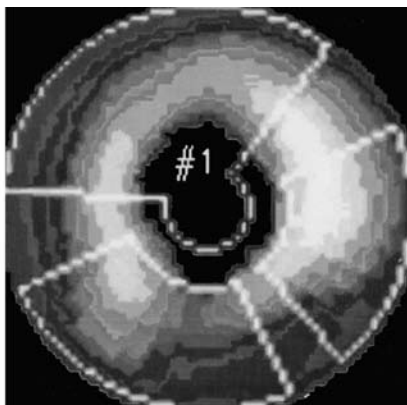
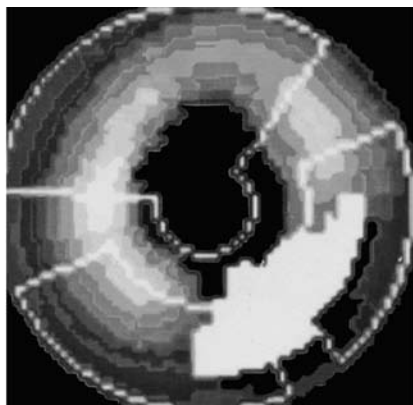
fazer a injeção direta dessas células mononucleares no músculo cardíaco, no tecido cardíaco.

O mapeamento é feito dessa forma. São obtidos pontos através dos sensores mecânicos elétricos. Vão aumentando a quantidade de pontos até que no final temos uma representação gráfica do ventrículo esquerdo; isto é, em tempo real dentro da sala de cateterismo; se eu estivesse com o console, passaria o *mouse* em cima da figura; e conseguiria ver o coração no ângulo que quisesse; uma figura tridimensional dá o recurso que normalmente dentro da sala de cateterismo não temos.

Estes pacientes receberam células de medula óssea em área de músculo vivo. Isso é absolutamente relevante porque, se pegarmos o texto entregue à CONEP em 2000, o que estava lá escrito era que o fundamento desse trabalho era em cima de angiogênese. Injetávamos essas células em músculo vivo, porém doente. É o que chamamos de miocárdio hibernante. Ele está vivo, tem condições de recuperar-se funcionalmente, mas está submetido a um processo de isquemia crônica tal que perde sua capacidade funcional e fica ali quieto esperando alguma chance de receber mais nutrientes e poder voltar a funcionar. Esse foi o principal mecanismo imaginado, termos angiogênese naquele local e com isso podemos oferecer melhor condição sanguínea naquela região e podemos recuperar essas regiões hipofuncionantes. Não fizemos a opção de injetar em área de fibrose porque os dados que o Antônio Carlos Campos de Carvalho nos mostrava sugeriam até uma possibilidade de transdiferenciação, mas mesmo que esta sugestão fosse confirmada esse era um fenômeno tão raro que não justificava fazermos uma aposta desse tipo.

Em cima dessa lógica, foram 14 pacientes tratados contra 7 controles, observamos uma melhora significativa sob o ponto de vista da classe funcional. Clinicamente avaliando os sintomas para insuficiência cardíaca e angina do peito houve uma melhora significativa no grupo tratado. O desempenho, no teste ergométrico, aumentou significativamente em Metz, em energia, eles foram capazes de despende significativamente mais energia e também consumir mais oxigênio de forma também significativa sob o ponto de vista estatístico; e no grupo controle nenhum desses parâmetros se modificou positivamente.

O mais interessante para nós era vermos a isquemia do paciente. Se queríamos angiogênese com aumento de perfusão sanguínea, queríamos reduzir a isquemia. O *software* da cintilografia mostrava-nos que esses pacientes tinham, em média, 15% do ventrículo esquerdo sob isquemia e isso cai, ao final de dois meses, para 4,5%, o que na prática clínica é um resultado pouco comum de ver. É uma redução relativa na ordem de 70%. A parte da cintilografia que avalia fibrose tem até uma diminuição absoluta do número, mas isso está longe de conseguir significância estatística, ou seja, interpretamos que não há diferença na área de fibrose, no segmento de dois meses desses pacientes.



Aqui, o *software* mostra a área de isquemia, esta área em branco. É uma isquemia ínfero-lateral do coração; uma grande área isquêmica. Essa mesma área está representada aqui pelo mapeamento mecânico. Cada ponto preto é uma área de injeção de células mononucleares de medula óssea. Dois meses depois, neste caso tivemos uma recuperação completa da isquemia. Uma resolução de 100%. E essa mesma área, então, com quatro meses, uma recuperação expressiva da atividade mecânica. O resultado sempre é dado num código de cores, sendo o vermelho ruim, então vemos que não havia nenhuma atividade mecânica na área trabalhada. O púrpura é o melhor resultado possível. Então já dá para vocês terem idéia de uma recuperação de atividade mecânica bastante expressiva neste caso, como em outros casos. Aqui, exemplo de uma parede posterior completamente parada. Um indivíduo que tinha 12% de fração de injeção; significa, na prática, que ele não concluía o seu almoço sem

parar para descansar, não tomava banho sem ajuda da esposa, coisas desse tipo só para vocês terem idéia do que estamos falando. Quatro meses depois, esta parede posterior na sua área médio basal completamente recuperada sob o ponto de vista mecânico e isso se refletiu sob o ponto de vista de qualidade de vida.

O grupo do Texas Heart já tinha feito, no Texas, e nós tínhamos feito no Brasil: uma co-relação do dado elétrico com a ressonância magnética e com a cintilografia, sob o ponto de vista da precisão desse método para identificar áreas de fibrose. Isso até nos rendeu um prêmio do Congresso Europeu em 2002. O estudo mostra que, quando a eletricidade está abaixo de sete milivolts, o grau de certeza que se tem para dizer que aquilo é fibrose é muito alto.

Este era um estudo de segurança. Hoje só contamos a história positiva porque não temos algum efeito adverso para relacionar.

Mas tivemos várias preocupações sob o ponto de vista de antecipar e identificar possíveis problemas para os pacientes.

Essas injeções são feitas aqui em áreas viáveis. No mapeamento elétrico, a área vermelha é fibrose, porque tem uma eletricidade baixa, e, quando vamos saindo do vermelho e caminhando para o colorido, temos a área viva. Estamos injetando no coração numa área viva. Uma preocupação que tínhamos – embora não houvesse dado experimental que sugerisse isso – era se não causaria fibrose, se não haveria um dano secundário à injeção. Por isso tivemos a preocupação de estudar eletricidade na área de voltagem. Queríamos saber se a eletricidade no correr do tempo diminuía secundária a essas injeções.

Quando analisamos esses dados consolidados de vários pacientes, verificamos que a voltagem na área da injeção não se alterou, o que era importante para nós; a injeção não causava nenhum malefício naquelas áreas vivas. A voltagem na área de injeção do grupo controle, também não havia nenhuma modificação e era de esperar isso na medida em que o grupo controle não foi submetido a nenhum procedimento, nem teve evento clínico significativo durante a evolução.

Quando vemos a voltagem em torno da área de injeção no grupo tratado comparado ao grupo controle, vemos um aumento significativo da voltagem. Aumentar voltagem aqui significa diminuir fibrose. Significa que em algum lugar onde havia fibrose deixou de ter.

A ordem de precisão desse mecanismo é de 0.8 milímetros. Isso nos dá um grau de precisão de informação diferente dos exames que temos hoje na prática clínica. Observamos, através desse mapeamento elétrico, que há um aumento da área viável, o que nos foi bastante provocativo, até que um paciente faleceu 11 meses após o procedimento e a família então autorizou o estudo do seu coração. O que fazemos foi comparar uma parede que não recebe célula com uma parede que recebeu tratamento celular, então é o mesmo coração, comparando a área que recebeu as células injetadas com uma área que não recebeu; e o que se vê é uma quantidade de vasos sanguíneos, não só em quantidade, mas em morfologia, completamente diferente do que se vê habitualmente.

As vezes caímos na tentação de dizer que hoje os dados não suportam tanto quanto imaginávamos no início. À questão da diferenciação miocárdica sob o ponto de vista da célula injetada direto em cardiomiócito, eu concordo em gênero, número e grau; sob o ponto de vista de que mecanismos possam desencadear um processo de cardiomiogênese, particularmente acho, por outro lado, que existem muitas sugestões fortes na literatura; e continuo acreditando que, não pela transdiferenciação direta, mas por outros mecanismos, existe, sim, a possibilidade de formação de cardiomiócitos em seres humanos.

Sei que nós, cardiologistas, passamos as últimas décadas assim; enfiamos nossas cabeças dentro das artérias coronárias, sempre achamos que a única coisa que importava era dilatar a lesão, diminuir lesão com anti-colesterol, fazer angioplastia e tenho dividido muito com os colegas que está na hora de tirarmos a cabeça aqui de dentro, olhar o que há à volta porque eventualmente o que há à volta pode ser mais interessante para os nossos pacientes do que o que está dentro das artérias.

Vejam o segmento destes pacientes. No segmento de um ano no teste ergométrico. Este resultado positivo se sustenta até um ano. Estamos concluindo o acompanhamento de quatro anos desses pacientes e posso dizer que esses resultados se sustentam, num subgrupo de pacientes que vou mostrar, até quatro anos com bastante tranquilidade; e nunca vi efeito placebo de quatro anos, já vi efeito placebo com terapia gênica de seis, oito, nove meses, mas quatro anos realmente nunca vi.

No estudo da qualidade de vida ao final de um ano, tivemos uma diferença bastante significativa entre o grupo controle e o grupo tratado. Mas o que me chama mais atenção é que, quando comparamos o grupo tratado com o grupo que é um dado geral da população norte-americana para a mesma faixa de idade – só usamos dados norte-americanos porque infelizmente no Brasil não temos esse tipo de validação – as curvas são completamente superponíveis. Quanto mais perto do centro pior a qualidade de vida, quanto mais aberto melhor a qualidade de vida. As curvas são completamente superponíveis, numa população que tinha antes uma qualidade de vida bastante limitada.

Ao contrário do paciente citado pelo Dr. Ricardo Ribeiro dos Santos, aqui aconteceu um fenômeno inverso. Que eu saiba ninguém teve filho, até porque não eram tão jovens. Mas curioso como mudou as vidas desses indivíduos; a maioria deles veio a separar-se das esposas. Não sei se isso causou algum viés na avaliação de qualidade de vida ou não, espero que não, mas é especificamente relacionado à saúde. O fato é que vários deles se sentiram confiantes de ir para a vida sem ter uma companheira ao lado. Eles eram dependentes de alguém e muitos deles acabaram se separando, voltaram a trabalhar e assumiram um ritmo de vida completamente diferente.

Um subgrupo de pacientes estavam esperando transplante cardíaco. Eles tinham um consumo de oxigênio baixo; abaixo de quatorze mililitros por quilo por minuto. Essa é a indicação precípua de transplante cardíaco. Vejam que um desses pacientes praticamente não alterou, mas os outros pacientes todos estão acima de 25 mililitros por quilo por minuto, que é o índice normal para a população que não é doente nessa



idade. Isso aqui, posso dizer-lhes que se mantém até dois anos. Eu nunca vi efeito placebo de dois anos, já disse isso, então é algo que continua nos animando muito.

Esta é uma análise mais recente. Dos 14 iniciais, vimos que alguns sustentavam melhor o resultado de isquemia especificamente e outros não. Por coincidência, foi a metade, 7 tiveram resultado sustentado da melhora de isquemia e 7 não tiveram esse resultado sustentado. Posso dizer que estes 7 que tiveram sustentabilidade do resultado ao correr do tempo são aqueles que têm quantidade e têm maior densidade das células que há muito tempo sabemos, ou pelo menos imaginamos, que têm um papel relevante, que são as células mesenquimais e os progenitores endoteliais. Aqueles 7 pacientes que tiveram maior quantidade da sua punção dessas duas categorias de células e que no mecanismo de injeção, em relação à área tratada, gerou uma densidade maior de células são esses pacientes que evoluem bem e que sustentam melhor resultado ao correr de um ano.

## **Infarto agudo do miocárdio**

Um segundo capítulo que gostaria de passar rapidamente é o do infarto agudo do miocárdio. A técnica original foi descrita pelo professor Brodstorn, na Alemanha. Eu diria que nesse capítulo a Alemanha é certamente uma liderança mundial.

Estudamos uma alternativa de injeção para essas células, não só pela artéria coronariana como também pela veia coronariana, e vimos que as duas podem ser efetivas. Para isso partimos para um trabalho clínico que envolvia 20 pacientes pela artéria coronária, 10 pela veia coronária contra 10 controles. Com *follow-up* de 6 meses de todos os pacientes Sempre uma preocupação de segurança grande, então fazemos ultra-som intra-coronariano em todos; ficamos preocupados com a possibilidade de re-estenose nesses pacientes. Aqui são dados ainda iniciais, mas, vejam, são 8 primeiros pacientes; 5 tratados contra 3 controles. Já há melhora significativa da função diastólica desses pacientes. É um trabalho estatisticamente calculado para 40, com 8 oito pacientes, 5 para um lado, 3 para outro, já vemos uma melhora diastólica significativa pelo Tissue Doppler e essa é uma constante. A diástole é sempre a primeira coisa que melhora nesses pacientes e isso tem impacto neles, é significativo.

Vemos que os grupos começam a separar-se entre o terceiro e o sexto mês. Até o terceiro mês, não observamos diferença, os pacientes seguem iguais. Mas, entre o terceiro e o sexto mês, as curvas começam a separar-se. E aqui um aumento do volume diastólico nos pacientes que não receberam célula, ou seja, o coração daqueles que não receberam célula está alargando no pós-infarto, o que é normal, enquanto os das células, não é que estejam recuperando e ficando com corações maravilhosos, mas não estão piorando no correr do tempo.

Quando vemos a fração de injeção, é a mesma coisa. Até o terceiro mês não há grandes diferenças, mas a diferença se acentua entre o terceiro e sexto mês. São poucos pacientes. É só uma tendência de significância. E ainda com poucos pacientes, mas já com alta significância quando vemos o espessamento da área enfartada;

a capacidade de aquele músculo espessar; isso é um sinal clínico importante de saúde no miocárdio naquela região. A diferença já é altamente significativa e também se dá entre o terceiro e o sexto mês. Até o terceiro mês não vemos diferença e entre o terceiro e o sexto mês abre uma grande diferença na capacidade de espessamento da área enfartada.

Tivemos oportunidade, no Laboratório de Medicina Nuclear e Imagem Molecular, de talvez ser um dos primeiros grupos do mundo, acho que com tecnécio fomos os primeiros, sob o ponto de vista de marcar essas células mononucleares injetadas para podermos ter idéia de qual a dinâmica delas no ser humano. A primeira informação relevante é que uma parte significativa dessas células vai para o coração. Isso parece pouco mas é uma informação bastante relevante. Vejam que o coração é o órgão mais marcado.

Na cintilografia de perfusão, a área de infarto é a escura. A parte clara é a parte normal, a parte escura é a afetada pelo infarto. Aqui é a marcação das células e aqui o computador junta às duas figuras. Se tivesse feito à mão, não teria sido tão preciso; nem sempre é tão preciso assim, mas em todos os casos as células não só vão para o coração, como vão especificamente para a área acometida pelo infarto, às vezes de maneira perfeita como esta, às vezes de maneira não tão perfeita, mas elas sempre vão nessa direção.

Interessante um dado da literatura do último trabalho apresentado na área de infartos. Trouxe o que há de mais recente para simplificar. Até hoje o maior trabalho publicado é um com 200 pacientes, duplo cego, alemão, do grupo do Top Care, de Frankfurt. Quero chamar atenção que eles analisam todos os pacientes, ou seja, 100 pacientes com infarto receberam tratamento com célula mononuclear, 100 não receberam, nem o médico sabia quem estava recebendo o quê, o estudo era duplo cego como manda, como deve ser. Estamos numa fase onde o estudo duplo cego é fundamental para tentar trazer um benefício para a população. Não há como dar essas respostas do ponto de vista clínico sem metodologia desse tipo e por isso, no Brasil e em todos os lugares do mundo, estão se movimentando para a realização de trabalhos duplos cegos. Vemos uma melhora significativa dos pacientes, mas as melhoras que realmente são altamente significativas são quando temos uma população que tem uma fração de injeção abaixo de 50%, aí a melhora é realmente expressiva, com alta significância e principalmente pacientes tratados com mais de cinco dias pós infarto. Alguns grupos trabalharam no dia seguinte, no terceiro dia, no segundo dia e vemos que pacientes tratados antes do quinto dia não têm um resultado significativo e pacientes tratados a partir do quinto dia têm um resultado mais significativo. Acho interessante esse achado desse grupo alemão, algo que saiu há poucos meses atrás, porque é exatamente o desenho feito para o Multicêntrico do Brasil iniciado em 2006, na área de infarto que é coordenado por nós; é exatamente esse paciente que imaginávamos e escolhemos para fazer parte desse trabalho. São pacientes com fração de injeção baixa e a injeção será feita exatamente no quinto dia, que é o último dia de internação desses pacientes. Correndo bem, ficam em torno de cinco, seis dias, por isso não botamos mais para a frente. Estamos bastante otimistas de que tenhamos acertado em cheio no desenho desse estudo e possamos ter um resultado consistente.