

ANTONILDES NASCIMENTO ASSUNÇÃO JÚNIOR

**Perfusão miocárdica quantitativa por ressonância magnética
cardiovascular na doença arterial coronariana difusa tratada
com revascularização cirúrgica associada à terapia celular:
um subestudo do MiHeart/IHD**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
doutor em Ciências

Programa de Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Rochitte

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Assunção Júnior, Antonildes Nascimento
Perfusão miocárdica quantitativa por ressonância
magnética cardiovascular na doença arterial
coronariana difusa tratada com revascularização
cirúrgica associada à terapia celular : um subestudo
do MiHeart/IHD / Antonildes Nascimento Assunção
Júnior. -- São Paulo, 2019.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Cardiologia.
Orientador: Carlos Eduardo Rochitte.

Descritores: 1.Doença da artéria coronariana
2.Isquemia miocárdica 3.Imagem de perfusão do
miocárdio 4.Revascularização miocárdica 5.Terapia
baseada em transplante de células e tecidos

USP/FM/DBD-348/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

A **Deus**, pelo dom da vida, por minha saúde e por ter sido tão essencial à essa conquista.

Aos meus amados pais, **Antonildes** e **Socorro**. Meu pai, filho de um vaqueiro no interior do Maranhão, mais uma vez prova que só a educação muda o rumo da História. Minha mãe, nosso alicerce de fé, otimismo e perseverança.

À mulher da minha vida, **Bruna**, que é mãe de outro pedaço do meu coração, meu filho **Felipe**.

Às minhas queridas irmãs, **Adriana** e **Andréa**, pelos exemplos e conselhos, que me ajudaram a seguir nessa trajetória.

Aos meus queridos avós maternos, **Francisco Pereira** (*in memoriam*) e **Catarina**, em nome de quem agradeço a toda família **Pereira** pelo carinho e amor.

Aos meus queridos avós paternos, **Olinto** (*in memoriam*) e **Morena** (*in memoriam*), em nome de quem agradeço a toda família **Assunção** pelo carinho e amor.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Eduardo Rochitte, profissional admirável, entusiasta e grande incentivador da pesquisa em Imagem Cardiovascular. Obrigado por compartilhar seus conhecimentos durante esses anos, por reacender em mim a curiosidade de um pesquisador e pelo apoio no meu estágio de pesquisa no exterior desenvolvendo essa tese.

Agradeço ao extraordinário apoio do Prof. Michael Jerosch-Herold do *Brigham and Women's Hospital* (EUA), uma das pessoas mais brilhantes que tive a oportunidade de conhecer, responsável (direta ou indiretamente) por habilidades profissionais que adquiri nos últimos anos que vão muito além desta tese de doutorado. Do ponto de vista pessoal, ganhei um amigo e um exemplo de ser humano.

Ao Prof. Dr. Raymond Kwong, diretor do serviço de Ressonância Magnética Cardiovascular no *Brigham and Women's Hospital* (EUA), agradeço pela oportunidade dessa enriquecedora experiência no exterior, assim como os aprendizados nas reuniões semanais com discussões de artigos.

Ao Dr. César Nomura, agradeço não somente pelo o enorme apoio em todos os momentos desta tese, mas também por acreditar e incentivar a pesquisa na Imagem Cardiovascular no InCor. Sabedor dos desafios da pesquisa científica no Brasil, vem viabilizando importantes projetos no InCor com grande liderança.

À Lenira, a “mãe” de todos os doutorandos do Dr. Rochitte. Meu especial agradecimento pela ajuda, incentivo e conselhos indispensáveis em todas as etapas desta tese.

À querida amiga Renata Do Val pelo apoio na finalização deste trabalho de doutorado tão desafiador. Obrigado pelos conselhos e incentivos.

Aos meus amigos da residência de Imagem Cardiovascular no InCor, que direta ou indiretamente contribuíram nessa pesquisa. Cito aqui para representá-los os amigos José de Arimatéia e Roberto Nery, companheiros de pesquisa, artes e vinhos.

A todos os médicos assistentes da Imagem Cardiovascular do InCor, mentores excepcionais, a quem devo o pouco que sei e a certeza do quanto ainda devo aprender. Cito aqui os grandes amigos Drs. Parga e Ávila, pioneiros nesta área, a quem agradeço em particular pelos conselhos e apoios não somente nesta tese, mas na minha profissão, especialmente após voltar dos Estados Unidos.

A todo o Diagnóstico por Imagem do InCor, incluindo equipe de enfermagem, biomédicos e profissionais administrativos, que muito me ensinaram e de alguma forma contribuíram neste trabalho. Cito aqui para representá-los as queridas Cristina, Jaqueline, Elma, Cida e Conceição.

Ao apoio da Gerência de Projetos do Diagnóstico por Imagem do InCor, representada por Elaine, Aline, Sandra e Rute, fundamentais nos projetos de pesquisa em Imagem Cardiovascular no InCor.

À comissão de Pós-Graduação do departamento de Cardiologia, por ter aceito e acreditado neste projeto.

Aos membros da banca de exame de qualificação Prof. Dr. Luís Henrique Gowdak, Prof. Dr. José Antonio Franchini Ramires e Prof. Dr. Otávio Rizzi Coelho-Filho, pelas preciosas sugestões oferecidas.

A todos os mestres, amigos, parceiros e colaboradores das instituições que contribuíram para a minha formação: Universidade Federal do Maranhão (UFMA), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo e *Brigham and Women's Hospital*. Em especial, gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Antonio Augusto Moura da Silva da UFMA, por ter me inoculado o vírus da estatística e epidemiologia ainda na minha graduação.

Aos amigos da “Turma 72” da UFMA, amigos eternos com quem compartilho memórias incríveis e saudades, agradeço pelo companheirismo e parceria que tornaram essa minha jornada acadêmica mais fácil.

Aos meus amigos no estágio de pesquisa nos EUA, Loic Biere (França), Tomas Vita (Argentina), Gokturk Ipek (Turquia) e Christoph Grani (Suíça), pela oportunidade única de compartilhar experiências e culturas, e sobretudo pelo apoio nas muitas horas de pós-processamento das imagens de perfusão desta tese de doutorado.

Aos pacientes e familiares que tive algum contato durante toda a minha formação, em especial, aos que participaram deste trabalho: minha eterna gratidão e respeito.

“Mede o que é mensurável e torna mensurável o que não o é.”

Galileu Galilei (1564-1642)

Normalização Adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Sumário

Lista de abreviaturas	
Lista de símbolos	
Lista de siglas	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Resumo	
<i>Abstract</i>	
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	7
2.1 Primário	8
2.2 Secundários	8
3 MÉTODOS	9
3.1 Desenho de estudo	10
3.2 Procedimentos e linha do tempo	11
3.3 Protocolo de imagem por ressonância magnética cardiovascular	12
3.4 Pós-processamento das imagens	13
3.5 Análise regional dos segmentos e desfechos	17
3.6 Análise estatística	18
4 RESULTADOS	20
4.1 Características basais dos participantes	21
4.2 Efeitos do tratamento	16
5 DISCUSSÃO	32
5.1 Limitações	38
6 CONCLUSÕES	39
7 REFERÊNCIAS	41
Apêndices	54

LISTAS

Abreviaturas

AAS	ácido acetilsalicílico
BRA	bloqueador do receptor de angiotensina
CEC	circulação extracorpórea
CFR	reserva de fluxo coronariano
CRM	cirurgia de revascularização miocárdica
CMMO	células mononucleares derivadas da medula óssea
DAC	doença arterial coronariana
DPr	duplo produto
IC	intervalo de confiança
ICP	intervenção coronária percutânea
IECA	inibidor da enzima conversora da angiotensina
IMC	índice de massa corpórea
FC	frequência cardíaca
FEVE	fração de ejeção do ventrículo esquerdo
FEVD	fração de ejeção do ventrículo direito
FFR	reserva fracionada de fluxo
FSM	fluxo sanguíneo miocárdico
ICP	intervenção coronária percutânea
IECA	inibidor da enzima conversora de angiotensina
MVEI	massa do ventrículo esquerdo indexada
MSC	células-tronco mesenquimais
PA	pressão arterial

RMC	ressonância magnética cardiovascular
RTM	realce tardio miocárdico
SPECT	cintilografia de perfusão miocárdica com tomografia computadorizada por emissão de fóton único
T	Tesla
TCLE	termo de consentimento livre e esclarecido
TE	tempo de eco
TR	tempo de repetição
VE	ventrículo esquerdo
VDFVDI	volume diastólico final do ventrículo direito indexado
VSFVDI	volume sistólico final do ventrículo direito indexado
VDFVEI	volume diastólico final do ventrículo esquerdo indexado
VSFVEI	volume sistólico final do ventrículo esquerdo indexado

Símbolos

%	porcentagem
<	menor
=	igual
>	maior
±	mais ou menos
≤	menor ou igual
≥	maior ou igual
bpm	batimento por minuto
cm	centímetro
kg	quilograma
kg/m ²	quilograma por metro quadrado
mm	milímetro
ml/s	mililitro por segundo
ms	milisegundo
s	segundo
p	probabilidade de significância

Siglas

AHA	<i>American Heart Association</i>
CCS	<i>Canadian Cardiovascular Society</i>
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
InCor	Instituto do Coração
INCL	Instituto Nacional de Cardiologia Laranjeiras
HCC	Hospital Cardiológico Costantini
MiHeart/IHD	<i>Multicenter randomized trial of cell therapy in cardiopathies - Chronic Ischemic Heart Disease</i>
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde

Figuras

Figura 1 -	As principais causas de morte no mundo em 2000 e 2016 segundo dados da Organização Mundial de Saúde	2
Figura 2 -	Combinações dos espectros da doença arterial coronariana focal, difusa e microvascular.....	5
Figura 3 -	Pós-processamento das imagens de perfusão miocárdica por RMC de um caso clínico do estudo.	16
Figura 4 -	Exemplo de classificação dos segmentos miocárdicos de acordo com a intervenção e localização, usando um modelo de 16 segmentos	18
Figura 5 -	Fluxograma do estudo ilustrando quantos pacientes foram incluídos no estudo MiHeart/IHD e no subestudo para quantificação de perfusão por RMC.....	22
Figura 6 -	Alterações no CFR ao longo do tempo e efeitos do tratamento alocado em todos os segmentos miocárdicos.....	27
Figura 7 -	Alterações no CFR ao longo do tempo e efeitos do tratamento alocado nos segmentos miocárdicos alvos.....	28
Figura 8 -	Alterações no CFR ao longo do tempo e efeitos do tratamento alocado nos segmentos miocárdicos adjacentes.....	28
Figura 9 -	Alterações no CFR ao longo do tempo e efeitos do tratamento alocado nos segmentos miocárdicos remotos	29

Tabelas

Tabela 1 -	Características clínicas dos pacientes do estudo MiHeart/IHD incluídos e não incluídos no subestudo de perfusão quantitativa por RMC.....	23
Tabela 2 -	Características clínicas dos pacientes do subestudo de perfusão quantitativa por RMC de acordo com o tratamento alocado.....	24
Tabela 3 -	Características morfológicas, funcionais, teciduais e perfusionais dos ventrículos dos pacientes do subestudo de perfusão quantitativa por RMC de acordo com tratamento alocado.....	25
Tabela 4 -	Espessura miocárdica, tamanho do infarto e reserva de fluxo coronariano dos segmentos miocárdicos de acordo com tratamento alocado	26
Tabela 5 -	Valor basal e alterações no CFR ao longo do seguimento de acordo com o tipo de segmento miocárdico e tratamento alocado	30
Tabela 6 -	Efeito ajustado do tratamento no CFR ao longo do seguimento clínico de acordo com o tipo de segmento miocárdico	31

RESUMO

Assunção Júnior AN. *Perfusão miocárdica quantitativa por ressonância magnética cardiovascular na doença arterial coronariana difusa tratada com revascularização cirúrgica associada à terapia celular: um subestudo do MiHeart/IHD* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

Introdução: Pacientes com doença arterial coronária (DAC) difusa frequentemente são submetidos a uma revascularização miocárdica incompleta, o que aumenta o risco de futuros eventos cardiovasculares adversos. A isquemia regional residual relacionada a ambas lesão epicárdica não-tratada e doença de pequenos vasos geralmente contribuem para a carga da doença. O objetivo principal deste estudo foi investigar se a injeção intramiocárdica de células mononucleares derivadas da medula óssea (CMMO) em regiões isquêmicas do miocárdio onde uma revascularização direta seria inadequada aumenta a reserva de fluxo coronariano (CFR), uma medida integrada tanto da doença coronária epicárdica quanto da função microvascular. **Métodos:** Este foi um subestudo do MiHeart/IHD (*Multicenter randomized trial of cell therapy in cardiopathies - Chronic Ischemic Heart Disease*) - estudo clínico multicêntrico, duplo-cego, em que 143 pacientes com DAC avançada e difusa submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio (CRM) foram randomizados para receber, durante a revascularização miocárdica e sob visualização direta, injeção intramiocárdica de CMMO ou solução salina normal em regiões miocárdicas isquêmicas e viáveis, onde uma revascularização direta era considerada inadequada. Após o procedimento, 78 pacientes foram incluídos neste subestudo para quantificação da perfusão por ressonância magnética cardiovascular (RMC), apresentando seguimento 1, 6 e 12 meses após a intervenção. Os segmentos miocárdicos foram classificados como alvos (segmento injetado), adjacentes (ao redor do local da injeção) e remotos (distantes do local da injeção). O desfecho medido deste subestudo incluiu mudanças regionais no CFR pela RMC em 1, 6 e 12 meses. **Resultados:** Em um total de 1248 segmentos, 269 foram alvos (22%), 397 (32%) adjacentes e 582 (46%) remotos. Os alvos tiveram valores de CFR significativamente menores em comparação com outros segmentos no início do estudo ($1,40 \pm 0,79$ versus $1,64 \pm 0,89$ para o adjacente; e versus $1,79 \pm 0,79$ para o remoto; ambos $p < 0,05$). O tratamento celular com CMMO aumentou significativamente o CFR nos segmentos alvos e adjacentes aos 6 e 12 meses em comparação com o placebo. Nos alvos, houve um efeito progressivo do tratamento (27,1% aos 6 meses, $p = 0,037$ e 42,2% aos 12 meses, $p = 0,001$). Nos segmentos adjacentes, o CFR aumentou em 21,8% ($p = 0,023$) em 6 meses, que persistiu até 12 meses (22,6%; $p = 0,022$). Os segmentos remotos nos grupos CMMO e placebo experimentaram aumentos similares no CFR ao longo do tempo, sem significância estatística entre os grupos em nenhum momento. **Conclusão:** A injeção intramiocárdica de CMMO em regiões do miocárdio gravemente isquêmicas e inadequadas à revascularização direta levaram aos mais significativos aumentos de CFR que progrediram até 12 meses, em comparação com alterações de CFR menores (mas persistentes) em segmentos adjacentes e nenhuma melhora em segmentos remotos. Esses resultados sugerem que o CMMO leva primariamente ao remodelamento microvascular positivo no miocárdio isquêmico.

Descritores: Doença da artéria coronariana; Isquemia miocárdica; Imagem de perfusão do miocárdio; Revascularização miocárdica; Terapia baseada em transplante de células e tecidos.

ABSTRACT

Assunção Júnior AN. *Quantitative myocardial perfusion by cardiovascular magnetic resonance imaging in diffuse coronary artery disease treated with surgical revascularization combined with cell therapy: a MiHeart / IHD substudy* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019.

Introduction: Patients with diffuse coronary artery disease (CAD) frequently undergo an incomplete myocardial revascularization, which increases their risk for future adverse cardiovascular outcomes. The residual regional ischemia related to both untreated epicardial lesions and small vessel disease usually contribute in the disease burden. This study investigated whether intramyocardial injection of autologous, bone marrow-derived hematopoietic progenitor cells (BMC) increases coronary flow reserve (CFR), an integrated measure of both epicardial coronary disease and microvascular function, in ischemic myocardial regions where a direct revascularization was unsuitable. **Methods:** In this substudy of the MiHeart/IHD (Multicenter randomized trial of cell therapy in cardiopathies - Chronic Ischemic Heart Disease) multicenter, double-blinded trial, 143 patients with diffuse CAD undergoing incomplete coronary artery bypass graft (CABG) were randomized to receive, during the CABG and under direct visualization, saline solution in ischemic and viable myocardial regions where a direct revascularization was unsuitable. Following the procedure, 78 patients underwent cardiovascular magnetic resonance (CMR) at 1, 6 and 12 months and were included in this CMR substudy with perfusion quantification. Myocardial segments were classified as target (injected segment), adjacent (surrounding the injection site), and segments remote from injection site. The end-point of the substudy included regional changes in CFR by CMR at 1, 6 and 12 months. **Results:** In a total of 1248 segments, 269 were target (22%), 397 (32%) adjacent and 582 (46%) remote. The target segments had significantly lower CFR values compared to other segments at baseline (1.40 ± 0.79 vs 1.64 ± 0.89 in adjacent, and vs 1.79 ± 0.79 in remote; both $p < 0.05$). Intramyocardial BMC significantly increased CFR in target and adjacent segments at 6 and 12 months as compared to placebo. In target regions, there was a progressive treatment effect (27.1% at 6 months, $p = 0.037$; and 42.2% at 12 months, $p = 0.001$). In the adjacent segments, CFR increased by 21.8% ($p = 0.023$) 6 months, which persisted to 12 months (22.6%; $p = 0.022$). Remote segments in both BMC and placebo groups experienced similar improvements in CFR over time, with no statistical significance between groups at any time point. **Conclusions:** BMC's, injected in severely ischemic myocardial regions unsuitable to direct revascularization, led to the largest CFR improvements which progressed up to 12 months, compared to smaller but persistent CFR changes in adjacent segments and no improvement in remote segments. These results suggest that BMC's primarily lead to positive microvascular remodeling in ischemic myocardium.

Descriptors: Coronary artery disease; Myocardial ischemia; Myocardial perfusion imaging; Myocardial revascularization; Cell- and tissue-based therapy.

1 INTRODUÇÃO

A doença arterial coronariana (DAC) continua responsável por milhões de mortes em todo o mundo (1). Dados recentes da Organização Mundial de Saúde (OMS) apontam que as doenças não transmissíveis foram responsáveis por 71% das 56,8 milhões de mortes registradas em 2016. Dentre as quais, a doença isquêmica do coração decorrente da DAC ocupa a primeira posição, sendo a causa de 9,4 milhões óbitos (17%) ⁽¹⁾ (**Figura 1**). A mortalidade prematura é sem dúvida o indicador mais preocupante, mas a morbidade relacionada a DAC também permanece elevada a despeito dos avanços no tratamento farmacológico e terapias de revascularização miocárdica. De longe, o principal fator que contribui com os anos vividos com incapacidade na DAC é a angina (2). Nos Estados Unidos, por exemplo, estima-se que anualmente 9 milhões de pessoas apresentam angina e a taxa de ida ao pronto socorro é 25,7/10.000 e 15,9/10.000 de homens e mulheres, respectivamente ^(2,3).

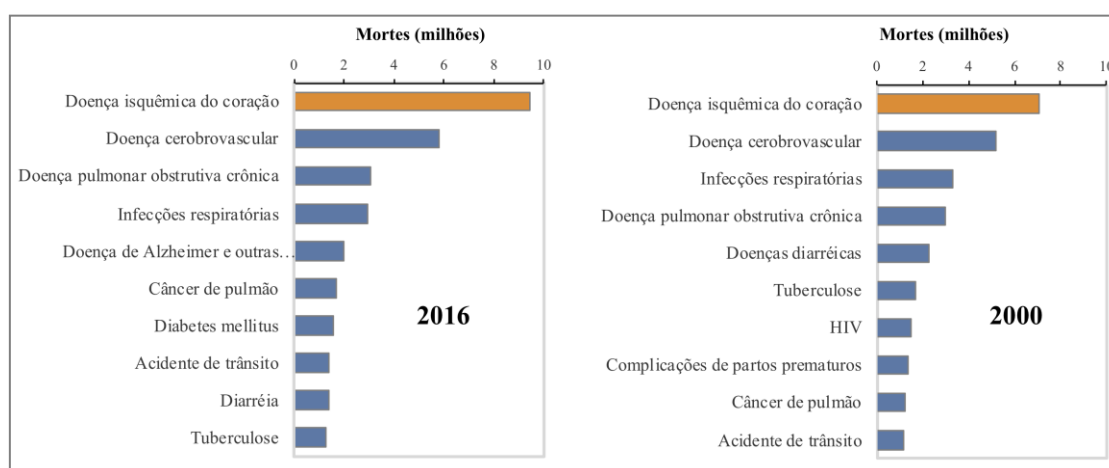


Figura 1 - As principais causas de morte no mundo em 2000 e 2016 segundo dados da Organização Mundial de Saúde. Em laranja, verifica-se o número de mortes (em milhões) da doença isquêmica do coração causada por doença arterial coronariana

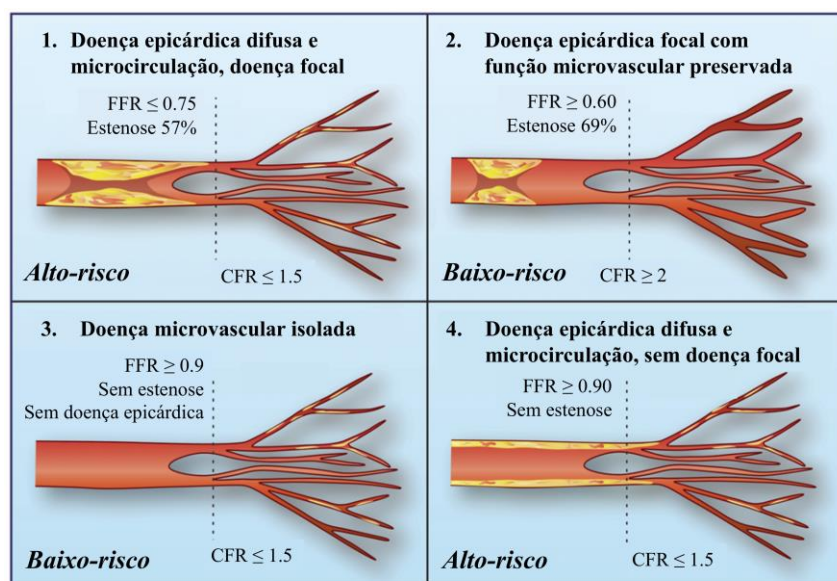
Na prática clínica, quando esgotadas as opções de tratamento clínico para um paciente com angina funcionalmente limitante ou em casos de DAC de alto risco (por exemplo: estenose > 50% do tronco da coronária esquerda; doença de 2 ou 3 vasos associada à disfunção ventricular e/ou à elevada carga isquêmica em testes não-invasivos), considera-se indicar revascularização miocárdica, seja para alívio de sintomas e/ou redução da chance de eventos cardiovasculares adversos no futuro ⁽⁴⁾.

No grupo de pacientes com DAC multiarterial, evidências têm apontado que, quando indicado, o tratamento de revascularização deve ser o mais completo possível ⁽⁵⁾. Em uma metanálise que incluiu 35 estudos clínicos randomizados e observacionais, totalizando quase 90 mil pacientes, Garcia et al. demonstraram que uma revascularização mais completa se associou com menores taxas de mortalidade (risco relativo, RR, de 0,71), infarto do miocárdio (RR de 0,78) e revascularização miocárdica subsequente (RR de 0,72) no seguimento clínico. Vale salientar que tais autores também mostraram que a cirurgia de revascularização miocárdica (CRM) alcança resultados 2 vezes mais completos que a intervenção coronária percutânea (ICP) (56% vs. 25%; $p < 0,001$) ⁽⁵⁾.

Entretanto, não é incomum ocorrer casos de pacientes com DAC multiarterial que se submetem a procedimentos incompletos (mesmo com a CRM) devido à complexidade de sua doença e à impossibilidade técnica do procedimento. Nos estudos clínicos mais recentes, as taxas de procedimentos incompletos em pacientes com doença multiarterial variaram de 16% no estudo ARTS I ⁽⁶⁾, 36% MASS II ⁽⁷⁾ e 37% SYNTAX CABG . De fato, os desfechos clínicos adversos nesse subgrupo de pacientes com DAC difusa devem-se, em parte, ao não-tratamento da estenose focal

epicárdica coronariana. Todavia, dados consistentes revelam que estes indivíduos também têm elevada chance de ter doença microvascular associada ⁽⁸⁾ e que a isquemia residual relacionada a esses pequenos vasos contribuem de forma independente na fisiopatologia da insuficiência cardíaca e morte desses indivíduos ⁽⁹⁾.

Dois marcadores se destacam para avaliação de isquemia ou avaliação funcional na DAC: reserva fracionada de fluxo (FFR) e reserva de fluxo coronariano (CFR). O FFR é uma medida invasiva derivada de pressões das coronárias que quantifica a redução relativa do fluxo miocárdico devido a uma estenose em relação ao fluxo na mesma artéria sem estenose, sendo considerado o padrão-ouro para identificação de estenoses coronarianas epicárdicas com limitação de fluxo. O CFR, por outro lado, pode ser medido de forma não-invasiva, sendo derivado da divisão do fluxo sanguíneo miocárdico (FSM) no pico do estresse pelo repouso. O CFR é considerado uma medida integrada dos efeitos hemodinâmicos de ambas as doenças epicárdica e microvascular. A **figura 2** ilustra as diferentes combinações dos espectros da DAC identificados por tais marcadores e o risco de eventos cardiovasculares ^(8, 10).



Fonte: Adaptado de Ford, 2017 e Gould, 2015

Figura 2 - Combinações dos espectros da doença arterial coronariana focal, difusa e microvascular. Os valores de FFR e CFR ilustrados nesta figura representam valores associados com maior (ou menor) risco de eventos cardiovasculares ^(8, 10)

A terapia celular é uma estratégia terapêutica emergente para abordagens de doenças cardiovasculares, incluindo a doença isquêmica do coração. Desde publicação de Orlic et al. em 2001 ⁽¹¹⁾, que demonstrava um potencial efeito deste tratamento no reparo miocárdio de ratos infartados, tem sido observado uma onda de estudos clínicos randomizados publicados com resultados animadores ^(12–19). Especificamente para pacientes com DAC difusa, esse tratamento é potencialmente promissor, uma vez que a terapia celular pode incluir precursores endoteliais com características fenotípicas e funcionais de hemangioblastos embrionários, sendo estes utilizados para induzir diretamente a formação de novos vasos sanguíneos nas áreas infartadas (vasculogênese) e proliferação da vasculatura preexistente (angiogênese) ^(20, 21).

Em pacientes com angina refratária e, portanto, inelegíveis para qualquer tipo de revascularização do miocárdio, evidências apontam que a terapia celular diminui sintomas de angina e defeitos de perfusão, com melhora do remodelamento ventricular e menor incidência de eventos cardiovasculares maiores ⁽²²⁾. No contexto dos pacientes que se submetem à revascularização incompleta, por outro lado, os dados na literatura quanto a um eventual benefício do implante de células em regiões impossibilitadas de receber revascularização são escassos. O estudo clínico MiHeart/IHD (*Multicenter randomized trial of cell therapy in cardiopathies - Chronic Ischemic Heart Disease*) foi desenhado justamente para tentar responder esta pergunta ⁽²³⁾. Neste estudo, foi investigado o efeito da injeção intramiocárdica de células mononucleares derivadas da medula óssea (CMMO) no aumento da perfusão miocárdica qualitativa em pacientes com DAC difusa submetidos a revascularização miocárdica incompleta, utilizando-se cintilografia de perfusão miocárdica com tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) e/ou ressonância magnética cardiovascular (RMC) ⁽²³⁾.

Nos últimos anos, contudo, têm-se demonstrado que a RMC pode oferecer valores acurados de CFR ⁽²⁴⁾ através da quantificação do FSM. Até a presente data, pelo menos ao nosso conhecimento, não há estudos disponíveis utilizando a perfusão quantitativa por RMC para avaliar o efeito de tratamento na terapia celular. Adiciona-se a isto que, no contexto em que se deseja avaliar efeitos de novas terapias ou estudar a fisiopatologia in vivo (e sobretudo quando há doença microvascular), a quantificação da perfusão através do CFR tem demonstrado ter um valor superior à avaliação visual qualitativa ^(25–29).

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Primário

Investigar o efeito do implante de CMMO associado com CRM no CFR avaliado pela RMC em regiões miocárdicas consideradas inapropriadas para revascularização miocárdica direta.

2.2 Secundários

Investigar o efeito do implante de CMMO associado com CRM no CFR avaliado pela RMC em regiões miocárdicas adjacentes e remotas ao implante de CMMO.

MÉTODOS

3 MÉTODOS

3.1 Desenho de estudo

Este é um subestudo do estudo clínico MiHeart/IHD. O MiHeart/IHD foi um estudo multicêntrico, randomizado, duplo-cego e placebo-controlado desenhado para testar a eficácia da injeção intramiocárdica de CMMO em pacientes que se submeteram a CRM incompleta ⁽²³⁾. Pacientes foram considerados elegíveis para o MiHeart/IHD se preenchido os seguintes critérios: 1) sintomas de angina ou equivalente; 2) isquemia miocárdica documentada por pelo menos 2 métodos não-invasivos; 3) presença de DAC documentada por angiografia invasiva; 4) não elegibilidade para revascularização miocárdica completa devido à doença extensa, difusa e presença de leitos distais finos. Os principais critérios de exclusão foram fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) <25%; curta expectativa de vida (<1 ano); diagnóstico de câncer nos últimos 5 anos da inclusão; diagnóstico de doença hematológica; diagnóstico de cardiomiopatia não-isquêmica de qualquer etiologia; diagnóstico de síndrome coronariana aguda nos últimos 3 meses da inclusão; doença renal crônica estágio V necessitando de diálise ⁽²³⁾.

Este estudo foi realizado de acordo com a Declaração de Helsinki, com a aprovação no Conselho de Ética e Pesquisa dos diferentes centros e assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) por todos os pacientes incluídos.

3.2 Procedimentos e linha do tempo

Testes de isquemia e viabilidade (ecocardiografia com dobutamina, SPECT e/ou RMC) foram necessários para o recrutamento de pacientes no MiHeart/IHD. Evidência de isquemia teve que ser confirmada por duas modalidades diferentes ⁽²³⁾.

Na sala de operação, logo após a indução da anestesia e imediatamente antes da CRM, foram obtidos 100 mL de aspirado de medula óssea da crista ilíaca posterior direita, utilizando-se técnicas padrões no procedimento. Sob condições assépticas, o material foi isolado por centrifugação em gradiente de densidade em Ficoll-Paque Plus™ (GE Healthcare, Pittsburgh, PA) e lavado com solução salina heparinizada. Após a contagem das células utilizando a solução de Türk, um mínimo de 1×10^8 células foram ressuspensas em 5mL de solução salina normal e colocadas em cinco seringas de 1 ml prontas para a injeção. A viabilidade celular precisava ser maior que 90% para ser considerada adequada para injeção. As populações celulares foram caracterizadas por citometria de fluxo, utilizando anticorpos para CD3, CD8, CD10, CD13, CD14, CD15, CD31, CD34, CD38, CD45, CD105 e CD133 ⁽²³⁾.

Durante o procedimento cirúrgico de revascularização e sob visualização direta, os pacientes receberam uma injeção transepicardial de CMMO ou solução salina normal nas regiões miocárdicas isquêmicas e viáveis que foram identificadas pelos testes anteriormente mencionados ⁽²³⁾. A mediana do número de segmentos injetados foi de 4 (variando de 1 a 12). Após o procedimento, pacientes foram acompanhados clinicamente e com imagem de perfusão miocárdica (RMC e/ou SPECT) aos 1, 6 e 12 meses.

3.3 Protocolo de imagem por ressonância magnética cardiovascular

A RMC foi realizada em um aparelho clínico de 1,5T. Uma sequência de pulsos *standard cine-steady state free precession* foi utilizada para adquirir imagens de eixo curto do ventrículo esquerdo (VE) e fornecer imagens de alta qualidade para volumes ventriculares, massa e função. Os cortes de eixo curto foram adquiridos com 8 mm de espessura e 2 mm de intervalo, em número de 8 a 14, visando cobrir toda a extensão do VE. As dimensões de cada voxel foram, em média, 1,7x2,0x8,0 mm. Demais parâmetros foram tempo de repetição (TR) de 3,5ms, tempo de eco (TE) 1,4 ms, ângulo de inclinação de 45°, matriz de aquisição de 256x128.

As imagens de perfusão miocárdica de primeira passagem no estresse (usando dipiridamol a 0,56 mg/kg injetado em 4 min) e repouso foram adquiridas em 3 eixos curtos (basal, médio e apical) através de uma sequência híbrida *fast gradient-echo with echo-planar readout* (tempo de repetição de 6,5 ms; tempo de eco de 1,41 ms; matriz de 128x128, espessura de corte de 8 mm e comprimento do *echo-train* de 4). Utilizou-se um agente de contraste à base de gadolínio (gadodiamida, Omniscan, GE Healthcare) numa dose de até 0,1 mmol/kg (taxa de injeção, 5 ml/s) seguido por solução salina.

O realce tardio miocárdico (RTM) também foi realizado usando sequência de *segmented IR prepared gradient-echo* 10–15 min após a imagem de perfusão em repouso no mesmo local de corte das imagens cine de eixo curto. Os parâmetros foram os seguintes: TR 7,1 ms, TE 3,1ms, ângulo de inclinação de 20°, espessura do

corde de 8 mm, intervalo entre cortes de 2 mm, tempo de inversão individualizado para anular miocárdio, matriz 256x192.

3.4 Pós-processamento das imagens

As imagens da RMC foram analisadas por dois observadores experientes, sem qualquer informação sobre os dados clínicos dos pacientes, utilizando o software cvi42 (*Circle Cardiovascular Imaging Inc.*, Calgary, Canadá). Os volumes sistólico e diastólico final, massa e fração de ejeção dos ventrículos foram medidos por métodos padronizados e foram apropriadamente indexados para a superfície corpórea de cada paciente. A massa (g) e a porcentagem de infarto (% de massa de VE) foram calculadas pela técnica semiautomática *full-width at half maximum* ⁽³⁰⁾. A análise visual qualitativa das imagens de perfusão miocárdica para identificar defeitos de perfusão também foi realizada como recomendado ⁽³⁰⁾.

Neste subestudo, apenas pacientes com RMC apresentando requisitos mínimos para quantificação do FSM foram incluídos, sobretudo com dosagem de contraste máxima de 0,05 mmol/kg (para cada aquisição de perfusão) ⁽³¹⁾. O gadolínio tem um baixo peso molecular e se difunde livremente através da membrana capilar para o espaço extracelular, sem qualquer absorção intracelular substancial. É importante ressaltar que a relação entre a concentração de gadolínio e a intensidade de sinal tecidual é linear apenas em concentrações baixas do contraste. Na prática clínica, doses mais altas deste agente de contraste são frequentemente utilizadas para a melhor visualização de defeitos de perfusão, o que resulta em saturação de sinal

que pode levar a uma estimativa imprecisa na quantificação da perfusão miocárdica ^(32, 33).

Com relação às técnicas de quantificação da perfusão, de maneira simplificada, as abordagens podem ser divididas em duas categorias: baseadas em modelo e independentes de modelo. Em ambas, utiliza-se a função de entrada arterial medida (cavidade ventricular) e a intensidade do sinal do miocárdio para a construção de curvas de intensidade de tempo e modelagem cinética aplicada. Para abordagens baseadas em modelos, especificam-se os espaços funcionais no tecido miocárdico - como o traçador se move através desses espaços e como ele atravessa as barreiras permeáveis entre os espaços. A análise independente do modelo significa que não se especifica um modelo funcional da estrutura do tecido. As técnicas de perfusão mais amplamente utilizadas são via modelagem cinética complementar (plotagem de Patlak, equalização de Kety modificada) ou por métodos de deconvolução (deconvolução de Fermi, deconvolução independente de modelo, deconvolução exponencial e deconvolução utilizando curvas B-splines) ^(24, 34-37). Biglands et al. fizeram uma comparação recente desses diferentes métodos e concluíram que o desempenho diagnóstico das estimativas quantitativas da perfusão miocárdica por RMC não é afetado pelo método de utilizado ⁽³⁸⁾.

A técnica de quantificação de perfusão por RMC utilizada neste subestudo foi a deconvolução independente de modelo, aplicando-se uma técnica matemática de curvas B-splines ⁽²⁴⁾. Primeiramente, para o pós-processamento das imagens, um observador experiente traçou manualmente, quadro-a-quadro, as bordas endocárdicas/epicárdicas para ajuste do movimento respiratório (**Figura 3**).

A intensidade do sinal do VE para o *pool* sanguíneo e a intensidade do sinal miocárdico de 6 segmentos equiangulares (60 graus) por corte foram determinados para todos os pontos de tempo. A curva do pool de sangue foi corrigida para a saturação do sinal usando um modelo sequência-específico para o realce do contraste. Em cada segmento de eixo curto, o FSM foi determinado para os 6 segmentos miocárdicos em $\text{mL min}^{-1} \text{g}^{-1}$ usando uma deconvolução matemática independente de modelo das curvas de intensidade miocárdica, com a função matemática independente de modelo das curvas de intensidade miocárdica, com a função de entrada arterial corrigida por saturação e medida na cavidade sanguínea do VE (24) (**Figura 3**).

Os cálculos foram implementados em ambiente Matlab (Mathworks, Natick, MA) com a colaboração do Prof. Michael Jerosch-Herold - físico e Professor Associado de Radiologia - e do Prof. Raymond Kwong - diretor médico do setor de Ressonância Magnética Cardiovascular e Professor Associado de Cardiologia, ambos do *Brigham and Women's Hospital*, Universidade de Harvard. Esta metodologia de quantificação do FSM foi devidamente validada ⁽²⁴⁾ e vem sendo utilizada em diversos cenários clínicos, contribuindo por exemplo na avaliação da fisiopatologia de doenças e resposta a diferentes tratamentos ^(39–43).

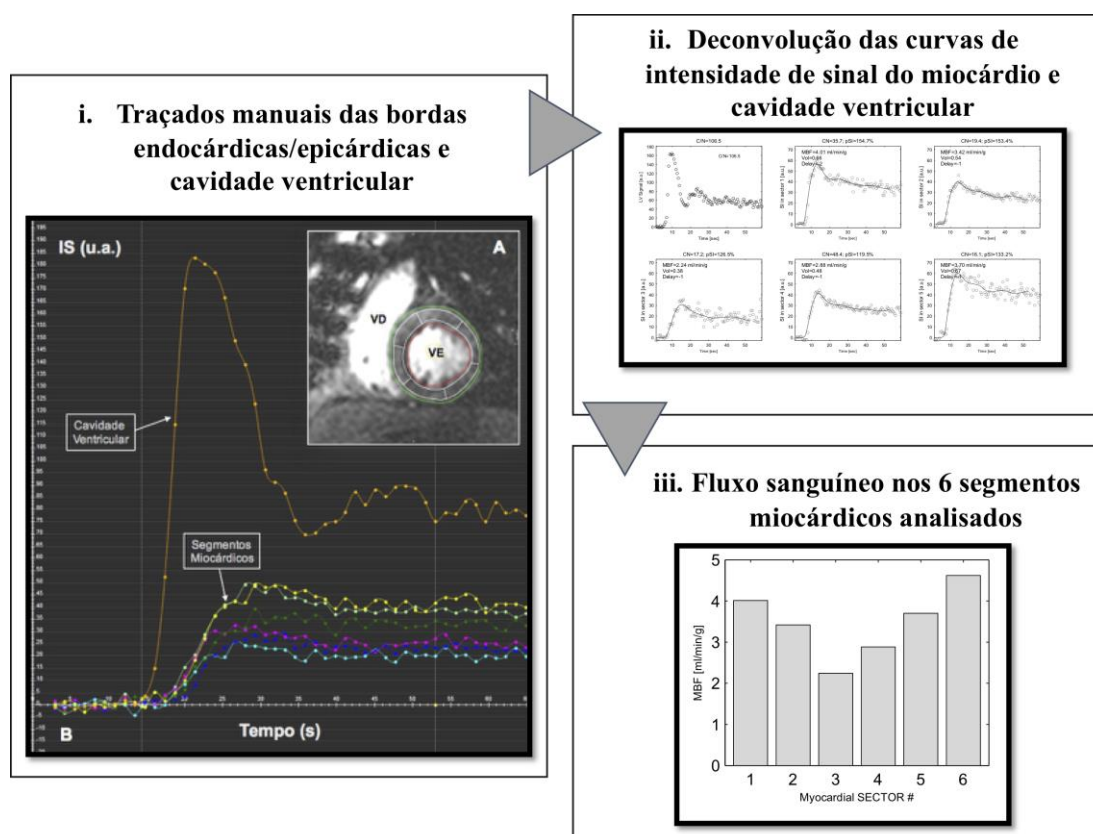


Figura 3 - Pós-processamento das imagens de perfusão miocárdica por RMC de um caso clínico do estudo. Etapa (i) mostrando traçados em eixo-curto da porção medial do ventrículo esquerdo utilizando software cvi42, Circle CVI. Contornos endocárdio (vermelho), epicárdio (verde) e da cavidade ventricular (laranja) (A). Curvas da intensidade de sinal da cavidade ventricular e do miocárdio (B). Etapas (ii) e (iii) para obtenção do FSM através de deconvolução independente, implementado com os dados da curva de intensidade de sinal do miocárdio e cavidade ventricular pelo tempo em ambiente Matlab (Mathworks, Natick, MA)

O FSM no repouso depende da demanda de oxigênio. Alterações na frequência cardíaca (FC) e/ou pressão arterial sistólica (PAS) afetam o FSM ao repouso, sendo portanto necessário ajustar seu valor por um índice de trabalho cardíaco ⁽⁴⁴⁾. Assim, o FSM em repouso foi corrigido em cada paciente para o respectivo duplo produto ($DPr = FC \times PAS$) da seguinte forma ⁽⁴⁵⁾:

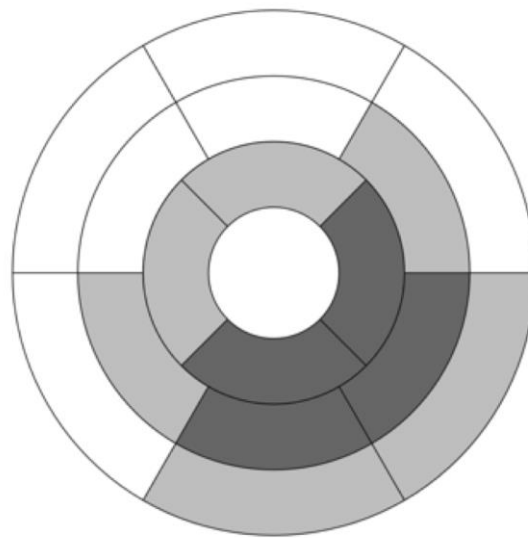
- i. $\overline{\text{DPr}} = \text{FC} \times \text{PAS}$
- ii. $\text{FSM ao repouso corrigido} = \frac{\text{Média do DPr desta coorte de pacientes} \times \text{FSM ao repousc}}{\text{DPr do paciente}}$

O CFR foi então calculado para cada segmento:

- iii. $\text{CFR} = \frac{\text{FSM no estresse}}{\text{FSM ao repouso corrigido}}$

3.5 Análise regional dos segmentos e desfechos

Os segmentos miocárdicos dos pacientes foram agrupados em 3 categorias de acordo com a intervenção e localização, como segue: 1) alvos (injeção de CMMO ou placebo); 2) adjacentes (revascularizados, com localização ao redor do local da injeção); 3) remotos em relação ao local da injeção (**Figura 4**). É importante ressaltar que a maioria dos pacientes no estudo MiHeart / IHD apresentava doença de 3 vasos com envolvimento proximal a médio e apenas uma pequena proporção de segmentos não injetados não foram revascularizados, uma vez que eram supridos por DAC não-obstrutiva (estenose < 50%) ou não apresentavam viabilidade. Portanto, uma subcategoria de segmentos revascularizados não foi criada. Um outro ponto importante é que não foram realizadas aquisições de perfusão por RMC em eixo-longo, necessárias para avaliação do ápex ventricular (segmento 17). Assim, foi utilizado neste estudo um modelo de 16 segmentos adaptado da *American Heart Association* (AHA) ⁽⁴⁶⁾, excluindo o segmento 17. O desfecho deste subestudo incluiu alterações no CFR aos 1, 6 e 12 meses.



16-segmentos

Figura 4 - Exemplo de classificação dos segmentos miocárdicos de acordo com a intervenção e localização, usando um modelo de 16 segmentos. Tons mais escuros ilustram os segmentos alvos; sombras claras são os segmentos adjacentes; e brancos são os segmentos remotos ao local de injeção

3.6 Análise estatística

Os dados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão e frequência (porcentagem), a menos que especificado de outra forma. A normalidade foi avaliada graficamente por gráficos Q-Q e testada usando o teste de Shapiro-Wilk. Para avaliar as diferenças basais entre os braços randomizados deste estudo, o teste t de Student (ou Rank-sum) e o teste do Qui-quadrado (ou exato de Fisher) foram utilizados apropriadamente. As diferenças entre os tipos de segmentos miocárdicos no início do estudo foram calculadas usando Kruskal-Wallis com os testes de comparação múltipla de Dunn. Os efeitos de intervenção dentro de cada tipo de segmento foram

analisados com base na intenção de tratar, utilizando-se para isso um modelo linear de efeitos mistos e estimador de máxima verossimilhança ⁽⁴⁷⁾. Um intercepto aleatório foi usado por conta de medidas obtidas no mesmo indivíduo. Os efeitos do tratamento foram estimados calculando a diferença absoluta entre a mudança média de CFR (%) em relação aos valores basais no grupo que recebeu CCMO e no grupo placebo. O modelo não ajustado incluiu apenas uma interação entre o tratamento randomizado e o tempo de acompanhamento. Considerando diferenças basais de espessura da parede miocárdica na diástole ⁽⁴⁸⁾, tamanho do infarto ⁽⁴⁹⁾ e CFR ^(50, 51), além do número de enxertos recebidos, um modelo final foi criado para explorar os efeitos do tratamento no CFR ajustados para essas variáveis. Todas as análises estatísticas foram realizadas o software R 3.4.3 (*R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria*) e o valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Características basais dos participantes

Dos 143 pacientes recrutados no MiHeart/IHD, 78 foram incluídos neste subestudo de perfusão quantitativa por RMC (40 receberam CMMO e 38 receberam placebo). O fluxograma do estudo aparece na **Figura 5**, incluindo o número e motivos de abandono do estudo e falta intermitente ao exame. As características clínicas basais dos pacientes incluídos ou não neste estudo estão detalhadas na **Tabela 1**. Os pacientes não incluídos (n = 65) apresentaram menor prevalência de comorbidades (dislipidemia, hipertensão) e foram menos propensos a ter angina limitante (CCS III ou IV), o que se refletiu no menor uso de medicamentos (betabloqueador e IECA/BRA). Não houve outras diferenças significativas entre incluídos e não incluídos.

As **Tabelas 2 e 3** descrevem as características clínicas e da RMC dos 78 pacientes incluídos, respectivamente. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os indivíduos alocados para CMMO e placebo. No geral, pacientes tiveram idade de 58 ± 8 anos, e metade apresentava angina limitante apesar da terapia medicamentosa otimizada. Em média, 2,6 artérias coronárias foram enxertadas ($1,2 \pm 0,9$ arterial e $1,5 \pm 0,9$ venoso). A FEVE dos pacientes foi de $53 \pm 13\%$ (apenas 14% dos pacientes apresentaram FEVE $<40\%$) e RTM foi positivo em 85% dos pacientes no início do estudo (todos com padrão isquêmico, apresentando envolvimento do

subendocárdio e respeitando território anatômico coronariano). Entretanto, a extensão do infarto foi, em média, pequena (média de $6 \pm 5\%$ da massa do VE).

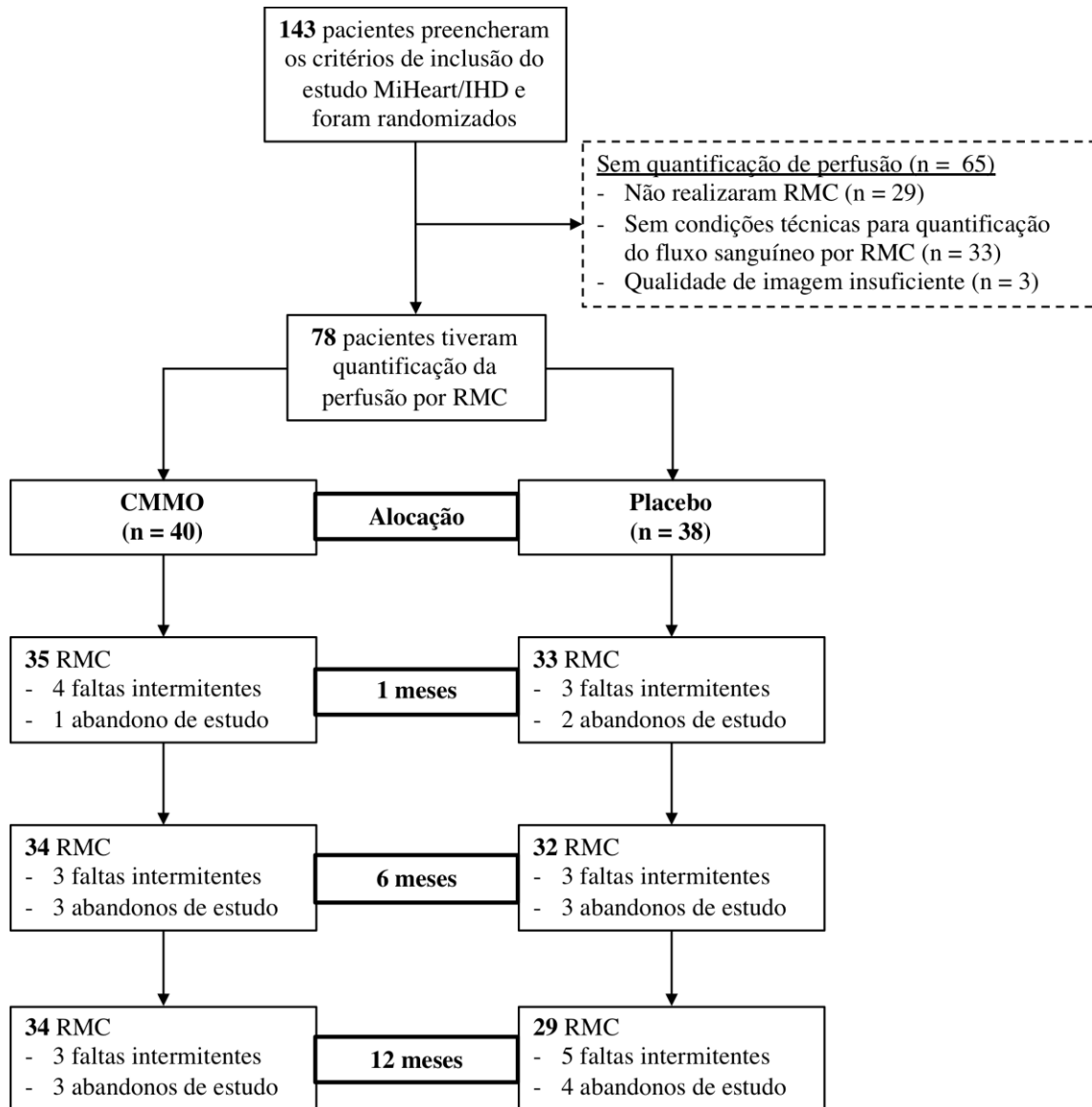


Figura 5 - Fluxograma do estudo ilustrando quantos pacientes foram incluídos no estudo MiHeart/IHD e no subestudo para quantificação de perfusão por RMC. A principal razão para abandono do estudo foi claustrofobia (5/7), e para falta intermitente (por exemplo, uma observação ausente em 6 meses, mas não aos 12 meses) foi recusa do paciente em realizar um dos exames de RMC (11/21), estado clínico (3/21) e arritmias (3/21). Não houve morte neste subestudo

Tabela 1 - Características clínicas dos pacientes do estudo MiHeart/IHD incluídos e não incluídos no subestudo de perfusão quantitativa por RMC

	Pacientes incluídos* (n = 78)	Pacientes não-incluídos* (n = 65)	valor-p
Demográficas			
Idade [anos]	58 ± 8	59 ± 9	0,341
Sexo masculino, no. (%)	63 (81)	54 (83)	0,844
Raça branca, no. (%)	67 (86)	57 (88)	0,904
IMC [kg/m ²]	27 ± 4	28 ± 5	0,108
FC [bpm]	68 ± 9	68 ± 12	0,567
PA sistólica [mmHg]	130 ± 19	131 ± 17	0,717
PA diastólica [mmHg]	79 ± 13	81 ± 14	0,556
Fatores de risco			
Dislipidemia, no. (%)	55 (71)	35 (54)	0,030
Diabetes mellitus, no. (%)	31 (40)	33 (51)	0,210
Hipertensão, no. (%)	69 (90)	48 (74)	0,014
Tabagismo, no. (%)	40 (52)	46 (71)	0,022
Diagnósticos prévios e sintomas			
CRM prévio, no. (%)	20 (26)	16 (25)	0,853
ICP prévio, no. (%)	15 (20)	12 (19)	0,877
Classe CCS da angina, no. (%)			0,009
II	38 (49)	48 (74)	
III	36 (46)	14 (22)	
IV	4 (5)	3 (5)	
Medicações			
Betabloqueador, no. (%)	65 (84)	42 (65)	0,006
IECA ou BRA, no. (%)	52 (68)	31 (48)	0,017
Nitrato, no. (%)	31 (40)	21 (32)	0,327
Insulina, no. (%)	21 (27)	16 (25)	0,719
Estatina, no. (%)	78 (100)	65 (100)	-
AAS, no. (%)	78 (100)	65 (100)	-
CABG			
Com CEC, no. (%)	54 (70)	37 (77)	0,534
Número de enxertos			
Arterial	1,2 ± 0,9	1,0 ± 1,1	0,452
Venoso	1,4 ± 0,9	1,4 ± 1,0	0,912

IMC significa índice de massa corpórea; FC frequência cardíaca; PA pressão arterial; CRM cirurgia de revascularização miocárdica; ICP intervenção coronária percutânea; CCS *Canadian Cardiovascular Society*; IECA inibidor da enzima conversora da angiotensina; BRA bloqueador de receptor da angiotensina; AAS ácido acetilsalicílico; CEC circulação extracorpórea. *Símbolo maios-menos representa média ± desvio padrão.

Tabela 2 - Características clínicas dos pacientes do subestudo de perfusão quantitativa por RMC de acordo com o tratamento alocado

	Total* (n = 78)	CMMO* (n = 40)	Placebo* (n = 38)	valor-p
Demográficas				
Idade [anos]	58 ± 8	58 ± 9	59 ± 8	0,565
Sexo masculino, no. (%)	63 (81)	35 (90)	28 (74)	0,068
Raça branca, no. (%)	67 (86)	35 (90)	32 (84)	0,470
IMC [kg/m ²]	27 ± 4	28 ± 4	27 ± 4	0,640
FC [bpm]	68 ± 9	68 ± 10	68 ± 9	0,848
PA sistólica [mmHg]	130 ± 19	131 ± 20	129 ± 18	0,624
PA diastólica [mmHg]	79 ± 13	81 ± 14	78 ± 12	0,283
Centro				0,660
InCor	58 (75)	31 (80)	27 (71)	
INCL	12 (16)	5 (12)	7 (18)	
HCC	7 (9)	3 (8)	4 (11)	
Fatores de risco				
Dislipidemia, no. (%)	55 (71)	25 (64)	30 (79)	0,149
Diabetes mellitus, no. (%)	31 (40)	17 (44)	14 (37)	0,546
Hipertensão, no. (%)	69 (90)	35 (90)	34 (90)	0,969
Tabagismo, no. (%)	40 (52)	16 (41)	24 (63)	0,052
Diagnósticos prévios e sintomas				
CRM, no. (%)	20 (26)	11 (28)	9 (24)	0,651
ICP, no. (%)	15 (20)	10 (26)	5 (13)	0,167
Classe CCS da angina, no. (%)				0,148
II	38 (49)	19 (48)	19 (50)	
III	36 (46)	20 (50)	16 (42)	
IV	4 (5)	1 (2)	3 (8)	
Medicações				
Betabloqueador, no. (%)	65 (84)	34 (87)	31 (82)	0,498
IECA ou BRA, no. (%)	52 (68)	26 (67)	26 (68)	0,869
Nitrato, no. (%)	31 (40)	16 (41)	15 (40)	0,890
Insulina, no. (%)	21 (27)	10 (26)	11 (29)	0,745
Estatina, no. (%)	78 (100)	39 (100)	37 (100)	-
AAS, no. (%)	78 (100)	39 (100)	37 (100)	-
CABG				
Com CEC, no. (%)	54 (70)	31 (79)	27 (73)	0,816
Número de enxertos				
Arterial	1,2 ± 0,9	1,4 ± 1,1	0,9 ± 0,8	0,051
Venoso	1,4 ± 0,9	1,6 ± 0,8	1,4 ± 0,9	0,282

IMC significa índice de massa corpórea; FC frequência cardíaca; PA pressão arterial; CRM cirurgia de revascularização miocárdica; ICP intervenção coronariana percutânea; CCS *Canadian Cardiovascular Society*; IECA inibidor da enzima conversora da angiotensina; BRA bloqueador de receptor da angiotensina; AAS ácido acetilsalicílico; CEC circulação extracorpórea. *Símbolo maios-menos representa média ± desvio padrão.

Tabela 3 - Características morfológicas, funcionais, teciduais e perfusionais dos ventrículos dos pacientes do subestudo de perfusão quantitativa por RMC de acordo com tratamento alocado

	Total* (n = 78)	CMMO* (n = 40)	Placebo* (n = 38)	valor-p
RMC				
VDFVEI [mL/m ²]	75 ± 22	74 ± 23	75 ± 22	0,735
VSFVEI [mL/m ²]	38 ± 20	36 ± 21	39 ± 19	0,506
FEVE [%]	53 ± 13	55 ± 14	50 ± 13	0,178
FEVE < 40%, no. (%)	10 (14)	4 (11)	6 (17)	0,495
MVEI [g/m ²]	73 ± 13	76 ± 15	71 ± 10	0,127
VDFVDI [mL/m ²]	55 ± 13	57 ± 12	55 ± 15	0,450
VDFVDI [mL/m ²]	23 ± 8	24 ± 6	23 ± 10	0,791
FEVD [%]	58 ± 6	58 ± 5	58 ± 7	0,938
Massa de infarto [% massa do VE]	6 ± 5	5 ± 4	6 ± 6	0,396
Presença de infarto, no. (%)	59 (85)	30 (86)	29 (83)	0,743

RMC significa ressonância magnética cardiovascular; VDFVEI volume diastólico final do ventrículo esquerdo indexado; VSFVEI volume sistólico final do ventrículo esquerdo indexado; FEVE fração de ejeção do ventrículo esquerdo; MVEI massa do ventrículo esquerdo indexada; VDFVDI volume diastólico final do ventrículo direito indexado; VSFVDI volume sistólico final do ventrículo direito indexado; FEVD fração de ejeção do ventrículo direito; VE ventrículo esquerdo. *Símbolo maios ou menos representa média ± desvio padrão.

De um total de 1248 segmentos miocárdicos analisados, 269 foram classificados como alvos (22%), 397 (32%) como adjacentes e 582 (46%) como remotos. Antes da intervenção, os segmentos miocárdicos alvos apresentavam valores de CFR significativamente mais baixos ($1,40 \pm 0,79$ vs. $1,64 \pm 0,89$ no adjacente e vs. $1,79 \pm 0,79$ no remoto; ambos $p < 0,05$) e menor espessura do que os outros segmentos (**Tabela 4**). No geral, quase 40% dos segmentos apresentavam infarto e, em média, a extensão do infarto foi pequena e comparável entre os tipos de segmentos (**Tabela 4**). Comparando CMMO com placebo, nenhuma diferença significativa no CFR pré-operatório foi observada entre os 3 tipos de segmentos miocárdicos (**Tabela 4**).

Tabela 4 - Espessura miocárdica, tamanho do infarto e reserva de fluxo coronariano dos segmentos miocárdicos de acordo com tratamento alocado

	Total (n = 1248)	Alvo (n = 269)	Adjacente (n = 397)	Remoto (n = 582)
Espessura miocárdica [mm]	8,9 ± 1.9	8,6 ± 1,7	9,0 ± 2,0*	9,0 ± 2,0*
Massa de infarto [% massa]	9,7 ± 18.4	8,4 ± 13,2	9,7 ± 19	10,3 ± 20,4
Presença de infarto, no. (%)	479 (42)	125 (47)	170 (43)	184 (40)
CFR	1,65 ± 0.83	1,40 ± 0,79	1,64 ± 0,89*‡	1,79 ± 0,79*†
CFR < 2.0, no. (%)	609 (72)	168 (86)	214 (72)*	227 (65) *†

CFR significa reserva de fluxo coronariano

*p<0,05 versus alvos; †p<0,05 versus adjacentes; ‡ p<0,05 versus remotos

4.2 Efeitos do tratamento

Alterações no CFR dos segmentos miocárdicos ao longo do tempo estão ilustradas nas **Figuras 6-9** e na **Tabela 5**. Numa avaliação de todos os segmentos miocárdicos, ambos os grupos CMMO e placebo experimentaram aumentos médios significativos do CFR ao longo do tempo (**Tabela 5**), atingindo um valor máximo 6 meses após a intervenção (média [intervalo de confiança de 95%, IC 95%] de 32,9% [21,5% - 44,3%] para o CMMO e de 18,4% [7,4% - 29,1%] para o placebo). Como pode ser visto na **Figura 6**, as mudanças no CFR foram sustentavelmente maiores no grupo CMMO comparado ao placebo, o que levou a um aumento significativo incremental no CFR aos 6 meses de 14,5% (p = 0,014) e de 16,3% aos 12 meses

($p = 0,004$) (**Figura 6**). Houve uma tendência marginal no sentido de diferenças nas mudanças CFR entre os grupos em 1 mês após intervenção ($p = 0,063$).

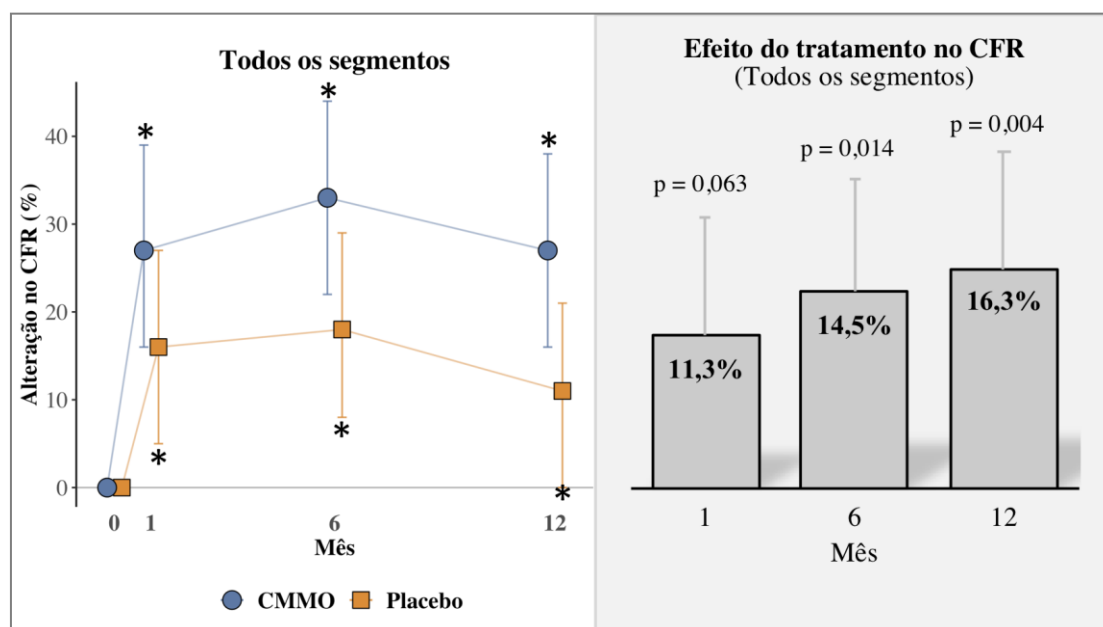


Figura 6 - Alterações no CFR ao longo do tempo e efeitos do tratamento alocado em todos os segmentos miocárdicos. * $p < 0,05$ dentro do grupo (comparação com o valor basal)

Nos segmentos miocárdicos alvos, o CMMO foi associado a um aumento progressivo do CFR aos 6 e 12 meses (média [IC 95%] de 42,9% [26,1% - 59,7%] e 55,4% [39,2% - 71,6%], respectivamente), enquanto o aumento precoce de CFR no placebo diminuiu ao longo do tempo, o que levou a um efeito do tratamento no CFR de 27,1% ($p = 0,037$) e 42,2% ($p = 0,001$) aos 6 e 12 meses, respectivamente (**Figura 7**). Nos segmentos miocárdicos adjacentes, um aumento significativo no CFR foi observado durante todo seguimento clínico no CMMO, enquanto no grupo placebo mudanças significativas no CFR foram observadas apenas aos 6 meses. Vale destacar

que o CMMO foi associado com um aumento médio de 21,8% ($p = 0,023$) e 22,6% ($p = 0,022$) no CFR aos 6 e 12 meses, respectivamente (**Figura 8**).

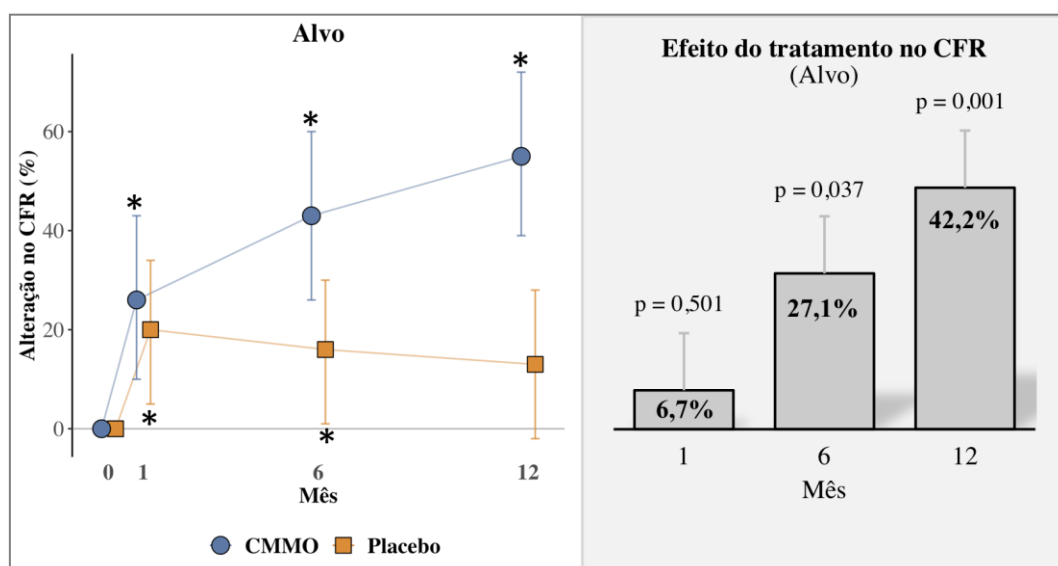


Figura 7 - Alterações no CFR ao longo do tempo e efeitos do tratamento alocado nos segmentos miocárdicos alvos. * $p < 0,05$ dentro do grupo (comparação com o valor basal)

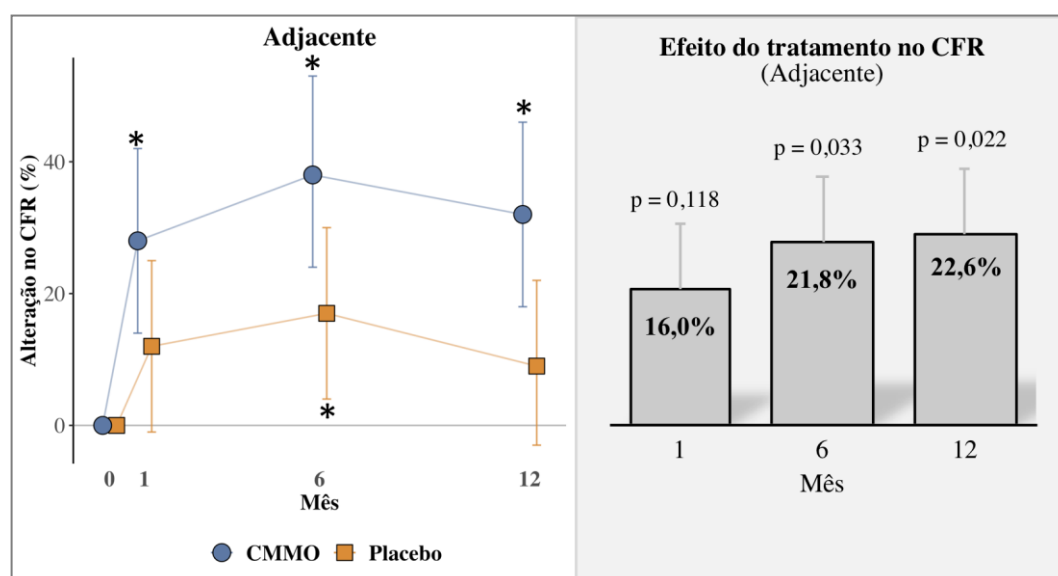


Figura 8 - Alterações no CFR ao longo do tempo e efeitos do tratamento alocado nos segmentos miocárdicos adjacentes. * $p < 0,05$ dentro do grupo (comparação com o valor basal)

Em ambos os grupos CMMO e placebo, segmentos miocárdicos remotos experimentaram mudanças semelhantes e significativas no CFR em 1 e 6 meses, quando comparados com o valor basal, mas não houve significância estatística entre os grupos em qualquer momento (**Figura 9**).

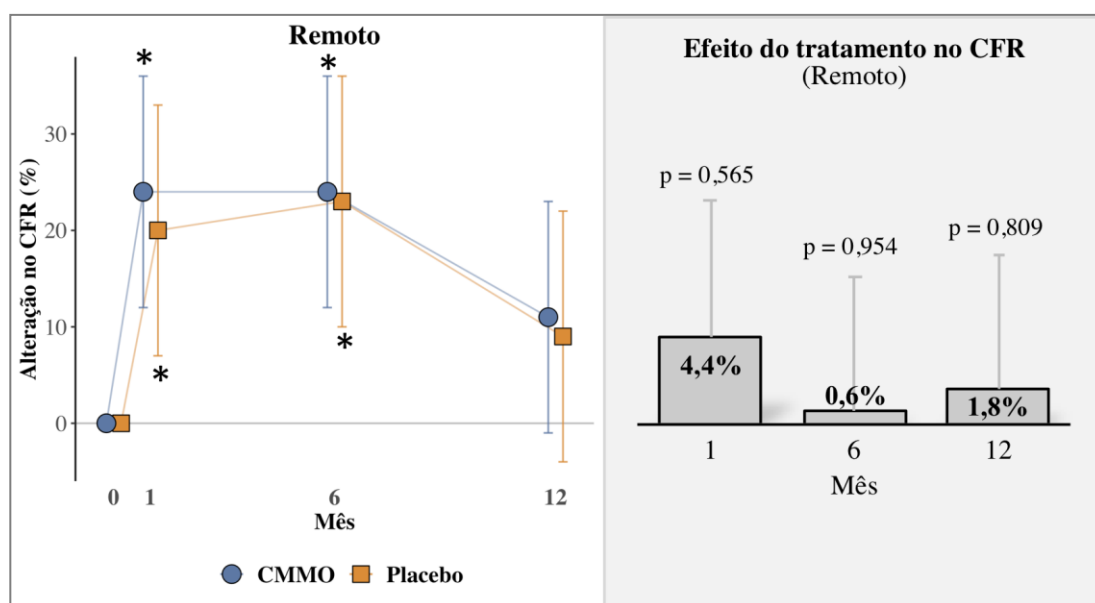


Figura 9 - Alterações no CFR ao longo do tempo e efeitos do tratamento alocado nos segmentos miocárdicos remotos. * $p < 0,05$ dentro do grupo (comparação com o valor basal)

Após ajuste para os valores basais de CFR, espessura da parede e extensão da massa de infarto (% da massa), além do número de enxertos recebidos, efeitos tardios significativos do tratamento (6 e 12 meses) no CFR continuaram significativos e com magnitudes comparáveis (Tabela 6).

Tabela 5 – Valor basal e alterações no CFR ao longo do seguimento de acordo com o tipo de segmento miocárdico e tratamento alocado

Pré-procedimento	CFR*	1 mês ΔCFR % (IC 95%)	valor-p	6 meses ΔCFR % (IC 95%)	valor-p	12 meses ΔCFR % (IC 95%)	valor-p
Todos (n =1248)							
CMMO (n =640)	1,64 ± 0,74	27,4% (16,2% - 38,7%)	<0,001	32,9% (21,5% - 44,3%)	<0,001	26,8% (15,5% - 38,2%)	<0,001
Placebo (n =608)	1,66 ± 0,92	16,1% (5,4% - 26,8%)	0,012	18,4% (7,7% - 29,1%)	0,038	10,5% (0,1% - 21,2%)	0,031
Alvo (n = 269)							
CMMO (n = 134)	1,38 ± 0,71	26,4% (10% - 42,8%)	<0,001	42,9% (26,1% - 59,7%)	<0,001	55,4% (39,2% - 71,6%)	<0,001
Placebo (n = 135)	1,42 ± 0,86	19,7% (5,2% - 34,2%)	0,012	15,8% (1,4% - 30,2%)	0,038	13,2% (-1,6% - 28%)	0,092
Adjacente (n = 397)							
CMMO (n = 200)	1,58 ± 0,67	28,1% (14,3% - 42%)	<0,001	38,5% (24,2% - 52,8%)	<0,001	32,1% (18,2% - 46,1%)	<0,001
Placebo (n = 197)	1,71 ± 1,06	12,1% (-0,7% - 24,2%)	0,055	16,7% (3,9% - 29,5%)	0,007	9,5% (-3,4% - 22,4%)	0,127
Remoto (n = 582)							
CMMO (n = 306)	1,82 ± 0,78	24,4% (12,5% - 36,4%)	<0,001	23,7% (11,6% - 35,8%)	<0,001	10,8% (-1,2% - 22,9%)	0,081
Placebo (n = 276)	1,78 ± 0,80	20% (7,1% - 32,8%)	<0,001	23,1% (10,3% - 35,9%)	<0,001	9% (-3,7% - 21,7%)	0,094

*Símbolo maios ou menos representa média ± desvio padrão

Tabela 6 - Efeito ajustado do tratamento no CFR ao longo do seguimento clínico de acordo com o tipo de segmento miocárdico

	1 mês	6 meses	12 meses
	Efeito do tratamento no CFR	Efeito do tratamento no CFR	Efeito do tratamento no CFR
	(valor-p)	(valor-p)	(valor-p)
Alvo	6,7% (p = 0,681)	34,3% (p = 0,033)	56,6% (p < 0,001)
Adjacente	24,0% (p = 0,095)	32,4% (p = 0,025)	34,8% (p = 0,015)
Remoto	-6,8% (p = 0,604)	7,3% (p = 0,571)	15,2% (p = 0,231)

Modelo linear misto ajustado para os valores basais de CFR, espessura da parede miocárdica, extensão de fibrose e quantidade de enxertos recebidos. Transformação logarítmica natural foi usada para adequação de premissas de normalidade e/ou homocedasticidade dos resíduos.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Em pacientes com doença isquêmica crônica do coração por DAC difusa, até a presente data, os estudos clínicos têm testado terapia celular de duas formas: 1) isoladamente em pacientes com angina refratária; 2) ou em combinação com revascularização direta para aqueles elegíveis para um procedimento completo^(52, 53). O desenho do MiHeart/IHD incluiu pacientes submetidos à CRM incompleta para testar os efeitos do CMMO em áreas consideradas impróprias para revascularização direta. Neste subestudo do MiHeart/IHD, utilizando-se perfusão quantitativa com RMC, nós podemos demonstrar dois resultados novos e importantes. Primeiramente, a injeção de CMMO foi associada com aumento de CFR em regiões do miocárdio inadequadas tecnicamente à revascularização direta por conta da complexidade da doença, sendo tal efeito sustentado e progressivo ao longo dos 12 meses de seguimento. Em segundo lugar, nos segmentos miocárdicos adjacentes aos locais injetados, CMMO produziu efeitos persistentes e sinérgicos (com a revascularização direta) no CFR ao longo do tempo.

Em pacientes com sintomas limitantes de angina, em tratamento clínico otimizado e sem qualquer opção de revascularização miocárdica (angina refratária), evidências consistentes têm mostrado que a terapia celular se associa com melhora significativa de sintomas e/ou na tolerância ao exercício⁽⁵⁴⁻⁵⁸⁾. No entanto, o efeito benéfico da terapia celular na perfusão miocárdica - avaliado por SPECT nestes estudos – tem sido surpreendentemente decepcionante, com dados positivos (mas não sustentados em um seguimento de maior tempo) em apenas alguns estudos

clínicos fase II. No estudo ACT34-CMI com 167 pacientes, por exemplo, o CMMO foi associado com melhora significativa dos defeitos de perfusão induzidos por estresse pelo SPECT aos 6 meses de seguimento. Entretanto, efeitos positivos da terapia celular na perfusão não alcançaram significância estatística aos 12 meses, apesar da melhora significativa de sintomas neste ponto do tempo ⁽⁵⁴⁾. Em outro estudo clínico com 50 pacientes randomizados e seguimento relativamente menor (3 meses), Ramshorst et. al. mostraram que o número de segmentos miocárdicos com melhora de perfusão miocárdica (avaliada por SPECT) foi três vezes maior no grupo CMMO quando comparado com o grupo placebo (57% versus 20%, $p < 0,001$) ⁽⁵⁵⁾. Por outro lado, estudos clínicos com um número mais limitado de pacientes, incluindo o recém-publicado REGENT-VSEL, não revelaram significância estatística nos efeitos do tratamento celular na perfusão por SPECT em nenhum momento durante o seguimento ^(56, 59).

Nosso estudo é o primeiro a demonstrar efeitos benéficos persistentes do CMMO através da avaliação da perfusão quantitativa por RMC. Nos segmentos miocárdicos alvos, o tratamento com CMMO foi associado com um aumento adicional de 27% e 42% do CFR em comparação com o placebo aos 6 e 12 meses após o tratamento, respectivamente. Algumas características específicas desse subestudo provavelmente explicam as diferenças (em termos de significância estatística e magnitude de efeito) entre nossos resultados e os estudos clínicos supracitados. Em primeiro lugar, ao contrário de pacientes com angina refratária em que não há possibilidade de qualquer tipo de revascularização, os efeitos nos segmentos alvos observados neste subestudo do MiHeart/IHD foram potencialmente

amplificados pela colateralização proveniente de enxertos implantados em outras artérias coronárias. Em segundo lugar, pacientes com DAC difusa, sejam eles elegíveis a um procedimento incompleto ou “sem opção”, provavelmente têm disfunção microvascular ⁽⁸⁾. Neste cenário, o SPECT é reconhecido pela sua capacidade limitada na detecção de alterações no fluxo miocárdico a nível microvascular, além da subestimação da extensão de isquemia em situações de “isquemia balanceada” (também muito provável nesta população de estudo) e diante da presença de áreas de infarto miocárdico (apesar de pequena extensão, 40% dos segmentos miocárdicos deste subestudo apresentaram áreas de infarto miocárdico) ⁽⁶⁰⁻⁶³⁾.

Por outro lado, o CFR por RMC mede os efeitos hemodinâmicos na perfusão miocárdica tanto da estenose epicárdica focal quanto da doença de pequenos vasos. Portanto, essa métrica quantitativa parece ser a mais adequada para documentar os efeitos do tratamento do CMMO neste grupo de pacientes com doença difusa, sobretudo nas regiões miocárdicas classificadas como alvos, uma vez que um dos principais mecanismos de ação da terapia celular compreende o aumento da densidade capilar e a recuperação da função microvascular ^(64, 65).

Os achados nos segmentos miocárdicos alvos têm algumas implicações clínicas. Primeiro, antes do procedimento, esses segmentos apresentavam, em média, valores bem diminuídos de CFR ($1,40 \pm 0,79$), o que demonstra a importância regional destas áreas em relação ao valor global do CFR. Valores globais de CFR abaixo de 1,5 estão associados com um risco de mortalidade cardiovascular 6 vezes maior ⁽⁶⁶⁾. Taquetti et al, em um estudo observacional com 329 pacientes em

importante centro dos Estados Unidos, foram um dos primeiros autores a demonstrar a importância do CFR global como um preditor independente de eventos adversos cardiovasculares maiores ⁽⁵¹⁾. Mais importante, esses ⁽⁵¹⁾ e, recentemente, outros autores ⁽⁵⁰⁾ mostraram que uma revascularização mais completa em indivíduos com um CFR globalmente reduzido está associada com melhor prognóstico quando comparado com aqueles com procedimento incompleto. Além disso, sabe-se que pacientes com estenose epicárdica focal com limitação de fluxo ($\text{FFR} < 0.8$) mas com CFR global preservado ($\text{CFR} > 2$) não necessariamente têm um pior prognóstico a longo prazo ⁽⁶⁷⁾. Tomadas todas essas informações em conjunto, como o CMMO aumentou (de maneira progressiva) o CFR em regiões do miocárdio consideradas impróprias para receber um enxerto, nossos achados indicam que este tratamento pode alterar favoravelmente a história natural desses pacientes.

Vale ressaltar também que nosso estudo demonstra que segmentos miocárdicos remotos (receberam um enxerto em sua grande maioria) apresentaram uma melhora pequena, se não nenhuma, no CFR após 12 meses da CRM. Isso destaca a gravidade da doença microvascular nesses pacientes. Mais importante, sugere que o CMMO pode ser considerado em associação com a CRM no cenário clínico de DAC difusa e suspeita de envolvimento de pequenos vasos, pelo menos para aliviar a isquemia, o que requer investigação adicional em estudos clínicos desenhados especificamente para responder essa pergunta.

O fato de termos encontrado um efeito sinérgico no CFR nos segmentos miocárdicos adjacentes aos locais da injeção de CMMO também foi relevante. De fato, o valor aditivo do CMMO sobre a revascularização direta na doença isquêmica

crônica do coração já foi demonstrado anteriormente ⁽⁶⁸⁾, mas foi principalmente atribuído a efeitos locais à injeção ⁽⁶⁹⁾. O estudo PROMETHEUS, com desenho similar ao MiHeart/IHD, mas usando células-tronco mesenquimais (MSC), foi suspenso com apenas 6 pacientes incluídos no grupo MSC ⁽⁷⁰⁾. Os resultados foram inconclusivos dada a falta de grupo controle. No entanto, os autores mostraram um achado interessante de que as MSC atuam mais no local da injeção, mas um efeito relevante também foi observado nos segmentos adjacentes, incluindo melhora na perfusão ⁽⁷⁰⁾. Nós podemos confirmar este achado com o uso de CMMO em nosso estudo, mostrando um efeito significativo e persistente nessas áreas circunvizinhas ao longo do tempo.

Nosso trabalho também traz evidências da importância da avaliação funcional, sobretudo com métodos quantitativos, após um procedimento de revascularização miocárdica para avaliação de isquemia residual. Previamente, Arnold et al já mostraram que um número significativo de pacientes com DAC multiarterial após uma revascularização definida bem-sucedida por angiografia invasiva apresentam uma carga de isquemia alta quando avaliados por perfusão quantitativa por RMC ⁽⁴⁰⁾. Estes autores apontaram que apenas um pouco mais de 1/3 dos pacientes obtiveram revascularização completa com base em critérios funcionais, comparado com quase 2/3 na avaliação angiográfica (38,8% versus 62,7%; $p = 0,015$), demonstrando que a angiografia invasiva pode subestimar a isquemia residual após revascularização em pacientes com DAC multiarterial ⁽⁴⁰⁾.

Por fim, deve-se salientar que, para a quantificação da perfusão por RMC, o tempo de aquisição, o pós-processamento de imagens (muitas vezes apresentam

movimentos respiratórios que tornam laborioso e demorado o processo de desenho dos contornos epicárdicos/endocárdicos), a falta de disponibilidade de soluções comerciais para o cálculo do FSM são fatores que dificultam sua aplicação na prática clínica, sendo a avaliação quantitativa restrita à pesquisa nos últimos anos. Por outro lado, recentemente, foi desenvolvido um novo método de perfusão miocárdica por RMC, com correção de movimento respiratório e mapeamento automático dos contornos, permitindo aquisição em respiração livre e quantificação integrada do FSM ⁽⁷¹⁾. Dados recentes indicam que essa técnica apresenta boa reprodutibilidade em indivíduos saudáveis ⁽⁷²⁾ e pode detectar de forma acurada tanto a DAC fisiologicamente significativa definida por FFF como avaliar a doença microvascular através do CFR ⁽⁷³⁾.

5.1 Limitações

A principal limitação deste subestudo foi o número considerável de pacientes do MiHeart/IHD sem RMC apropriada para quantificação da perfusão no início do estudo. Esses pacientes apresentavam menos comorbidades, menor prevalência de sintomas limitantes de angina e, portanto, recebiam menos medicações antianginosas. Tal potencial viés de seleção deve ser levado em consideração na interpretação dos nossos resultados. Outro ponto que deve ser salientado é que nenhuma medida invasiva, como FFR ou índice de resistência microcirculatória, foi realizada no estudo MiHeart/IHD, o que poderia fornecer um status mais completo da doença epicárdica e da função de microcirculação.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Neste subestudo com quantificação de perfusão por RMC, a injeção intramiocárdica de CMMO em regiões miocárdicas consideradas inapropriadas para revascularização miocárdica direta (e gravemente isquêmicas) levou aos mais significativos aumentos de CFR que progrediram até 12 meses, em comparação a alterações de CFR menores mas persistentes em segmentos miocárdicos adjacentes, e nenhuma melhora em segmentos remotos. Esses resultados sugerem que o CMMO leva primariamente ao remodelamento microvascular positivo no miocárdio isquêmico de pacientes com DAC difusa.

REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

1. Global Health Estimates 2016: Disease burden by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2016. Geneva: World Heal Organ; 2018.
2. Moran AE, Forouzanfar MH, Roth G a., Mensah G a., Ezzati M, Murray CJL, et al. Temporal trends in ischemic heart disease mortality in 21 world regions, 1980 to 2010: The global burden of disease 2010 study. *Circulation*. 2014 Apr 8;129(14):1483-92.
3. GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* (London, England). 2015 Jan 10;385(9963):117-71.
4. Fihn SD, Blankenship JC, Alexander KP, Bittl JA, Byrne JG, Fletcher BJ, et al. 2014 ACC/AHA/AATS/PCNA/SCAI/STS Focused update of the guideline for the diagnosis and management of patients with stable ischemic heart disease. *J Am Coll Cardiol*. 2014 Nov;64(18):1929-49.
5. Garcia S, Sandoval Y, Roukoz H, Adabag S, Canoniero M, Yannopoulos D, et al. Outcomes after complete versus incomplete revascularization of patients with multivessel coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2013 Oct 15;62(16):1421-31.
6. Van den Brand MJB, Rensing BJWM, Morel MAM, Foley DP, De Valk V, Breeman A, et al. The effect of completeness of revascularization on event-free survival at one year in the ARTS trial. *J Am Coll Cardiol*. 2002;39(4):559-64.

7. Vieira RD, Hueb W, Gersh BJ, Lima EG, Pereira AC, Rezende PC, et al. Effect of complete revascularization on 10-year survival of patients with stable multivessel coronary artery disease: MASS II Trial. *Circulation*. 2012 Sep 11;126(11_suppl_1):S158-63.
8. Gould KL, Johnson NP, Kaul S, Kirkeeide RL, Mintz GS, Rentrop KP, et al. Patient selection for elective revascularization to reduce myocardial infarction and mortality. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2015 May;8(5).
9. Taqueti VR, Hachamovitch R, Murthy VL, Naya M, Foster CR, Hainer J, et al. Global coronary flow reserve is associated with adverse cardiovascular events independently of luminal angiographic severity and modifies the effect of early revascularization. *Circulation*. 2015;131(1):19-27.
10. Ford TJ, Corcoran D, Berry C. Coronary artery disease: physiology and prognosis. *Eur Heart J*. 2017 Jul 1;38(25):1990-2.
11. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001 Apr 5;410(6829):701-5.
12. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Köstering M, Hernandez A, Sorg R V, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation*. 2002 Oct 8;106(15):1913-8.
13. Perin EC, Dohmann HFR, Borojevic R, Silva SA, Sousa ALS, Mesquita CT, et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation*. 2003 May 13;107(18):2294-302.

14. Schächinger V, Erbs S, Elsässer A, Haberbosch W, Hambrecht R, Hölschermann H, et al. Intracoronary bone marrow–derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2006 Sep 21;355(12):1210-21.
15. Schuleri KH, Amado LC, Boyle AJ, Centola M, Saliaris AP, Gutman MR, et al. Early improvement in cardiac tissue perfusion due to mesenchymal stem cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008 May;294(5):H2002-11.
16. Martin-Rendon E, Brunskill SJ, Hyde CJ, Stanworth SJ, Mathur A, Watt SM. Autologous bone marrow stem cells to treat acute myocardial infarction: a systematic review. *Eur Heart J*. 2008 Aug;29(15):1807-18.
17. Ramshorst J Van, Antoni ML, Beeres SLM a, Roes SD, Delgado V, Rodrigo SF, et al. Intramyocardial bone marrowderived mononuclear cell injection for chronic myocardial ischemia: The effect on diastolic function. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2011;4(2):122-9.
18. Jeevanantham V, Butler M, Saad A, Abdel-Latif A, Zuba-Surma EK, Dawn B. Adult bone marrow cell therapy improves survival and induces long-term improvement in cardiac parameters: a systematic review and meta-analysis. *Circulation*. 2012 Jul 31;126(5):551-68.
19. Mann I, Rodrigo SF, van Ramshorst J, Beeres SL, Dibbets-Schneider P, de Roos A, et al. Repeated intramyocardial bone marrow cell injection in previously responding patients with refractory angina again improves myocardial perfusion, anginal complaints, and quality of life. *Circ Cardiovasc Interv*. 2015 Aug;8(8).

-
20. Isner JM, Asahara T, Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med*. 1999 Apr 1;5(4):434-8.
 21. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* [Internet]. 2001 Apr 1;7(4):430-6.
 22. Khan AR, Farid TA, Pathan A, Tripathi A, Ghafghazi S, Wysoczynski M, et al. Impact of cell therapy on myocardial perfusion and cardiovascular outcomes in patients with angina refractory to medical therapy: novelty and significance. *Circ Res*. 2016 Mar 18;118(6):984-93.
 23. Tura BR, Martino HF, Gowdak LH, dos Santos RR, Dohmann HF, Krieger JE, et al. Multicenter randomized trial of cell therapy in cardiopathies – MiHeart Study. *Trials*. 2007 Dec;8(1):2.
 24. Jerosch-Herold M, Swingen C, Seethamraju RT. Myocardial blood flow quantification with MRI by model-independent deconvolution. *Med Phys*. 2002 Apr 19;29(5):886-97.
 25. Selvanayagam JB, Jerosch-Herold M, Porto I, Sheridan D, Cheng ASH, Petersen SE, et al. Resting myocardial blood flow is impaired in hibernating myocardium: a magnetic resonance study of quantitative perfusion assessment. *Circulation*. 2005 Nov 22;112(21):3289-96.

-
26. Cheng ASH, Selvanayagam JB, Jerosch-Herold M, van Gaal WJ, Karamitsos TD, Neubauer S, et al. Percutaneous treatment of chronic total coronary occlusions improves regional hyperemic myocardial blood flow and contractility. *JACC Cardiovasc Interv.* 2008 Feb;1(1):44-53.
 27. Patel AR, Antkowiak PF, Nandalur KR, West AM, Salerno M, Arora V, et al. Assessment of advanced coronary artery disease: Advantages of quantitative cardiac magnetic resonance perfusion analysis. *J Am Coll Cardiol.* 2010;56(7):561-9.
 28. Arnold JR, Francis JM, Karamitsos TD, Lim CC, van Gaal WJ, Testa L, et al. Myocardial perfusion imaging after coronary artery bypass surgery using cardiovascular magnetic resonance: a validation study. *Circ Cardiovasc Imaging.* 2011 May 1;4(3):312-8.
 29. Arnold JR, Karamitsos TD, van Gaal WJ, Testa L, Francis JM, Bhamra-Ariza P, et al. Residual ischemia after revascularization in multivessel coronary artery disease: insights from measurement of absolute myocardial blood flow using magnetic resonance imaging compared with angiographic assessment. *Circ Cardiovasc Interv.* 2013 Jun 1;6(3):237-45.
 30. Kramer CM, Barkhausen J, Flamm SD, Kim RJ, Nagel E, Protocols S for CMRB of TTF on S. Standardized cardiovascular magnetic resonance (CMR) protocols 2013 update. *J Cardiovasc Magn Reson.* 2013;15(1):91.
 31. Jerosch-Herold M. Quantification of myocardial perfusion by cardiovascular magnetic resonance. *J Cardiovasc Magn Reson.* 2010 Dec 8;12(1):57.

-
32. Ferreira P, Gatehouse P, Bucciarelli-Ducci C, Wage R, Firmin D. Measurement of myocardial frequency offsets during first pass of a gadolinium-based contrast agent in perfusion studies. *Magn Reson Med*. 2008 Oct;60(4):860-70.
 33. Ishida M, Ichihara T, Nagata M, Ishida N, Takase S, Kurita T, et al. Quantification of myocardial blood flow using model based analysis of first-pass perfusion MRI: extraction fraction of Gd-DTPA varies with myocardial blood flow in human myocardium. *Magn Reson Med*. 2011 Nov;66(5):1391-9.
 34. Pack NA, DiBella EVR. Comparison of myocardial perfusion estimates from dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging with four quantitative analysis methods. *Magn Reson Med*. 2010 Jul;64(1):125-37.
 35. Jerosch-Herold M, Wilke N, Stillman AE, Wilson RF. Magnetic resonance quantification of the myocardial perfusion reserve with a Fermi function model for constrained deconvolution. *Med Phys*. 1998 Jan;25(1):73-84.
 36. Vallée JP, Lazeyras F, Kasuboski L, Chatelain P, Howarth N, Righetti A, et al. Quantification of myocardial perfusion with FAST sequence and Gd bolus in patients with normal cardiac function. *J Magn Reson Imaging*. 1999 Feb;9(2):197-203.
 37. Kurita T, Sakuma H, Onishi K, Ishida M, Kitagawa K, Yamanaka T, et al. Regional myocardial perfusion reserve determined using myocardial perfusion magnetic resonance imaging showed a direct correlation with coronary flow velocity reserve by Doppler flow wire. *Eur Heart J*. 2009 Feb;30(4):444-52.

38. Biglands JD, Magee DR, Sourbron SP, Plein S, Greenwood JP, Radjenovic A. Comparison of the diagnostic performance of four quantitative myocardial perfusion estimation methods used in cardiac MR imaging: CE-MARC Substudy. *Radiology*. 2015 May;275(2):393-402.
39. Jerosch-Herold M, Sheridan DC, Kushner JD, Nauman D, Burgess D, Dutton D, et al. Cardiac magnetic resonance imaging of myocardial contrast uptake and blood flow in patients affected with idiopathic or familial dilated cardiomyopathy. *Am J Physiol Circ Physiol*. 2008 Sep;295(3):H1234-42.
40. Arnold JR, Karamitsos TD, van Gaal WJ, Testa L, Francis JM, Bhamra-Ariza P, et al. Residual ischemia after revascularization in multivessel coronary artery disease. *Circ Cardiovasc Interv*. 2013 Jun;6(3):237-45.
41. Petersen SE, Jerosch-Herold M, Hudsmith LE, Robson MD, Francis JM, Doll HA, et al. Evidence for microvascular dysfunction in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 2007 May 8;115(18):2418-25.
42. Selvanayagam JB, Jerosch-Herold M, Porto I, Sheridan D, Cheng ASH, Petersen SE, et al. Resting myocardial blood flow is impaired in hibernating myocardium: A magnetic resonance study of quantitative perfusion assessment. *Circulation*. 2005;112(21):3289-96.
43. Singh A, Greenwood JP, Berry C, Dawson DK, Hogrefe K, Kelly DJ, et al. Comparison of exercise testing and CMR measured myocardial perfusion reserve for predicting outcome in asymptomatic aortic stenosis: the PRognostic Importance of Microvascular Dysfunction in Aortic Stenosis (PRIMID AS) Study. *Eur Heart J*. 2017 Apr 21;38(16):1222-9.

-
44. Schelbert HR, Czernin J, Müller P, Chan S, Brunken RC, Porenta G, et al. Influence of age and hemodynamics on myocardial blood flow and flow reserve. *Circulation*. 1993;88(1):62-9.
 45. Uren NG, Melin JA, De Bruyne B, Wijns W, Baudhuin T, Camici PG. Relation between myocardial blood flow and the severity of coronary-artery stenosis. *N Engl J Med*. 1994 Jun 23;330(25):1782-8.
 46. Cerqueira MD, Weissman NJ, Dilsizian V, Jacobs AK, Kaul S, Laskey WK, et al. Standardized myocardial segmentation and nomenclature for tomographic imaging of the heart. *Circulation*. 2002 Jan 29;105(4):539-42.
 47. Fitzmaurice GM, Ravichandran C. A primer in longitudinal data analysis. *Circulation*. 2008 Nov 4;118(19):2005-10.
 48. Treasure CB, Klein JL, Vita JA, Manoukian S V, Renwick GH, Selwyn AP, et al. Hypertension and left ventricular hypertrophy are associated with impaired endothelium-mediated relaxation in human coronary resistance vessels. *Circulation*. 1993 Jan;87(1):86-93.
 49. Cogle CR, Wise E, Meacham AM, Zierold C, Traverse JH, Henry TD, et al. Detailed analysis of bone marrow from patients with ischemic heart disease and left ventricular dysfunction BM CD34, CD11b, and clonogenic capacity as biomarkers for clinical outcomes. *Circ Res*. 2014;115(10):867-74.
 50. Aikawa T, Naya M, Obara M, Manabe O, Magota K, Koyanagawa K, et al. Effects of coronary revascularization on global coronary flow reserve in stable coronary artery disease. *Cardiovasc Res*. 2019 Jan 1;115(1):119-29.

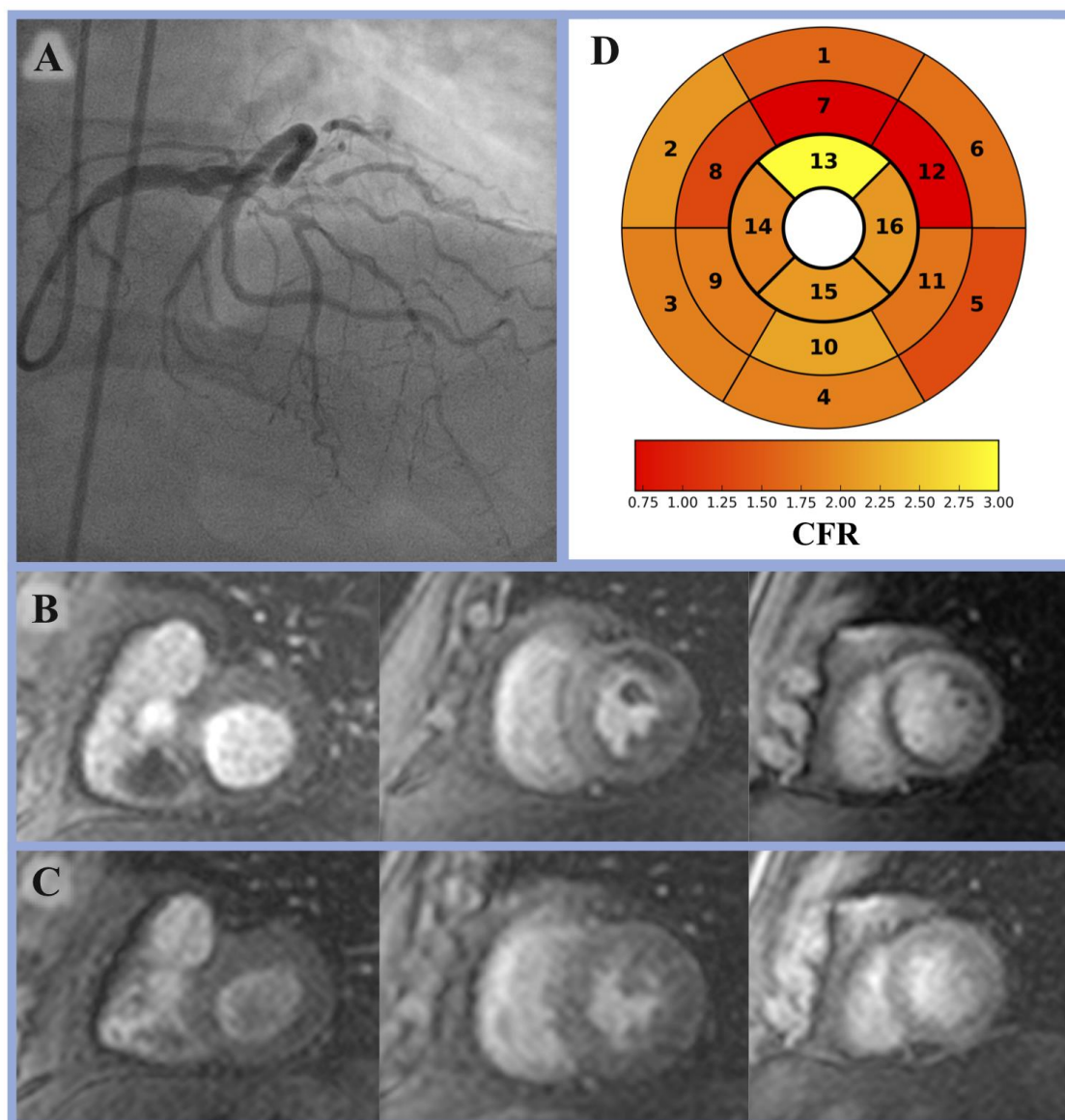
-
51. Taqueti VR, Hachamovitch R, Murthy VL, Naya M, Foster CR, Hainer J, et al. Global coronary flow reserve is associated with adverse cardiovascular events independently of luminal angiographic severity and modifies the effect of early revascularization. *Circulation*. 2015 Jan 6;131(1):19-27.
 52. Nguyen PK, Rhee J-W, Wu JC. Adult stem cell therapy and heart failure, 2000 to 2016. *JAMA Cardiol*. 2016 Oct 1;1(7):831.
 53. Zhao Q, Ye X. Additive value of adult bone-marrow-derived cell transplantation to conventional revascularization in chronic ischemic heart disease: a systemic review and meta-analysis. *Expert Opin Biol Ther*. 2011 Dec 8;11(12):1569-79.
 54. Losordo DW, Henry TD, Davidson C, Sup Lee J, Costa M a., Bass T, et al. Intramyocardial, autologous CD34+ cell therapy for refractory angina. *Circ Res*. 2011;109(4):428-36.
 55. van Ramshorst J, Bax JJ, Beeres SLMA, Dibbets-Schneider P, Roes SD, Stokkel MPM, et al. Intramyocardial bone marrow cell injection for chronic myocardial ischemia. *JAMA*. 2009 May 20;301(19):1997.
 56. Tse H-F, Thambar S, Kwong Y-L, Rowlings P, Bellamy G, McCrohon J, et al. Prospective randomized trial of direct endomyocardial implantation of bone marrow cells for treatment of severe coronary artery diseases (PROTECT-CAD trial). *Eur Heart J*. 2007 Dec 5;28(24):2998-3005.
 57. Jimenez-Quevedo P, Gonzalez-Ferrer JJ, Sabate M, Garcia-Moll X, Delgado-Bolton R, Llorente L, et al. Selected CD133⁺ Progenitor Cells to promote angiogenesis in patients with refractory angina. *Circ Res*. 2014 Nov 7;115(11):950-60.

-
58. Wang S, Cui J, Peng W, Lu M. Intracoronary autologous CD34⁺ stem cell therapy for intractable angina. *Cardiology*. 2010;117(2):140-7.
 59. Wojakowski W, Jadczyk T, Michalewska-Włodarczyk A, Parma Z, Markiewicz M, Rychlik W, et al. Effects of transendocardial delivery of bone marrow-derived CD133⁺ cells on left ventricle perfusion and function in patients with refractory angina. *Circ Res*. 2017 Feb 17;120(4):670-80.
 60. Ragosta M, Bishop AH, Lipson LC, Watson DD, Gimple LW, Sarembock IJ, et al. Comparison between angiography and fractional flow reserve versus single-photon emission computed tomographic myocardial perfusion imaging for determining lesion significance in patients with multivessel coronary disease. *Am J Cardiol*. 2007 Apr;99(7):896-902.
 61. Foley JRJ, Kidambi A, Biglands JD, Maredia N, Dickinson CJ, Plein S, et al. A comparison of cardiovascular magnetic resonance and single photon emission computed tomography (SPECT) perfusion imaging in left main stem or equivalent coronary artery disease: a CE-MARC substudy. *J Cardiovasc Magn Reson*. 2017;19.
 62. Reyes E. Detection of left main stem and three-vessel coronary artery disease by myocardial perfusion SPECT imaging. *EuroIntervention*. 2010 May;6 Suppl G:G72-8.
 63. Zheng M, Liu Y, Wei M, Wu Y, Zhao H, Li J. Low concentration contrast medium for dual-source computed tomography coronary angiography by a combination of iterative reconstruction and low-tube-voltage technique: Feasibility study. *Eur J Radiol*. 2014;83(2):e92-9.

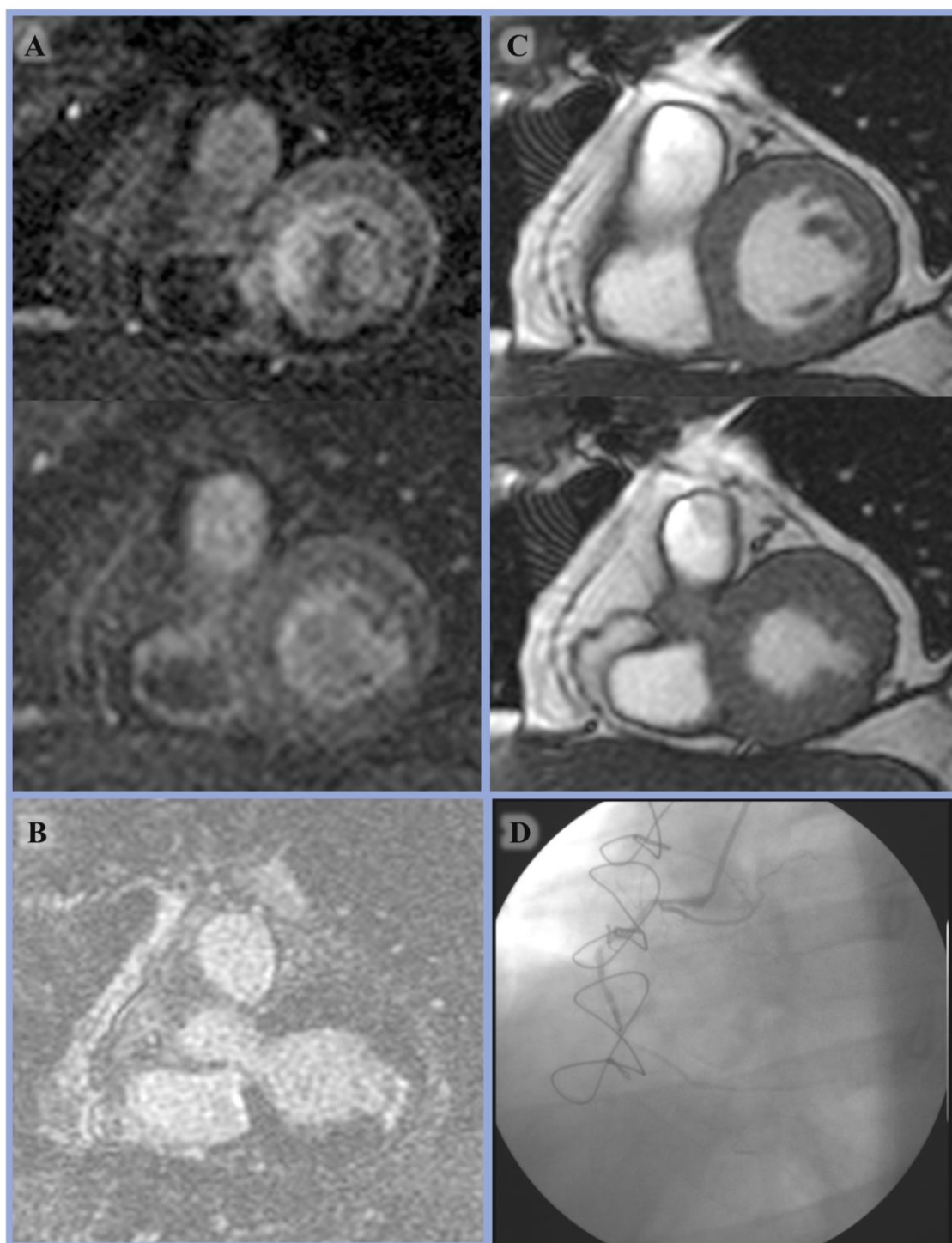
-
64. Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, Meade V, Fenoglio A, Mortell K, et al. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood*. 2004;104(9):2752-60.
 65. Fadini GP, Losordo D, Dimmeler S. Critical reevaluation of endothelial progenitor cell phenotypes for therapeutic and diagnostic use. *Circ Res*. 2012;110(4):624-37.
 66. Murthy VL, Naya M, Foster CR, Hainer J, Gaber M, Di Carli G, et al. Improved cardiac risk assessment with noninvasive measures of coronary flow reserve. *Circulation*. 2011 Nov 15;124(20):2215-24.
 67. Van De Hoef TP, Van Lavieren MA, Damman P, Delewi R, Piek MA, Chamuleau SAJ, et al. Physiological basis and long-term clinical outcome of discordance between fractional flow reserve and coronary flow velocity reserve in coronary stenoses of intermediate severity. *Circ Cardiovasc Interv*. 2014;7(3):301-11.
 68. Zhao Q, Ye X. Additive value of adult bone-marrow-derived cell transplantation to conventional revascularization in chronic ischemic heart disease: a systemic review and meta-analysis. *Expert Opin Biol Ther*. 2011 Dec 8;11(12):1569-79.
 69. Stamm C, Kleine H-D, Choi Y-H, Dunkelmann S, Lauffs J-A, Lorenzen B, et al. Intramyocardial delivery of CD133+ bone marrow cells and coronary artery bypass grafting for chronic ischemic heart disease: Safety and efficacy studies. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2007 Mar;133(3):717-725.e5.

-
70. Karantalis V, DiFede DL, Gerstenblith G, Pham S, Symes J, Zambrano JP, et al. Autologous mesenchymal stem cells produce concordant improvements in regional function, tissue perfusion and fibrotic burden when administered to patients undergoing coronary artery bypass grafting - The prometheus trial. *Circ Res.* 2014;016960.
 71. Kellman P, Hansen MS, Nielles-Vallespin S, Nickander J, Themudo R, Ugander M, et al. Myocardial perfusion cardiovascular magnetic resonance: optimized dual sequence and reconstruction for quantification. *J Cardiovasc Magn Reson.* 2017 Apr 7;19(1):43.
 72. Brown LAE, Onciul SC, Broadbent DA, Johnson K, Fent GJ, Foley JRJ, et al. Fully automated, inline quantification of myocardial blood flow with cardiovascular magnetic resonance: repeatability of measurements in healthy subjects. *J Cardiovasc Magn Reson.* 2018 Dec 9;20(1):48.
 73. Kotecha T, Martinez-Naharro A, Boldrini M, Knight D, Hawkins P, Kalra S, et al. Automated pixel-wise quantitative myocardial perfusion mapping by CMR to detect obstructive coronary artery disease and coronary microvascular dysfunction. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2019 Feb.

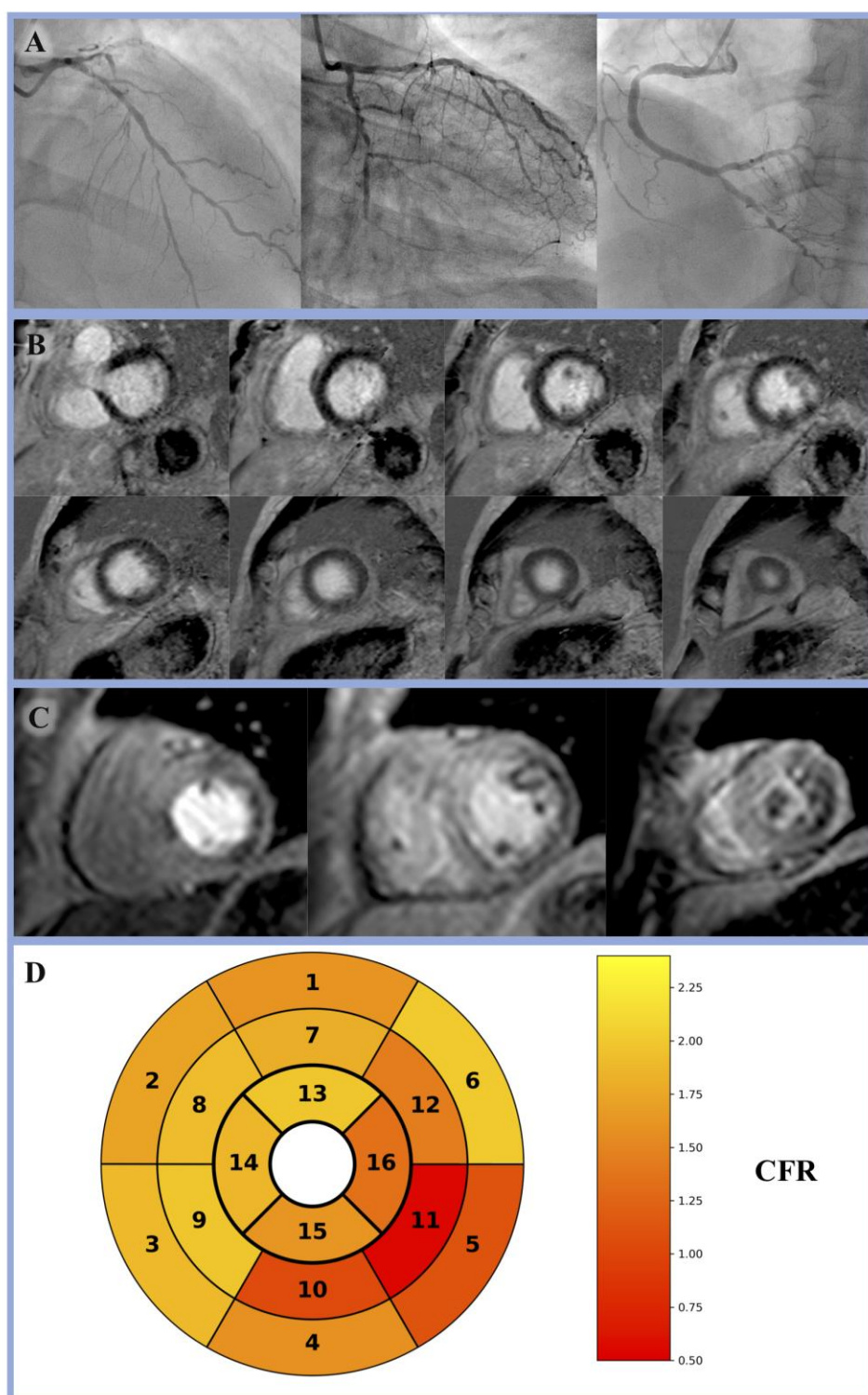
APÊNDICES



Apêndice 1 – Caso clínico representativo demonstrando a doença arterial coronariana epicárdica difusa associada à grande extensão de isquemia. Lesões coronárias obstrutivas e leitos distais finos na angiografia invasiva (A). Ressonância magnética no estresse (B) e repouso (C) mostrando extensa área de isquemia miocárdica por análise visual, e os resultados do CFR no gráfico tipo *Bullseye* (D).



Apêndice 2 - Caso clínico representativo demonstrando extensa área de isquemia (A, em cima estresse e abaixo repouso) e pequena área de infarto no segmento ínfero-lateral basal (B) na RMC. A contratilidade está preservada nas áreas isquêmicas, mas reduzida (com acinesia) na área com infarto miocárdio (C). Na angiografia invasiva (D), observa-se a doença epicárdica com estenoses focais na coronária direita, apresentando leitos distais finos e impróprios para revascularização direta.



Apêndice 3 – Caso clínico representativo do estudo demonstrando DAC difusa na angiografia invasiva (A), ausência de infarto miocárdico (B) com extensa área de déficit de perfusão ao estresse (C) na RMC. Gráfico tipo *Bullseye* confirmando a extensa carga isquêmica do paciente através da quantificação por RMC (D).