**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

Nathan Valle Soubihe Junior

**DESENVOLVIMENTO DE UMA AGULHA
PARA TERAPIA CELULAR E BIÓPSIA
DIRETA OU PERCUTÂNEA DO CORAÇÃO**

**Ribeirão Preto- SP
2016**

Nathan Valle Soubihe Junior

**DESENVOLVIMENTO DE UMA AGULHA PARA
TERAPIA CELULAR E BIÓPSIA DIRETA OU
PERCUTÂNEA DO CORAÇÃO**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
da Universidade de São Paulo, para
obtenção do **Título de Mestre**.

Área de Concentração: Clínica cirúrgica

Orientador: **Prof. Dr. Paulo Roberto B. Evora**

**"Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que
aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)".**

**RIBEIRÃO PRETO
2016**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo, pesquisa, desde que citada à fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Nathan Valle Soubihe Junior

Desenvolvimento de uma agulha para terapia celular e biópsia direta ou percutânea do coração, 2016.

60 p.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Orientador: Evora, Paulo Roberto Barbosa

1.células tronco. 2. infarto do miocárdio. 3. biópsia. 4. miocárdio. 5. punção do coração.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nathan Valle Soubihe Junior

DESENVOLVIMENTO DE UMA AGULHA PARA TERAPIA CELULAR E BIÓPSIA DIRETA OU PERCUTÂNEA DO CORAÇÃO

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo,
para obtenção do **Título de Mestre**.

Área de Concentração: Clínica Cirúrgica

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

EPÍGRAFE

*“Nenhuma grande descoberta
foi feita jamais sem um palpite ousado”*

Sir Isaac Newton

“A ciência é exatamente como a fé!

Primeiro se crê, depois se vê!”

Nathan Valle Soubiê Junior

DEDICATÓRIA ESPECIAL

*A figura de meu pai, o médico Nathan Valle Soubiê, *1929, +1998, sempre foi definitivamente a mais marcante em minha vida. Confesso que eu o conhecia muito mais como pai, o que já era bastante. O Dr. Nathan, era um homem simples, e suas imagens mais presentes em minha memória ainda são as das tardes de sábados construindo cercas na chácara, ou jogando bola no campinho de futebol, cujo gramado, inúmeras vezes aparamos juntos, após horas afiando as “facas” da máquina de contar grama.*

Ele sempre estava sem camisa e de shorts verdes, os mesmos que eram seu uniforme no campo de futebol do “campus” da FACULDADE DE MEDICINA DA USP DE RIBEIRÃO PRETO, ou semelhantes aos que usara nas disputas acadêmicas de “santa-pauli-med”, a versão da época de jogos universitários disputados apenas entre a Santa casa de misericórdia, a Escola Paulista de Medicina e a Faculdade de Medicina de Pinheiros da USP. Minha mãe sempre guardou suas medalhas do atletismo e eu tinha ao mesmo tempo orgulho e curiosidade sobre elas.

Juntos eu e ele frequentemente íamos a diversos lugares, e não foram poucas as ocasiões em que mesmo eu ainda sendo pequeno, bem pequeno, o acompanhava em seu Ford- Galaxy LTD as residências, chácaras e até mesmo fazendas de seus inúmeros pacientes para vê-lo consultá-los.

O relato mais impressionante e extremamente frequente que eu ouvia de muitos familiares era: “mamãe, já melhorou só em saber que o Dr. Nathan estava chegando para socorrê-la”.

Certa feita, encontrávamo-nos todos da família em nossa chácara, quando demos falta de meu pai, vimos seu carro deixa-la em velocidade e de imediato percebemos que se tratava de uma urgência médica. Quando de seu retorno, ele nos relatou que sim era uma urgência, o filho mais velho de um de seus mais queridos pacientes encontrava-se em franco desequilíbrio emocional e ameaçava jogar-se do alto do telhado de sua residência de 2 andares. Aos olhos de todos, a

pessoa mais indicada para dissuadi-lo do trágico ideal seria o Médico da família, Dr. Nathan.

Esse era meu pai, um profissional humano acima de tudo, que não hesitou de sujar com sangue de um indigente acidentado na rua os bancos de seu carro que transportava toda sua família, e desviando sua rota, o dirigiu até o hospital mais próximo para salva-lo.

O cientista Nathan Valle Soubiê, era alguém a quem eu conhecia pouco, sua história de vitórias e sucesso na ciência, sua excursão pela Europa apresentando seus trabalhos, ocorreram quando minhas maiores conquistas até então haviam sido provavelmente vencer as fraldas, e manter-me de pé.

Dr. Nathan era para mim muito mais do que qualquer outra coisa, o MEU PAI.

Minha infância foi intensamente permeada pela ciência, pela arte, e pela fé. Meus brinquedos mais usuais eram as caixas de madeira e vidro que continham “bichos barbeiros” espetados por alfinetes em pedaço grandes de isopor. Ou então eram cavaquinhos, chocalhos, e até mesmo o piano (todos os instrumentos de minha mãe e meus irmãos). Éramos uma família musical afinal mamãe ensinava música.

Meu pai tinha no alto de suas estantes, dentre muitos livros, o coração de uma jovem paciente dentro de uma garrafa de vidro embebido em formol. Eu tinha um certo medo. Acho que muito medo.

A Medicina, no entanto, entrou em minha vida já no primário. O primeiro trabalho do qual me lembro, feito sob moldes de “metodologia científica” foi justamente sobre a doença de chagas. Recebi elogios até da madre superiora do Instituto Santa Úrsula de Ribeirão Preto, escola onde fui formado até o ginásio e seu comentário foi: Esse menino vai ser médico. Todas são recordações extremamente vivas em minha mente ainda.

O primeiro relato da grandeza dos trabalhos científicos de meu pai foi feito por mim mãe, num dos nossos almoços de domingo na chácara quando já adolescente e pensando em aprender a dirigir pedi a meu pai que voltasse para casa guiando seu carro. Minha mãe entrevistou e disse: nada disso Nathan, você sabe o que aconteceu com seu pai e seu filho mais velho, respectivamente meu avô Alfredo e meu irmão também Alfredo justamente em sua homenagem.

“O que aconteceu mamãe? ” Ao que ela concluiu: - Seu pai brilhava na Europa apresentando trabalhos científicos e seu irmão e seu avô foram pegos pela “radiopatrulha” com seu irmão, menor de idade ao volante. Foi assim que fiquei sabendo dos feitos extraordinários de meu pai.

No ano de 1985, prestei vestibular para medicina na UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS. Para minha surpresa acabei sendo chamado como o segundo nome da segunda lista, algo raríssimo de acontecer numa universidade como a UNICAMP, pois geralmente todos os aprovados são matriculados. A partir daí meus diálogos com meu pai passaram a tornar-se um pouco mais de médico para aluno de medicina, mas nunca deixaram de ser de melhor amigo para melhor amigo, ou de pai para filho.

Eu não saberei precisar a data, nem ao menos ano, mas me recordo de detalhes como a roupa que meu pai usava e exatamente onde estávamos quando ele me apresentou pela primeira vez o objeto principal de seus árduos e bem-sucedidos trabalhos. Na área de serviço de nossa casa, na mesinha de madeira de passar roupas, ele me expos a sua invenção de cerca de 30 anos antes. SUA AGULHA DE BIÓPSIA DO CORAÇÃO.

Utilizou meus dedos para exemplificar o coração sendo que o dorso deles representava a parede ventricular esquerda externa e a região ventral, a cavidade ventricular e o endocárdio. Por entre mês dedos encurvados formando uma concavidade ele introduziu a agulha, e me apresentou passo a passo a técnica que idealizou para que de forma absolutamente segura e sem risco para o paciente conseguisse extrair do endocárdio uma amostra absolutamente perfeita do músculo para análise. O que mais me impressionou naquele momento foi o fato de fazê-lo com o paciente com seu tórax fechado, e de onde e como meu pai poderia ter pensado em algo tão simples e ao mesmo tempo genial.

Esse foi meu primeiro e mais intenso contato com a ciência investigativa até então.

Após minha formatura, já no exercício da profissão, a despeito da necessidade de dedicar-me a ela como único meio de provisão familiar e subsistência, meu contato com a ciência e o desejo pelo academicismo nunca foram deixados para traz. Busquei sempre estar senão dentro, mas pelo menos ao redor da universidade. Procurei

estágios e cursos, congressos, simpósios e oportunidades para apreender. Dentre as inúmeras atividades científicas a que presenciei, no ano de 2006, Na XXIX Jornada da Sociedade de Cardiologia de Ribeirão Preto, tive a oportunidade de assistir a uma palestra do Prof. Dr. José Eduardo Kriger sobre terapia celular em cardiologia, ocasião em que o mesmo apresentou resultados de inúmeros trabalhos realizados com células tronco, sobretudo aqueles sendo conduzidos sob sua orientação e supervisão no Departamento de Genética Médica do Instituto do Coração da Faculdade de Medicina de São Paulo (INCOR)^{2,3,10}.

Na ocasião transmitiu resultados promissores obtidos até então, porém alertou para duas dificuldades técnicas a serem superadas. A primeira a escassez de oportunidades para sua utilização em pacientes cardiopatas uma vez que tais procedimentos se faziam utilizando-se agulhas de insulina, sob visão direta e exclusivamente naquelas ocasiões às quais denominou "janelas éticas", como em procedimentos cirúrgicos a céu aberto. A segunda dificuldade relacionava-se percentual numérico relativamente baixo do processo denominado "Homing" das células, que se traduz pela permanência *in loco* do material biológico ali depositado. Informou que pequeno percentual das células implantadas, ali permaneciam, sendo que a enorme maioria era reabsorvida pela circulação sanguínea e, portanto, acabava por ser perdida".

Imediatamente me sobreveio um alerta, "*a resposta era agulha de biópsia de meu pai*". O raciocínio era simples, se há exatos 50 anos, ele havia sido capaz de retirar material biológico com total segurança de animais e humanos para análise fora do miocárdio por meio da agulha que idealizou, eu poderia pelo fato de conhecê-la em detalhes, realizar algumas modificações para, na mesma direção, porém em sentido contrário, introduzir material biológico no músculo cardíaco. Afinal a agulha se demonstrou eficaz e segura, e foi utilizada por inúmeros médicos em todo o mundo na realização de biópsias para diferentes fins¹².

Logo ao término da palestra do Prof. Krieger, eu me dirigi a ele dizendo acreditar ter a solução para uma de suas questões. Ele de forma extremamente gentil, me orientou a procurar por ele em seu gabinete no INCOR em São Paulo para apresentar a ideia. Confesso que minha euforia inicial poucos minutos depois se transformou em

*preocupação. Seria necessária uma modificação, uma adaptação da agulha de biópsia de meu pai, para que ela agora deixasse de ser capaz de cortar parte do miocárdio, se mantivesse inócua ao tecido miocárdico¹², sobretudo as artérias coronárias, mantendo sua principal característica a **segurança** e pudesse ser eficaz no seu principal objetivo, que agora seria introduzir e dispensar no miocárdio o material biológico usado na terapia celular.*

DEDICATÓRIAS

A Memória de Nathan Valle Soubiê e Midelcia Pinheiro Chagas Valle Soubiê. Meu pai, por ser pilar em minha estrutura, humana, familiar, moral, emocional, cristã e agora científica. A minha mãe por ser pilar de caráter e fé em minha vida e na vida de meu pai.

A Nathan, Ruth e Esther, meus filhos pessoas pelas quais vale a pena viver e por quem não hesitaria em dar a vida e todo meu mais profundo amor.

A Alfredo, Mariana, Maria Lúcia e Maria Sílvia (Sílvinha), meus irmãos cujas lembranças de infância me remetem à felicidade e aos princípios aprendidos com meus pais.

A Cleber Caetano, Robert Poole e Abílio Pinheiro Chagas, porque me ensinaram a fé Cristã com autoridade, integridade e profunda dedicação e amor.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Caríssimo Prof. Dr. Paulo Roberto Évora, que tem sido o principal instrumento de credibilidade do projeto, por acreditar na proposta, na ideia e nos ideais que regem cada parágrafo desta obra.

Obrigado por compreender que intentamos por meio da inovação, melhorar a vida dos acometidos por doenças cardíológicas.

Suas orientações, seus puxões de orelha e seu carinho, foram e são alicerces deste projeto.

Minha admiração, minha gratidão pelo senhor, professor são imensas.

Muito obrigado, PROF. ÉVORA.

AGRADECIMENTOS

Ao caríssimo Prof. Dr. José Eduardo Krieger, por preciosas contribuições, disponibilidade em auxiliar com sugestões, e sobretudo pela oportunidade de realizar os primeiros experimentos sem os quais esta obra seria inexistente.

Ao caro Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha por sua frase: “sua hipótese tem base forte”, expressa ainda quando tudo era apenas uma idéia, motivou-nos a prosseguir sonhando.

À Agnes Albuquerque, pela ajuda fundamental nos experimentos e na qualidade das fotografias da agulha e das lâminas obtidas e representadas desta dissertação.

À Tania Beatriz Chiari e Juliana Pischiotin da Silva Moraes, cujo secretariado foi eficaz e de extrema importância. Sempre prontas a auxiliar e orientar nos detalhes que fizeram toda a diferença.

À Antônio Marcos Sangregório, por ter confeccionado vários protótipos sem nunca cobrar um centavo sequer.

À Donizetti Pedro Lima Martins, Martins Design, cujos muitos elogios ao projeto serviram de combustível.

À Raquel Muarrek, extraordinária médica, cuja excelência de sua formação tem me inspirado a prosseguir estudando.

RESUMO

Soubihe Junior, Nathan Valle. Desenvolvimento de uma agulha para terapia celular e biópsia direta ou percutânea do coração. 60 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2016.

Introdução: O papel das biópsias do miocárdio, tem tido relativa importância em cardiologia, sendo método diagnóstico fundamental em um pequeno número de patologias do coração como na doença por depósito de glicogênio, amiloidose, hemocromatose e nas miocardites. Ao longo dos anos, o desenvolvimento de diferentes procedimentos que possibilitam a obtenção de fragmentos do tecido cardíaco passou por diversos estágios e evolui da miocardiectomia a céu-aberto aos cateteres endovasculares, passando por procedimentos com agulhas de punção. Estes apesar de estarem em desuso atualmente, têm particular importância por proporcionar acesso ao miocárdio e a cavidade ventricular esquerda. Paralelamente, a terapia celular tem sido utilizada na recuperação e preservação da função cardíaca em coronariopatia crônica e na doença de chagas. As punções biópsias do coração ressurgem como possível método alternativo de acesso ao miocárdio e implante de material biológico para terapia celular. **Objetivos:** apresentar instrumento de punção, biópsia e injeção intramiocárdica de material biológico, padronizar a técnica e atestar a segurança do método. A adaptação consiste em um sistema de escarificação do miocárdio para permitir melhor fixação de células-tronco. O objetivo do presente trabalho visa apenas o desenvolvimento da agulha e testar histologicamente a qualidade das punções. **Método:** O instrumento para punção e injeção de material biológico é composto por uma agulha externa de punção e injeção (1), o qual contém na sua extremidade uma ponta romba (2) e vários orifícios de 0,5 mm de diâmetro (3). Internamente, está equipado com uma agulha com um mandril fechado, que quando introduzidas no exterior, pode ser mobilizada para dentro para encher os orifícios laterais ocluindo ou soltá-los. O procedimento para a produção de microlesões micro é feito através da troca do mandril de ponta romba (durante o procedimento) por um mandril escova (4), provido de microcerdas que são estruturalmente concebidas para preencher os orifícios com a exteriorização das pequenas cerdas (5). O instrumento está equipado com um mecanismo de bloqueio, que permite a sua mobilização perfeita como uma única unidade de microlesões ou, ainda pode ser utilizado somente como uma agulha externa, de modo que pode tornar-se um instrumento de injeção biológica.

Resultado: A técnica já foi testada em modelo suíno vivo mostrando sua viabilidade e segurança. Como resultados são apresentados aspectos macroscópicos e microscópicos do coração (Corantes Hematoxilina eosina, Tricrômico Masson e Azul de Evans). **Conclusão:** No tocante a sua função o novo Instrumento de punção/infusão tem por característica principal o fato de ser multifuncional. Permite ao operador acessar a cavidade ventricular esquerda por via transtorácica sem risco de lesão (perfuração), das artérias coronárias. Permite penetrar o miocárdio sem laceração das fibras musculares pela divulsão das mesmas e escarificar o miocárdio gerando micro-lesões musculares por intermédio de seu mandril com cerdas, promovendo a “inflamação benéfica ao processo de transplante celular.

Palavras-chave: células tronco, infarto do miocárdio, biópsia do coração, miocárdio, Punção do coração

ABSTRACT

Soubihe Junior, Nathan Valle. Development of a needle for percutaneous heart cell therapy and biopsy. 60 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2016.

Introduction: The role of myocardial biopsy has had relative importance in cardiology, being fundamental diagnostic method in a small number of diseases of the heart as in glycogen deposit disease, amyloidosis, hemochromatosis and in miocardites. Over the years, the development of different procedures that allow obtaining cardiac tissue fragments went through several stages and evolved from open miocardectomy to endovascular catheters, going through procedures with puncture needles. These despite being in disuse today, have particular importance for offering access to myocardium and left ventricular cavity. At the same time, the Cellular therapy has been used in the recovery and preservation of cardiac function in chronic coronary artery disease and Chagas disease. The puncture-heart biopsies to re-emerge as a possible alternative method of access to the myocardium and implantable biomaterial for cell therapy. **Objectives:** Objectives: to present puncture tool, biopsy and intramyocardial injection of biological material, standardizing the technical and certify the safety of the method. The adaptation allows in a myocardial scarification system for making possible a better stem cells fixation. The objective of this study covers only the development of needle and test, macroscopically and histologically the quality of biopsies. **Methods:** The instrument for puncturing and injection of biological material is composed of an external needle (1), called coupling infusion, which contains at its end a blunt tip (2) and multiple 0.5 mm diameter holes (3). Internally it is fitted with a blunt mandrill needle, which when introduced into the external, can be mobilized inside to fill the lateral holes occluding or releasing them. The procedure for producing micro lesions is done by exchanging the blunt mandrill (during the procedure) for a brush-mandrill (4), provided with micro bristles that are structurally designed to fill the holes with small exteriorization of bristles (5). The instrument is equipped with a locking mechanism, which allows its perfect mobilization as one single unit for micro lesions or it can be used only as an external needle so it can become a biological injection instrument. **Result:** The technique has been tested in vivo pig model showing its feasibility and safety. The results are presented through macroscopic and microscopic aspects of the heart (dyes hematoxylin eosin, Masson Masson and Evans blue). **Conclusion:** Regarding its function the new instrument is to be multifunctional main feature. It allows the operator to access the left ventricular cavity through transthoracic without risk of injury (perforation) of the coronary arteries. It allows penetrate the myocardial with no laceration of the muscle fibers by separating them .It generates muscle micro-injuries through its arbor with bristles, promoting "inflammation beneficial to the cell transplant process. Key words: heart biopsy puncture, infusion of stem cells in the heart.

Keywords. stem cell, myocardial infarction, cardiac cell therapy, myocardium biopsy.

LISTA DE ABREVIATURAS

AEP	AGULHA EXTERNA DE PUNÇÃO
AEPI	AGULHA EXTERNA DE PUNÇÃO E INJEÇÃO
APBI	AGULHA DE PUNÇÃO-BIÓPSIA E INJEÇÃO DE MATERIAL BIOLOGICO
APMI	AGULHA DE PUNÇÃO MICROLESÕES E INJEÇÃO
BCD	BISEL CORTANTE DISTAL
CMI	CORPO DO MANDRIL INTERMEDIÁRIO
DAMI	DISPOSITIVO DE ACOPLAMENTO AO MANDRIL INTERNO
EIDC	EMBOLO INTERNO DOTADO DE CERDAS
GSR	GARRA SEMI-ROMBA
IAM	INFARTO AGUDO DO MIOCARDIO
MAAM	MECANISMO DE ACOPLAMENTO AGULHA-MANDRIL
MAVA	MANDRIL VASSOURA
MIO	MANDRIL INTERNO OCO
MIPC	MANDRIL INTERNO DE PONTA CEGA
MPC	MANDRIL COM PONTA CEGA
OAPI	ORIFICIO DE ACOPLAMENTO PARA INFUSÃO
OLC	ORIFICIO LATERAL CORTANTE
OLDI	ORIFÍCIOS LATERAIS DE INFUSÃO
OLI	ORIFÍCIOS DE LESÃO E INJEÇÃO
OLI	ORIFÍCIOS DE LESÃO E INJEÇÃO
OLNC	ORIFICIO LATERAL NÃO CORTANTE
PPR	PONTA PERFURANTE ROMBA

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação esquemática da agulha com possibilidade de realização de biópsia miocárdica percutânea. 1. Agulha externa de punção (AEP), cilíndrico e oco; 2. Dispositivo de acoplamento ao mandril interno (DAMI); 3. Orifício lateral cortante (OLC), próximo a ponta com aproximadamente 3 mm de comprimento por 1.2mm de largura apresentando em sua extremidade distal uma curvatura em “garra” semi-romba. (GSR); 4. Ponta cônica, maciça e romba; 5. Mandril interno oco (MIO), nos seus 4 a 5 milímetros distais, determinando o bisel cortante distal (BCD).....	29
Figura 2 -	Esquema mostrando a agulha em perspectiva do mandril de acoplamento interno a agulha externa1. Agulha externa de punção e injeção (AEPI); 2 e 3. Representam o mecanismo de acoplamento agulha- mandril. (MAAM); 4. Orifícios laterais não cortantes. (OLNC). 5. Ponta perfurante romba (PPR), característica que confere ao instrumento sua característica de segurança para o procedimento.....	31
Figura 3 -	O corpo do mandril intermediário (CMI) para acoplamento representado pelo número 8, caracteriza-se por ser um cilindro oco com ponta aberta 9, e na outra extremidade um mecanismo de acoplamento perfeitamente ajustado a agulha externa de punção e injeção (AEPI) 6 e 7, e ao êmbolo interno dotado de cerdas (EIDC) que será introduzido hermeticamente em seu interior.....	32
Figuras 4 -	Apresentar respectivamente o êmbolo interno com cerdas a interiorização sequencial de seus componentes, como em 14,15 e 16. O êmbolo interno dotado de cerdas (EIDC), contém numa extremidade o mecanismo de acoplamento sequencias ao mandril e a agulha externa para injeção (AEPI), 11 e 12, o corpo sólido 10, e as cerdas em vassoura fixadas em suas outras extremidades.....	33
Figura 5 -	Descreve o triplo mecanismo de acoplamento hermético do conjunto Agulha externa de punção + mandril interno oco + Êmbolo interno dotado de cerdas.....	34
Figura 6 -	Representa o instrumento completo, com seus elementos acoplados, promovendo a exteriorização das cerdas do êmbolo interno que durante a execução de movimento circular e giratório realiza a escarificação do miocárdio adjacentes ao pertuito de punção.....	34

Figura 7 -	Documentação fotográfica da agulha. (A) Conjunto dos componentes. (B) Detalhe da ponta da agulha para injeção. (C) êmbolo interno dotado de cerdas) o corpo do mandril intermediário e a agulha externa em detalhes (D) exteriorização do escarificador. (E) detalhe do "luerlock" de segurança.....	35
Figura 8 –	Técnica de punção percutânea. (A) Punção percutânea. (B) Punção do ventrículo esquerdo (fluxo sanguíneo ventricular). (C) Tração cuidadosa da agulha para o miocárdio (parada do fluxo sanguíneo ventricular). (D) Escarificação do miocárdio. (E) Punção guiada por radioscopia. (F) Punção guiada por ultrassonografia.....	36
Figura 9 -	Escarificação do miocárdio obtida com movimentos suaves giratórios.....	38
Figura 10 -	Descrição do protótipo 02:1. Agulhas externa composta com cilindro oco, com a ponta romba; 2. Base da agulha 3.Orifício lateral cortante para realização de biópsia; 4. Múltiplos orifícios laterais não cortantes para infusão de material biológico.....	39
Figura 11 -	Detalhes do mandril interno. 5. Mandril interno oco; 6. Orifícios laterais de acoplamento para infusão;7. Ponta cega e cortante	40
Figura 12 -	Aspectos macroscópicos da punção miocárdica percutânea. A. Orifício de entrada da punção; B. Trajeto escarificado pela agulha e corado com azul de metileno. B referem-se a punções em órgão fixado em formol.....	41
Figura 13 -	Microscopia (Hematoxilina eosina). A. Região da entrada da agulha; B. Região onde a agulha penetrou (maior aumento).....	41
Figura 14 -	Microscopia. G1 (sem escovada, somente inseriu a agulha) (A, B – Hematoxilina-eosina; C, D - Tricômio de Masson modificado).....	42
Figura 15 -	Microscopia. G2 (uma escovada) (A, B – Hematoxilina-eosina; C, D - Tricômio de Masson modificado).....	43
Figura 16 -	Microscopia. G3 (duas escovadas) (A, B – Hematoxilina-eosina; C,D - Tricômio de Masson modificado).....	45
Figura 17 -	Representações esquemáticas de três protótipos desenvolvidos durante o projeto.....	47

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Biopsia do coração.....	20
1.2 Terapia Celular.....	21
2 REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1. Aspectos gerais.....	22
2.2. Biópsia do miocárdio	23
2.3. Terapia celular em doenças miocárdicas	25
2.4. Vias de injeção de células tronco no miocárdio	26
2.4.1. Método Intracoronário.....	26
2.4.2. A via de administração sistêmica.....	26
2.4.3. Método intracardiaco	27
2.4.4. Métodos alternativos	27
3 OBJETIVO	28
4 MÉTODO.....	29
4.1. Punção biopsia idealizada por Nathan Valle Soubihe	29
4.2. Agulha de punção, microlesão e injeção (APMI).....	30
4.3. Descrição da técnica de punção, escarificação e injeção de material biológico	35
4.4. Agulha de punção-biópsia e injeção de material biológico(APBI)	38
5 RESULTADOS.....	41
6 DISCUSSÃO	46
7 CONCLUSÕES	51
REFERENCIAS.....	52
ANEXOS	56
ANEXO A – “Pôster apresentado no XXXIV Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo”	56
ANEXO B – “Trabalho publicado na Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular”	57
ANEXO C -- "Comprovante de depósito de pedido de patente"	60

1 INTRODUÇÃO

1.1 Biópsia do coração

Em meados da década de 70, Shirey e Hawk¹ definiram o papel da biópsia miocárdica. Com o advento do cateterismo cardíaco, cardioangiografia e arteriografia coronária seletiva, tipos específicos de doença cardíaca puderam ser reconhecidas e claramente definidas. Essa afirmação é apropriada porque a biópsia miocárdica por si só raramente desempenha um papel importante no diagnóstico cardíaco. Excluindo nódulos de Aschoff em pacientes com cardite reumática, os achados microscópicos em pacientes com doença reumática cardíaca, doença cardíaca congênita, doenças do pericárdio, doença hipertensiva e doença cardíaca aterosclerótica são semelhantes e inespecíficos. Nestes, fibrose intersticial e/ou hipertrofia do miocárdio constituem o diagnóstico mais usual. Ocasionalmente, um espécime de pericárdio e miocárdio é útil para distinguir a pericardite constrictiva e miocardiopatia restritiva.

A biópsia miocárdica providenciou o único método para o diagnóstico em um pequeno número de pacientes com hemodinâmica normal, arteriografia coronária normal e ventriculogramas normais. A biópsia do coração parece desempenhar um papel importante no diagnóstico de tipos específicos de doença primária do miocárdio. É valioso no reconhecimento da doença de armazenamento de glicogênio, a amiloidose, hemocromatose e miocardite. Muito frequentemente o médico clínico ou cirurgião se vêem diante de situações clínicas em que a decisão terapêutica em muito se beneficiariam do conhecimento da microscopia do tecido cardíaco acometido por diversas patologias. Tal conhecimento pode ser o divisor de águas na conduta, medica seja intervencionista, seja medicamentosa. Com base na experiência atual, as indicações de biópsias do miocárdio dependem da necessidade de um diagnóstico do tecido para determinar o manejo do paciente e da disponibilidade de pessoal com formação adequada para realizar o procedimento e gerenciar as complicações. Hoje, médicos e seus pacientes têm acesso a serviços de histopatologia de diagnóstico de alta qualidade, incluindo as mais recentes técnicas moleculares e genéticos.

1.2. Terapia Celular

Paralelamente, sabemos que nos dias atuais técnicas de vanguarda científica lançam mão de células-tronco, que têm sido utilizadas na recuperação e preservação da função contrátil miocárdica em pacientes portadores de cardiomiopatias com insuficiência cardíaca, em coronariopatias crônicas e Doença de Chagas^{4,5}. Uma etapa de conhecimentos fundamentais sobre a terapia celular nas patologias cardiovasculares ainda está por ser vencida, em virtude dos compreensíveis questionamentos que tem se oposto à própria ideia da utilização de células-tronco no homem; da relativa “jovialidade” do método, e dos obstáculos práticos que se relacionam a técnicas de infusão das mesmas no órgão em questão⁴. Estudos com células-tronco, embasados em dados laboratoriais, demonstram uma melhora funcional e diminuição de isquemia miocárdica quando utilizadas em animais com isquemia miocárdica^{6,7,10}.

Estudos em animais têm observado diferentes resultados em função da via utilizada para a injeção das células, havendo uma nítida superioridade de resultados quando as injeções são realizadas de forma transendocárdica, se comparadas ao método intracoronário. Até hoje, não podem ser administradas por via intracoronária ou intravenosa em moléstia cardíaca de isquemia crônica por falta de maior resposta ao estímulo das citocinas responsáveis pelo transporte para o miocárdio a partir do sistema circulatório. Dessa forma, devem ser utilizadas as estratégias que visam à injeção direta no músculo cardíaco^{8,9,30}.

Em contrapartida, estudos clínicos com células-tronco em cardiologia, baseando-se em dados laboratoriais obtidos com animais demonstram uma melhora funcional e diminuição de isquemia miocárdica quando as células-tronco são utilizadas em animais com infarto agudo do miocárdio. Foi demonstrado, em modelos animais, que a infusão dessas células promove neoangiogênese e maior preservação miocárdica e melhora da função ventricular. Isto já foi feito em pacientes portadores de insuficiência coronariana crônica, por diversas vias de acesso, isoladamente ou em conjunto à cirurgia de revascularização, com resultados promissores^{2,3,10}.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Aspectos gerais

Para o equilíbrio da revisão, procedeu-se a uma divisão temporal em dois períodos, 1906-1956 e 1957-2015.

Durante o primeiro período de 50 anos de diagnóstico da patologia (ou cirúrgico) geralmente ocupado menos tempo ea maioria dos espécimes foram obtidos a partir de grandes procedimentos cirúrgicos, como a gastrectomia, colectomia, histerectomia e mastectomia; o principal objetivo do exame histológico dessas amostras foi simplesmente para confirmar o diagnóstico clínico. O material de biópsia teria sido restrita a locais de fácil acesso, como a pele, curetagens endometriais e aqueles a que a 'escopo' rígida poderia ser aplicada, como retosigmoide, laringe, esôfago e os brônquios.

Houve enormes melhorias nas técnicas de biópsia nos últimos 50 anos. Um grande avanço foi a introdução da agulha de biópsia percutânea, o que permitiu a investigação de órgãos internos sólidos anteriormente não acessíveis sem **cirurgia exploratória**. O primeiro modelo de agulha, o Vim-Silverman¹², foi inicialmente introduzido para melhorar o diagnóstico pré-operatório de câncer (SILVERMAN, 1938), mas também foi usado para biópsia do fígado. Uma agulha semelhante foi planejada para biópsia renal por Iversen e Brun (1951)¹².

A agulha Vim-Silverman¹² foi posteriormente substituída pela agulha de Menghini (1958), a qual era mais segura e mais fácil de usar, do que o modelo de Vim-Silverman, obtendo-se tecido suficiente para suportar técnicas como histoquímica além de microscopia de luz e deu menos artefato "crush". Após seu sucesso na biópsia hepática, a agulha Menghini foi posteriormente aplicada a outras áreas, como a renal, próstata e biópsia pulmonar. Maiores melhorias foram anunciadas pelo desenvolvimento de dispositivos de agulha de "corte-core" descartáveis tais como agulha "Tru-Cut" (RAKE et al, 1969;. VITUMS, 1972) e, mais recentemente, dispositivos de biópsia de mola automatizados e guiados por ultra-som.

2.2. Biópsia do miocárdio

A busca por métodos seguros, e eficazes de obtenção de fragmentos íntegros do miocárdio inspirou inúmeros autores e foi tema de diversos trabalhos ao longo dos anos. Enorme desafio nos primórdios de sua realização foi vencer a necessidade da abertura da caixa torácica para a captação de fragmentos de biópsia. Historicamente, Nuvoli¹³, em 1936 punciona pela primeira vez o ventrículo esquerdo de um paciente via anterior, para injetar contraste. Ponsdomenech e Nuñez¹⁴ em 1951, puncionam por via subxifoideana, para injetar contraste, 30 pacientes 45 vezes sem mortalidade ou complicações importantes. Falquet et al. em 1952¹⁵, puncionam a aurícula esquerda por via transbrônquica. Radner em 1954¹⁶ atinge a aurícula esquerda por punção supra-esternal. Brock e Ross em 1956¹⁷ executam em 24 pacientes a punção do ventrículo esquerdo por via transtorácica anterior para medidas de pressão, sem mortalidade e sem complicações.

Alguns trabalhos surgiram, apresentando estatísticas volumosas, com baixo índice de complicações e mortalidade. Os principais trabalhos são de Smithmet al. em 1954¹⁸; Creeg et al. em 1955¹⁹; McCaugham e Pate em 1957²⁰; dentre outros que utilizavam a via subxifoideana para injeção de substância radiopaca no coração, Schrire e Phillips em 1958 para medida de pressão.

As biópsias já vinham tomando lugar em procedimentos realizados por pesquisadores como Casten e Marsh 1952²², porém estes requeriam manipulação cirúrgica prévia de cães com fixação por sutura do coração ao gradeado costal e posterior punção com a agulha de Van-Silverman usada em punções hepáticas.

Em 1955, Price et al.²⁶ realizaram em 19 cães, 2 ou 3 biópsias em cada animal através da pele também com agulha de Vim-Silverman, sem que tivessem nenhum acidente fatal, porém apresentando em alguns cães hemopericardio. Obtiveram, no entanto matéria de biópsia disponível para excelente estudo histológico com microscopia eletrônica demonstrando, portanto a viabilidade do método sem complicações técnicas complexas e sem mortalidade.

Proudfit e Effler em 1956²⁴ propunham a abertura do tórax humano para realizar biópsias de pericárdio e de miocárdio para diagnóstico e tratamento de algumas pericardites, por agulha. Neste mesmo ano Sutton et al.²⁵, apresentaram os resultados de biópsias de coração por punção com agulhas realizadas diretamente

sobre o coração exposto após uma toracotomia. Nessa época as biópsias por punção alcançaram popularidade tal que levaram Winberg et al. em 1958²⁶, embasados em seus resultados diagnósticos por biópsia do coração recomendaram o emprego do método.

Neste momento a experiência obtida com as punções percutâneas em cães e por punções diretamente sobre o coração exposto, no homem, não davam segurança suficiente para a utilização rotineira do método, uma vez que as agulhas utilizadas conferiam grande risco de acidentes de punção por lesão direta de estruturas do coração, sobretudo as artérias coronárias.

Em fins de 1959, Nathan Valle Soubihe¹², idealiza e testa uma agulha que lhe permitia realizar biopsias sem o risco de transfixar um vaso cardíaco. Tais testes se deram em cães, sob visão direta com o coração exposto. Uma característica técnica na construção da ponta da agulha lhe conferia tal segurança que mesmo que propositalmente direcionada contra a coronária do animal, por “*deslizamento*” a agulha se “desviava do vaso” mantendo sua integridade e praticamente anulando a possibilidade de hemorragias. Os estudos culminariam na sua tese de doutoramento defendida mais tarde em novembro de 1962. Posteriormente publicou a descrição técnica da agulha, e os resultados de biópsias obtidos em mais de 119 punções realizadas no total.

Em humanos, 15 pacientes foram submetidos a 1 ou 2 punções com a agulha (7 sob visão direta com o coração exposto e 8 percutâneas). Dos oito pacientes submetidos a punções percutâneas, em 7 as punções biopsias foram feitas com anestesia geral; em outro com anestesia local. Todos tiveram controles eletrocardiográficos, antes durante e depois das punções. Os pacientes não apresentaram manifestações dolorosas ou mal estar depois das punções a não ser, as vezes, ligeira dor no local da introdução da agulha na pele. Neste grupo as alterações eletrocardiográficas durante a punção são mínimas, representadas por raras extrasístoles ventriculares. Os dados publicados atestavam sua eficácia e segurança.

Passou a divulgar o método internacionalmente por meio de convites para exposição da técnica em diversas universidades, dentre as quais, II. Medizinische Klinik der Universität München em 1970, Faculté de Médecine de Paris, Institute G’Histochemie Médicale em setembro de 1970. No mesmo ano participou do debate sobre 10 anos de experiência da medicina com biopsias do coração por punção ou por cateter no congresso mundial de cardiologia em Londres 1970.

No Brasil, a técnica foi apresentada e experimentada no então INSTITUTO DE CARDIOLOGIA DO ESTADO DE SÃO PAULO, hoje INSTITUTO DANTE PASSANEZZI (apud/ Prof. Dr. Leopoldo Piegas), e, também, foi utilizada para realização biopsias para controle de rejeição de pacientes submetidos a transplantes cardíacos pelo Prof. Dr. Domingo Braile, segundo relatos pessoais cirurgião.

2.3. Terapia celular em doenças miocárdicas

Aparentemente de forma pioneira pesquisadores da divisão de Cardiologia e instituto de terapia celular da **Universidade de Düsseldorf, na Alemanha**, realizaram um estudo comparativo entre dois grupos com 18 pacientes com Infarto agudo do Miocárdio em cada grupo. Ambos receberam tratamento padrão para o IAM, mas apenas um grupo recebera transplante de mononucleares autólogos (BMC's) via cateter balão alocado na artéria coronária relacionada a área infartada. Após três meses a ventriculografia, e as provas com dobutamina demonstraram uma menor área de infarto, uma melhor contratilidade miocárdica e melhor fração de ejeção além de outros parâmetros ecocardiográficos como volume sistólico final reduzido no grupo em que se utilizou a terapia celular²⁷.

Inúmeros estudos têm utilizados diferentes tipos de células, desde as células da medula óssea (caracteristicamente uma fornecedora natural de células jovens), mas também células da periferia. Podemos extrair células do tecido gorduroso, por exemplo⁹. Há muitas investigações em andamento sobre de onde obter células, como utilizá-las e que célula especificamente é melhor!^{4,5,10}.

Outros estudos em animais têm observado diferentes resultados em função da via utilizada para a injeção das células, havendo uma nítida superioridade de resultados quando as injeções são realizadas de forma transendocárdica, se comparadas ao método intracoronário^{8,9,30}. Estes resultados incluem melhoria da função contrátil e elétrica do coração, em animais cujo ramo descendente anterior da coronária esquerda foi ligado gerando infarto agudo do miocárdio, com déficit de contratilidade e de condução elétrica. As injeções têm sido realizadas nas margens da região infartada, com uma lacuna de sete dias após o enfartamento, e avaliação de resultados em duas semanas após a injeção³⁰.

2.4. Vias de injeção de células tronco no miocárdio

2.4.1. Método Intracoronário

As Principais desvantagens dessa técnica estão associadas à necessidade de patência da árvore coronariana, sendo que a efetividade da administração e distribuição das células no tecido lesado depende da preservação do fluxo na microcirculação coronariana, nem sempre presente neste cenário³⁰. Paralelamente, o próprio produto a ser administrado pode ser causa de tromboembolismo, potencialmente gerando uma segunda lesão isquêmica em um miocárdio infartado. Na maioria dos estudos de terapia com células-tronco autólogas para o tratamento do infarto agudo do miocárdio (IAM) a injeção ocorreu pela artéria relacionada ao infarto após a reperfusão, com o objetivo de alcançar a área de miocárdio que foi diretamente afetada pela interrupção da circulação sanguínea. Essa abordagem anterógrada tem-se mostrado viável e segura. No entanto, a circulação sanguínea na área de infarto pode ser gravemente afetada, dificultando o potencial acesso das células injetadas na área em que elas são necessárias para a reparação tecidual²⁸.

Relatos envolvendo a administração de células de maior diâmetro, como as progenitoras mesenquimais, esqueleto-mieloblastos ou grandes volumes de células, sugerem tal risco.

2.4.2. A via de administração sistêmica

Essa via está alicerçada na idéia que as células-tronco são atraídas por fatores quimiotáticos para os tecidos injuriados (do inglês homing)^{29,31,32}. Os resultados clínicos com o uso desta técnica de forma isolada são menos encorajadores. Contudo, os mesmos serviram como prova conceitual da capacidade de mobilização periférica de células-tronco, bem como serviram como modelo para o desenvolvimento de métodos alternativos de tratamento celular.

2.4.3. Método intracardiaco

Os estudos clínicos sobre a infusão de células-tronco intracoronária em pacientes com infarto agudo do miocárdio têm mostrado resultados promissores para a fração de ejeção do ventrículo esquerdo. No entanto, estudos pré-clínicos demonstraram que a injeção das células intramiocárdica, mostrou ser melhor do que a abordagem intracoronária³⁰.

2.4.4. Métodos alternativos

De administração de produtos celulares na fase aguda ou subaguda do infarto agudo do miocárdio vêm sendo testados. A injeção a céu aberto como terapia adjunta à cirurgia de revascularização é uma proposta viável, mas que atende a um grupo seletivo de pacientes com indicação de revascularização cirúrgica imediatamente após um evento isquêmico agudo³. A via transendocárdica, por sua vez, foi inicialmente reservada para o tratamento de pacientes isquêmicos crônico, pelo risco de perfuração e desenvolvimento de arritmias. Contudo, estudos pré-clínicos vêm sendo realizados no sentido de comprovar a segurança destes procedimentos e abrir a possibilidade de seu uso no tratamento de eventos isquêmicos agudos.

3 OBJETIVO

Desenvolver uma agulha multifuncional de punção miocárdica percutânea, adaptando agulha idealizada na década de 50 na Universidade de São Paulo (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto). A adaptação consiste em construir um sistema inovador de punção e escarificação miocárdica para permitir melhor fixação de células-tronco.

O objetivo do presente trabalho visa a apresentação do processo de desenvolvimento da agulha e testar histologicamente a qualidade das punções e a escarificação do miocárdio, bem como a segurança do método ainda que o mesmo já tenha sido comprovado no passado pelas inúmeras punções realizadas e devidamente comprovada nas publicações de Nathan Valle Soubiê.

4 MÉTODO

4.1. Punção biopsia idealizada por Nathan Valle Soubihe

Descreveremos inicialmente a agulha de punção biopsia idealizada por Nathan Valle Soubihe original a partir da qual foram elaboradas as adaptações e desenhados os protótipos a serem testados. A figura 1 descreve detalhadamente da agulha de biopsia, idealizada por Nathan Valle Soubihe.

Figura 1 - Representação esquemática da agulha com possibilidade de realização de biópsia miocárdica percutânea. 1. Agulha externa de punção (AEP), cilíndrica e oca; 2. Dispositivo de acoplamento ao mandril interno (DAMI); 3. Orifício lateral cortante (OLC) próximo a ponta com aproximadamente 3 mm de comprimento por 1.2mm de largura apresentando em sua extremidade distal uma curvatura em "garra" semi-romba. (GSR); 4. Ponta cônica, maciça e romba; 5. Mandril interno oco (MIO), nos seus 4 a 5 milímetros distais, determinando o bisel cortante distal (BCD).

Descrição da técnica de punção biopsia: Sob anestesia geral ou local, após a assepsia da região precordial, introduz-se a agulha externa de punção (AEP) através da pele num ponto situado 1 a 2 cm, para fora do choque da ponta, numa linha que passando pelo choque da ponta fosse perpendicular à linha esternal. A agulha externa de punção (AEP) é orientada de tal modo que fica dirigida da face ventral para a dorsal; da região podal para a cefálica e da esquerda para a direita, com o sentido de fora para dentro do tórax. A inclinação nestes vários planos é dependência direta da relação cardio-torácica. A agulha externa de punção (AEP), neste seu trajeto perfura as pleuras, pulmão e se coloca sobre o coração em sua parede ventricular esquerda. Atravessa a parede miocárdica e atinge a cavidade ventricular esquerda. Recua-se, nesta posição, apenas o mandril interno oco (MIO), deixando livre o orifício lateral cortante (OLC) da agulha. Puxa-se então lentamente a agulha, o que determina que a garra terminal do orifício lateral cortante (OLC) se encrave na superfície interna do coração, fazendo com o que tecido endocárdico e miocárdico penetrem para a luz da agulha, que agora presa a parede do coração, transmite com vigor, às mãos do operador, os batimentos cardíacos. Mantendo-se uma ligeira tração na agulha, introduz-se o mandril interno oco (MIO) que por meio de seu bisel cortante distal (BCD) irá cortar o tecido fixado pela garra e aprisioná-lo na sua luz. Retirada a agulha que então desliza com facilidade para fora da caixa torácica, o fragmento que se encontra no interior do mandril interno oco (MIO), é facilmente apanhado com uma pinça ou com a simples lavagem da agulha no próprio líquido fixador.

4.2. Agulha de punção, microlesão e injeção (APMI)

O Instrumento de punção, micro lesão e injeção de material biológico é composto por uma agulha externa de punção e injeção (AEPI) que contém na sua extremidade uma ponta perfurante romba (PPR), e que a aproximadamente cinco (5) mm proximais é dotada de orifícios múltiplos não cortantes de aproximadamente 0,5mm de diâmetro, denominados orifícios de micro lesão e injeção (OLI).

Internamente é dotada de um mandril com ponta cega (MPC) que quando introduzido na agulha externa poderá mobilizar-se em seu interior de forma a

preencher os orifícios de lesão e injeção (OLI). Este mandril ficará acoplado a agulha externa durante a punção para ocluir os OLI e será retirado da agulha quando dentro da cavidade ventricular esquerda (Figura 1).

Posteriormente será realizado o procedimento de produção de micro lesões, que é feito pela introdução do Mandril-vassoura (MAV), que é dotado de micro cerdas estruturalmente confeccionado de forma a preencher os orifícios com pequena exteriorização das cerdas.

Descrição da agulha de punção e injeção de material biológico: Este protótipo foi definido como o mais adequado a ser utilizado uma vez que foi aquele me permitiu de forma mais eficiente a exteriorização das cerdas pelos orifícios laterais não cortantes. (OLNC). A Figura 2 é uma vista em perspectiva agulha externa e suas duas características principais a ponta romba e presença de orifícios laterais não cortantes.

Figura 2 - Esquema mostrando a agulha em perspectiva do mandril de acoplamento interno a agulha externa 1. Agulha externa de punção e injeção (AEPI); 2 e 3. Representam o mecanismo de acoplamento agulha- mandril. (MAAM); 4. Orifícios laterais não cortantes. (OLNC). 5. Ponta perfurante romba (PPR), característica que confere ao instrumento sua característica de segurança para o procedimento.

Figura 3 - O corpo do mandril intermediário (CMI) para acoplamento representado pelo número 8, caracteriza-se por ser um cilindro oco com ponta aberta 9, e na outra extremidade um mecanismo de acoplamento perfeitamente ajustado a agulha externa de punção e injeção (AEPI) 6 e 7, e ao êmbolo internodotado de cerdas (EIDC) que será introduzido hermeticamente em seu interior.

Figuras 4 - Apresenta respectivamente o êmbolo interno com cerdas a interiorização sequencial de seus componentes, como em 14,15 e 16. O êmbolo interno dotado de cerdas (EIDC), contém numa extremidade o mecanismo de acoplamento sequencias ao mandril e a agulha externa para injeção (AEPI), 11 e 12, o corpo sólido 10, e as cerdas em vassoura fixadas em suas outras extremidades.

Figura 5 - Descreve detalhadamente o triplo mecanismo de acoplamento hermético do conjunto agulha externa de punção + mandril interno oco + Êmbolo interno dotado de cerdas, respectivamente em 14,15 e 16.

Figura 6 - Representa o instrumento completo, com seus elementos acoplados, 14, 15 e 16, promovendo a exteriorização das cerdas do êmbolo interno pelos orifícios laterais não cortantes, 4, 13 que durante a execução de movimento circular e giratório realiza a escarificação do miocárdio adjacentes ao pertuito de punção. Em 5 a ponta romba.

Figura 7 - Documentação fotográfica da agulha. (A) Conjunto dos componentes. (B) Detalhe da ponta da agulha para injeção. (C) êmbolo interno dotado de cerdas) o corpo do mandril intermediário e a agulha externa em detalhes. (D) exteriorização do escarificador. (E) detalhe do "luerlock" de segurança

4.3. Descrição da técnica de punção, escarificação e injeção de material biológico

O conjunto: agulha com orifícios laterais + mandril com cerdas metálicas justapostas, estabelece-se agora com um equipamento único de punção, produção de micro lesões e dispensação de material biológico ao miocárdio. Seu funcionamento se dá pela técnica descrita a seguir:

Figura 8 – Técnica de punção percutânea. (A) Punção percutânea. (B) Punção do ventrículo esquerdo (fluxo sanguíneo ventricular). (C) Tração cuidadosa da agulha para o miocárdio (parada do fluxo sanguíneo ventricular). (D) Escarificação do miocárdio. (E) Punção guiada por radioscopia. (F) Punção guiada por ultrassonografia

Introduz-se a agulha através da pele num ponto situado 1 a 2 cm, para fora do choque da ponta, numa linha que passando pelo choque da ponta fosse perpendicular à linha esternal. A agulha é orientada de tal modo que fica dirigida da face ventral para a dorsal; da região podal para a cefálica e da esquerda para a direita, com o sentido de fora para dentro do tórax. A inclinação nestes vários planos é dependência direta da relação cardio-torácica. A agulha neste seu trajeto

perfura as pleuras, pulmão e se coloca sobre o coração em sua parede ventricular esquerda (Figura 8 A). Atravessa a parede miocárdica e atinge a cavidade ventricular esquerda. Recua-se, nesta posição, apenas o mandril interno que é retirado em sua totalidade. O sangue passa a jorrar pelo orifício proximal da agulha que está aberto e livre, informando ao operados que os orifícios laterais localizados próximos da ponta da agulha estão dentro do ventrículo esquerdo (Figura 8 B). Com um leve e lento recuo da agulha o sangue deixa de jorrar pelo orifício proximal que se encontra aberto o que significa que a parede muscular do ventrículo esquerdo ocluiu por completo estes orifícios (Figura 8 C). Vale ressaltar que distribuição destes orifícios na lateral da agulha é projetada para ter uma distribuição tal que elas nunca ultrapassem a largura mínima da parede ventricular média de pacientes adultos (por avaliação ecocardiográfica previa do paciente) permitindo que a movimentação de retirada da agulha quando vier a ser testada em seres humanos e realizada de maneira lenta e precisa, a parada de eliminação o sangue pelo orifício proximal da mesma sem o mandril seja um indicativo preciso da perfeita localização dos orifícios laterais em relação a parede ventricular. Em seguida o operador introduz o mandril com cerdas e pelo mecanismo de acoplamento agulha - mandril exteriorizam-se as cerdas que a partir de um movimento giratório do conjunto agulha-mandril as micro lesões por escarificação podem ser produzidas (Figura 9). Retira-se novamente o mandril com cerdas, e agora poderá acoplar-se a seringa contendo o material biológico a ser infundido no miocárdio previamente escarificado (Figura 8 D). O instrumento é facilmente visualizado pelo ecocardiograma. (Figura 8 E) assim como pela radioscopia, como ilustrado em (Figura 8 F). Reintroduz-se o mandril maciço e a agulha é totalmente retirada.

Foram realizadas 3 punções em cada animal, em duas series de punções de 5 animais em cada serie, totalizando 30 punções no trabalho. O tempo médio entre as punções e o sacrifício do animal variou de 10 minutos a 50 minutos (tempo máximo). As punções foram feitas exclusivamente em porcos. Não foram realizadas punções em seres humanos.

Visando atestar a segurança do método no tocante a possíveis acidentes com artérias coronárias, foram realizadas tentativas intencionais de feri-las com a ponta da agulha. Esta foi direcionado sobre diversas artérias coronárias e por meio de estocadas realizadas com ora mais, ora menos vigor, nenhuma das inúmeras tentativas provocou qualquer tipo de lesão nas mesmas, já que a agulhas por meio de

sua ponta romba desliza pelas coronárias umedecidas pelas fluidos biológicos que as permeiam.

Figura 9 - Demonstração da técnica utilizada para promover a escarificação do miocárdio a partir de movimentos giratórios sobre o eixo do instrumento.

4.4. Agulha de punção-biópsia e injeção de material biológico (APBI)

O Instrumento de punção biópsia e injeção de material biológico é composto por uma agulha externa de punção e injeção (AEPI) que contém na sua extremidade uma ponta romba, e que a aproximadamente cinco mm proximais é dotada de um orifício lateral cortante (OLI) e a três mm ainda mais proximais a este orifício, apresenta orifícios múltiplos não cortantes de aproximadamente 0,5mm de diâmetro, denominados orifícios de acoplamento para infusão (OAPI). Internamente é dotada de um mandril interno com ponta cega (MIPC) que quando introduzido na AEPI poderá mobilizar-se em seu interior de forma a preencher o orifício lateral cortante (OLC) ocluindo-o ou liberando-o. O mandril é também dotado de orifícios de lesão e injeção (OLI) que quando adequadamente ajustado à agulha externa permite o

perfeito acoplamento entre os orifícios de mandril com os orifícios da agulha externa servido assim para a injeção de aproximadamente 0,2 ml de material biológico que preenchem o mandril interno.

A figura 10 descreve em detalhes as características de parte do protótipo (a agulha externa) que permite a realização de dois procedimentos numa mesma punção, a saber: a biópsia do endocárdio e a liberação de células tronco no miocárdio.

Figura 10 - Descrição do protótipo 02:1. Agulhas externa composta com cilindro oco, com a ponta romba; 2. Base da agulha 3.Orifício lateral cortante para realização de biópsia; 4. Múltiplos orifícios laterais não cortantes para infusão de material biológico.

A figura 11 apresenta em detalhes o mandril interno que é oco, cuja ponta cega e cortante e que a semelhança da ponta do mandril da agulha original, serve para cortar o miocárdio que ocupara o espaço a ele oferecido pelo orifício lateral cortante. Ao acoplar-se de maneira justaposta, permite que seus orifícios laterais se comuniquem os orifícios laterais da agulha externa como descrito acima.

Figura 11 - Detalhes do mandril interno. 5. Mandril interno oco; 6. Orifícios laterais de acoplamento para infusão; 7. Ponta cega e cortante

5 RESULTADOS

Como resultados serão apresentados aspectos macroscópicos (Figura 12) e microscópicos (Figuras 13, 14, 15 e 16) com a finalidade de ilustrar áreas de miocárdio punccionado.

Figura 12 - Aspectos macroscópicos da punção miocárdica percutânea realizada em órgão porcino fixado em formol. A. Orifício de entrada da punção; B. Trajeto escarificado pela agulha e corado com azul de metileno.

Figura 13 - Microscopia (Hematoxilina eosina). A. Região da entrada da agulha; B. Região onde a agulha penetrou (maior aumento). Corte histológico do coração porcino, com peça retirada do animal 50 minutos após a punção.

Figure 14 - Microscopia. G1 (sem escovada, somente inseriu a agulha) (A, B – Hematoxilina-eosina; C,D - Tricômio de Masson modificado). Corte histológico do coração porcino, com peça retirada do animal 50 minutos após a punção.

Figura 15 - Microscopia. G2 (uma escovada) (A, B – Hematoxilina-eosina; C,D - Tricômio de Masson modificado). Corte histológico do coração porcino, com peça retirada do animal 50 minutos após a punção.

Figura 16 - Microscopia. G3 (duas escovadas) (A, B – Hematoxilina-eosina; C,D - Tricômio de Masson modificado). Corte histológico do coração porcino, com peça retirada do animal 50 minutos após a punção.

Os resultados apresentados por meio das lâminas presentes nas figuras 12,13, 14, 15, e 16 dizem respeito ao material que foi retirado dos corações de porcos utilizados como aproveitamento de procedimentos práticos didáticos de técnicas cirúrgicas na faculdade de medicina de Ribeirão preto da Universidade de São Paulo. O material foi colhido a aproximadamente 50 minutos após as punções e as diferentes técnicas utilizadas para produção da escarificação. Isto ocorreu em função da falta de local viável para acolhimento dos animais assim com a incapacidade prática de mantê-los vivos por mais tempo. Sabemos serem necessárias um número muito maior de horas até que seja produzida uma reação inflamatória por completo. Portanto entendemos que as ausências da inflamação nas lâminas como elas se apresentam não pode ser reputada ao método ou a técnica empregada, mas ao tempo mínimo necessário de sobrevida do animal após as punções não ter sido observado pelas razões acima descritas.

6 DISCUSSÃO

Das agulhas inicialmente desenvolvidas por Nathan Valle Soubihe detínhamos posse de uma quantidade de unidades produzidas por BECTON, DICKSON IND. CIRURGICAS, SA. Separadas algumas delas, e começou-se a elaborar a sua modificação. Tal processo implicava em raciocínio objetivo que se estabelecia sobre alguns pilares fundamentais, a saber: 1) manter a segurança se possível zerando a chance de acidentes, 2) ter capacidade técnica para alcançar a parede do músculo cardíaco e garantir que o material biológico fosse deixado ali, evitando que o mesmo fosse liberado dentro da cavidade ventricular ou ainda entre o epicárdico e o pericárdio, perdendo assim sua eficácia.

Para chegara os dois modelos de agulha descritos, a árdua tarefa juntamente recebeu o auxílio do artesão, e confeccionamos 3 protótipos, (Figura 17). durante o projeto.

Figura 17 - Representações esquemáticas de três protótipos desenvolvidos durante o projeto.

Tivemos o entendimento que seria necessário produzir uma pequena inflamação de proporções insignificantes para não gerar efeitos deletérios ao miocárdio, porém suficientemente grande para auxiliar o processo de “homing” de célula tronco^{29,30,31,32}. A tarefa era encontrar o processo ideal para produzir tal inflamação. Dentre inúmeras alternativas, gerar micro lesões surgiu como a hipótese mais viável. Porém como produzi-las? A figura 17, ilustra uma discussão comparativa entre os 3 principais protótipos fabricados.

Imaginou-se que se fosse possível criar uma “escova” com cerdas e que ao introduzi-la na agulha externa obtivéssemos a exteriorização das cerdas por orifícios laterais, testaríamos a possibilidade de produzir microlesões no miocárdio. O rascunho, portanto, foi confeccionado e enviado ao senhor Martins da MARTINS DESIGN, que com profissionalismo e dedicação desenhou o primeiro protótipo.

A figura 17 A representa tal protótipo, o primeiro a ser idealizado, a partir da “lógica da inflamação”. Surge, porém, a primeira dificuldade técnica: Como exteriorizar as cerdas pelos orifícios? Buscamos junto a pesquisadores da faculdade de física da USP, a indicação de um material flexível para ser utilizado. Fomos barrados nas dimensões. Se pudéssemos encontrar tal material, como afixar as cerdas na mandril interno de modo a ao introduzir a escova na agulha externa as cerdas se encurvassem e ao serem justapostas ao orifícios fossem liberadas para fora dos mesmos. Além do que, não encontramos esse material.

O Senhor Antônio Marcos Sangregório, artesão escolhido para a confecção dos protótipos testou milimétricos fios metálicos. Os mesmos foram transfixados no mandril e a escova foi confeccionada, porém não se exteriorizavam as cerdas metálicas. O desenho era excelente, a idéia parecia boa, mas na prática não houve sucesso, e a agulha não poderia ser testada pelo simples fato de não ter sido possível até então a exteriorização das cerdas e, portanto, não era possível produzir as microlesões. Pensou-se em descartar o mandril interno e introduzir a agulha comum a seringa acoplada a sua base exercendo uma sucção para que o miocárdio adentrasse os orifícios laterais da agulha e assim as microlesões pudessem ser produzidas por meio de movimentos giratórios. Tal hipótese foi abandonada pela aparente inconsistência da idéia, pois não acreditamos que o miocárdio “responderia” a esta sucção e caso respondesse teríamos pouco ou nenhum controle sobre o tamanho das lesões.

O surgimento do protótipo 2 como se vê na figura 17-B, foi um palpite do artesão Antônio, ele mesmo o confeccionou, sem que fosse previamente desenhado, ou por nos idealizado. Chamou-nos certa feita à sua oficina para apresentar-me o modelo. A complexidade havia aumentado um pouco, porém o resultado havia sido obtido. Agora o instrumento era composto de 3 unidades. Uma externa, exatamente igual a primeira, um mandril 100% oco e intermediário, e um mandril maciço em cuja ponta foi possível soldar cerdas metálicas conferindo a este o aspecto de uma vassoura, que seria introduzido no mandril intermediário de tal forma que as cerdas ficariam recolhidas no mandril intermediário e este por sua vez introduzido na agulha externa para posterior exteriorização. A genialidade da proposta foi evidente quando pudemos experimentar o instrumento pela primeira vez.

Como descrito de forma comparativa na figura 16, o mecanismo hermético de acoplamento permite o ajuste perfeito do instrumento. De posse da agulha, poderíamos partir para os testes efetivamente. Seus métodos e os resultados obtidos foram apresentados.

Agora, com o protótipo anterior já havíamos, em teoria, obtido alguns passos importantes. Tínhamos acesso seguro e eficaz a cavidade ventricular, o instrumento era facilmente visualizável, ao ecocardiograma e melhor ainda na radioescopia e já tínhamos condições de produzir a inflamação.

Porque não obter também a biopsia, já que tudo começou com ela? Produzimos então um instrumento HIBRIDO, capaz de acessar a cavidade ventricular, escarificá-lo, ancorar-se ao endocárdio e com a simples troca pelo mandril vassoura pelo mandril com bisel cortante distal obter um fragmento de biopsia. Assim sendo construímos o protótipo 3 representado na figura 16-C.

Lado a lado e cronologicamente apresentam-se na figura 16 os três principais protótipos produzidos, tendo sido o primeiro abandonado pelas dificuldades técnicas acima descritas, o segundo utilizado nos testes, ora apresentados, e o terceiro apresentado como instrumento HIBRIDO, multifuncional. Sabedor da necessidade de múltiplas injeções de células-tronco no miocárdio, visando a maior eficácia do método, propomos aqui que a agulha foco principal desta dissertação seja utilizada em procedimento por vídeo toracotomia. Assim com a parede ventricular disponível para visualização, mais facilmente seria o coração puncionado e o material biológico oferecido a este órgão com precisão e acurácia. Essa possibilidade ainda não foi testada.

Alguns questionamentos surgiram na fase preliminar do projeto do desenvolvimento da agulha. Assim, dentre os obstáculos a serem enfrentados algumas perguntas a serem respondidas foram algumas foram priorizadas:

- 1) Qual a melhor maneira de procedermos a injeção destas células no miocárdio?
- 2) Que fatores têm colaborado para que um percentual ainda pequeno das células transplantadas permaneça no miocárdio gerando um melhor resultado quantitativo e qualitativo de neoangiogênese?
- 3) Como gerar experimentalmente um “ambiente” favorável a permanência das células no músculo cardíaco?
- 4) É possível estimular as células transplantadas em seu processo de diferenciação especificamente para o miocárdio?
- 5) Onde exatamente injetar as células? Em teoria procuramos elaborar respostas teóricas para esse questionamento.

Entendemos que a melhor técnica para infusão do material biológico, pela simples lógica e pelas evidências dos estudos até agora realizados em diversos centros de pesquisa, inclusive no INCOR, o método intra-miocárdico parece ser superior aos demais utilizados. A agulha apresentada enquadra-se nesse princípio

A não geração daquilo que acreditamos ser o “ambiente favorável” para o maior “recrutamento” do material biológico ali injetado, ou seja, um melhor resultado quantitativo e qualitativo de neoangiogênese. A inflamação em seu complexo mecanismo tem papel fundamental na criação desse “ambiente favorável” à permanência das células transplantadas ao miocárdio. Esse detalhe e a possibilidade de estimular as células transplantadas em seu processo de diferenciação especificamente para o miocárdio não foram testadas no presente trabalho que teve apenas a finalidade do desenvolvimento da agulha.

A motivação inicial desse trabalho foi a proposta de procedimento experimental para injeção das células-tronco no miocárdio de animais e humanos por meio de agulha de punção transtorácica multifuncional. Infelizmente, por dificuldades logísticas para a injeção de células-tronco, principalmente, a “hotelaria” de animais de médio porte, decidiu-se pela realização de testes utilizando agulhas de 2 calibres diferentes para porcos (médio porte) e coelhos (pequeno porte), ou seja, desenvolvimento da agulha/punção e a padronizar a técnica da punção miocárdica

transtorácica já seriam suficientes como matéria para a defesa de uma tese de mestrado, criando condições para testar a fixação de células-tronco no miocárdio.

Nos testes previamente realizados a possibilidade de monitoramento do procedimento por métodos de imagem, seja por ultrassonografia seja por radioscopia, foram testados. Os resultados demonstram que o instrumento é facilmente visualizável por ambas metodologias. E a punção percutânea ganha em precisão e agilidade quando empregados. Vale ressaltar, no entanto, que a necessidade de múltiplas punções do músculo cardíaco para infusão do material biológico comum na prática da terapia celular, fez-nos contatar que a punção percutânea poderia gerar uma maior dificuldade técnica, assim passamos propor que no momento a hipótese da utilização da técnica cirúrgica da vídeo-toracotomia é a melhor condição para sua utilização do instrumento descrito em detalhes nessa dissertação. Tal procedimento tende a transformar-se numa intervenção de maior acurácia e ainda maior segurança devido as múltiplas punções e maior extensão de tecido miocárdio a ser alcançado com terapia celular.

7 CONCLUSÕES

No tocante a sua função o novo Instrumento de punção/infusão tem por característica principal o fato de ser multifuncional, e que permite ao operador:

1) Acessar a cavidade ventricular esquerda por via transtorácica sem risco de lesão (perfuração), das artérias coronárias pela característica de sua ponta que é suficientemente fina para que a introdução da mesma seja eficiente e requeira pouca pressão das mãos do operador, e romba o bastante para não gerar perfuração das coronárias na eventualidade da agulha se dirigir no sentido das mesmas;

2) Permite penetrar o miocárdio sem laceração das fibras musculares pela divulsionamento das mesmas;

3) Fixar-se no endocárdio por meio de seu orifício lateral;

4) “Escovar” as fibras miocárdicas gerando micro-lesões musculares por intermédio de seu mandril com cerdas, promovendo a “inflamação benéfica ao processo de transplante celular”;

5) Realizar biópsia do endocárdio por meio da ponta cortante do mandril interno.

REFERENCIAS¹

1. SHIREY EK, HAWK WA. The role of myocardial biopsy in cardiac diagnosis. *Cardiovasc Clin.* 1975;7(1):187-95.
2. DALLAN, LAO et al. Cell therapy plus transmyocardial laser revascularization: a proposed alternative procedure for refractory angina. *Rev Bras Cir Cardiovasc*[online]. 2008, 23(1); 46-52. ISSN 1678-9741. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-76382008000100009>.
3. GOWDAK LH, SCHETTERT IT, ROCHITTE CE, et al. Early increase in myocardial perfusion after stem cell therapy in patients undergoing incomplete coronary artery bypass surgery. *Cardiovasc Transl Res.* 2011 Feb;4(1):106-13. doi: 10.1007/s12265-010-9234-2. <http://link.springer.com/article/10.1007/s12265-010-9234-2>.
4. PERIN EC, GENG YJ, WILLERSON JT. Adult stem cell therapy in perspective. *Circulation.* 2003;107(7):935-8. <http://circ.ahajournals.org/content/107/7/935.long>.
5. STRAUER BE, KORNOWSKI R. Stem cell therapy in perspective. *Circulation.* 2003;107(7):929-34. <http://circ.ahajournals.org/content/107/7/929.long>.
6. CHONG JAJ, MURRY, CE. cardiac regeneration using pluripotent stem cells – progression to large animal models. *Stem Cell Res.* 2014 November ; 13(0): 654–665. doi:10.1016/j.scr.2014.06.005.
7. CARVALHO, LC; GUARITA-SOUZA, CR, HANSEN P. et al. Cellular transplant: functional, immunocytochemical and histopathologic analysis in an experimental model of ischemic heart disease using different cells. *Braz J Cardiovasc Surg* 2004; 19(3): 261-266. http://www.scielo.br/pdf/rbccv/v19n3/en_v19n3a02.pdf
8. SCHUSTER MD, MARTENS TP, ITESCU S. Células-Tronco Mesenquimais para Reparo Cardíaco *Rev Bras Cardiol Invas.* 2008;16(1):95-101. <http://www.scielo.br/pdf/rbci/v16n1/v16n1a18.pdf>.

¹De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

9. BOCCHI EA, FERREIRA SMA. Células-tronco no tratamento das doenças cardiovasculares. Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul - Ano XIII nº 04 Jan/Fev/Mar/Abr 2005. <http://sociedades.cardiol.br/sbcsrs/revista/2005/04/artigo02.pdf>.
10. GIRAO-SILVA, T, BASSANEZE V, GASTALHO C, et al. Short-term mechanical stretch fails to differentiate human adipose-derived stem cells into cardiovascular cell phenotypes. Biomedical Engineering Online; v. 13, MAY 1 2014. <http://www.bv.fapesp.br/pt/publicacao/93672/short-term-mechanical-tretch-fails-to-differentiate-human-a/>
11. NAKAMUTA JS, DANOVI ME., MARQUES FLN, et al. cell therapy attenuates cardiac dysfunction post myocardial infarction: effect of timing, routes of injection and a fibrin scaffold. PLoS ONE | www.plosone.org, June 2009|Volume 4|Issue 6|e6005, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2695782/pdf/pone.0006005.pdf>.
12. SOUBIHE NV. Herzbiopsie. Thoraxchirurgie. 1961;9:31.
13. NUVOLI, I.: Arteriographia dell'aorta toracica mediante puncture dell'aorta ascendente e del ventricolo. S Policlinico, 1936:43:227.
14. PONS DOMENECH, E, NUÑEZ V. Heart puncture in man diodrast visualization of the ventricular chambers and great arteries, Am Eart J, 1951:41:643.
15. FALQUETJ, LEMOINEJ, ALHOMME P. et al. La mesure de la pression auriculaire gauche par voie transbronchique, Arch Mal Coeur; 1952:45: 741.
16. RADNER S. Suprasternal puncture of the left atrium for flow studies, Acta Med Scand, 1954;148(1):57-60.
17. BROCK R, MILSTEIN B, ROSSD. Percutaneous left ventricular puncture in the assisment of aortic stenosis. Thorax, 1956:11:163.
18. SMITH P, WILSON C, CREGG H, et al. Cardioangiography, J Thor Surg, 1954:28: 273.
19. CREEG H, SMITH P, WILSON C, et al. Cardioangiography, Radiology, 1955: 65: 368.

20. MCCAUGHAM J, PATE J. Aortography utilizing percutaneous left ventricular puncture. Arch. Surg, 1957;76:746.
21. SCHRIRE V, PHILLIPS W. The measurements of the gradient across the aortic valve. Afr Med J, 1958;32:232.
22. CASTEN GG, MARSH JB. Metabolic studies on cardiac tissue obtained by needle biopsy in the intact anesthetized dog, Circ. Research, 1953;1:226.
23. PRICE KC, WAISS JM, HATA D, et al. Experimental needle biopsy of the myocardium for dogs with particular reference to histologic study by electron-microscopy, J Exp Med, 1955;101: 687.
24. PROUDFIT WL, EFFLER DB. Diagnosis and treatment of cardiac pericarditis by pericardial biopsy. JAMA, 1956;161:188.
25. SUTTON DC, SUTTON GC, KENT G. Needle biopsy of the human ventricular myocardium, Quart Bull, NUMed school, 1956;30: 213.
26. WINBERG M, FELL EH, LYNFIELD J. Diagnostic biopsy of the pericardium and myocardium, Arch Surg, 1958;76:825.
27. STRAUER BE, BREHM M, ZEUS T. Regeneration of human infarcted heart muscle by intracoronary autologous bone marrow cell transplantation in chronic coronary artery disease: the iact study. JACC, 2005;46(9) November 1, 1651–8.
28. MOREIRA RC, HADDAD AF; SILVA SA. Injeção intracoronariana de células tronco após infarto do miocárdio. subestudo da microcirculação. Arq Bras Cardiol, 2011;97(5):420-426.
29. HOCKING AM. The role of chemokines in mesenchymal stem cell homing to wounds. Adv Wound Care (New Rochelle). 2015 Nov 1; 4(11): 623–630.
30. KRAUSE K, JAQUET K, SCHNEIDER C. et al. Percutaneous intramyocardial stem cell injection in patients with acute myocardial infarction: first-in-man study. Heart. 2009 Jul;95(14):1145-52

31. YAOJIONG WU, ROBERT CH. The Role of Chemokines in Mesenchymal Stem Cell Homing to Myocardium. *Stem Cell Reviews and Reports*. March 2012, Volume 8, pp 243-250.
32. Ziadloo A, Burks SR, Gold EM, Lewis BK, Chaudhry A, Merino MJ, Frenkel V, Frank JA. Enhanced homing permeability and retention of bone marrow stromal cells by noninvasive pulsed focused ultrasound. *Stem Cells*. 2012 Jun;30(6):1216-27. doi: 10.1002/stem.1099.

ANEXOS

ANEXO A - LEGENDA

Apresentação de uma agulha de punção percutânea do coração para terapia celular.

Nathan Valle Soubiê Junior, José Eduardo Krieger, André Schmidt, Agnes A. S. A. Fagundes, Paulo R. B. Evora.

Departamento de Cirurgia e Anatomia (Fac. Med. Rib. Preto – USP) e INCOR (Fac. Med. – USP)

Introdução: Estudos com células-tronco, embasados em dados laboratoriais, demonstram uma melhora funcional e diminuição de isquemia miocárdica quando utilizadas em animais com infarto agudo do miocárdio. Estudos em animais têm observado diferentes resultados em função da via utilizada para a injeção das células, havendo uma nítida superioridade de resultados quando as injeções são realizadas de forma transendocárdica, se comparadas ao método intracoronário. Essa apresentação tem por objetivo: Descrição de método de punção, realização de biópsia e injeção de células-tronco no miocárdio, objetivando a terapia celular.

Método: O Instrumento de punção e injeção de material biológico é composto por uma agulha externa (1) de punção e injeção que contém na sua extremidade uma ponta romba (2), e que a aproximadamente cinco mm proximais apresenta orifícios múltiplos não cortantes de aproximadamente 0,5mm de diâmetro, denominados orifícios de infusão (3). Internamente é dotada de um mandril com ponta cega que quando introduzido na agulha externa, poderá mobilizar-se em seu interior de forma a preencher os orifícios laterais ocluindo-os ou liberando-os. Assim o instrumento pode ser utilizado para a injeção de material biológico. O procedimento de produção de micro lesões, é feito pela introdução do Mandril-Escova (4), dotado de micro cerdas é estruturalmente confeccionado de forma a preencher os orifícios com pequena exteriorização das cerdas (5). As microlesões tem papel fundamental na produção do Ambiente favorável a permanência das células infundidas no miocárdio por intermédio do mesmo instrumento (homing). Esses detalhes encontram-se representados nas figuras abaixo.

Conclusão. A técnica já está *in vivo* testada em modelo suíno que mostrou a sua viabilidade e segurança.

ANEXO B - LEGENDA

SHORT COMMUNICATION

Rev Bras Cir Cardiovasc 2013;28(3):405-7

Presentation of a needle for direct or percutaneous myocardium stem cells injection

Apresentação de uma agulha para injeção direta ou percutânea de células tronco no miocárdio

Nathan Valle Soubiê Junior¹, MD; Andre Schmidt¹, MD, PhD; Agnes Afrodite Sumarelli Albuquerque¹, BSc; Paulo Roberto Barbosa Evora¹, MD, PhD;

DOI: 10.5935/1678-9741.20130062

RBCCV 44205-1488

Abstract

The instrument has a locking mechanism and is composed of an external needle with blunt tip, with multiple 0.5 mm diameter holes. Internally it is fitted with a mandril needle, which can be mobilized inside occluding or releasing the lateral holes. The procedure for producing micro lesions is done by exchanging the blunt mandril for a brush-mandril, provided with micro bristles that are structurally designed to fill the holes with small exteriorization of bristles. As an option to brush mandril there is a second self-expandable feather shaped mandril.

Descriptors: Stem cells. Myocardial infarction. Biopsy. Myocardium.

Resumo

O instrumento tem um mecanismo de bloqueio e é composto por uma agulha externa de ponta romba com vários furos de diâmetro de 0,5 mm. Internamente é equipada com uma agulha de mandril, que pode ser mobilizada ocluindo ou liberando os orifícios laterais. O procedimento para a produção de microlesões é feito por meio da troca do mandril de ponta romba por um mandril escova provido de microcerdas metálicas estruturalmente concebidas para preencher os orifícios com a exteriorização das pequenas cerdas. Como alternativa para mandril escova há um segundo mandril autoexpansível com o formato de uma pequena pena.

Descritores: Células-tronco. Infarto do miocárdio. Biópsia. Miocárdio.

INTRODUCTION

Sutton et al. [1] wrote, in 1964, a brief historical review reporting that percutaneous introduction of a needle into the cardiac ventricular cavities of human beings was performed many years ago for therapeutic reasons. Summaries of indications and techniques were published by Henschen [2] and Lauter [3]. The feasibility of obtaining ventricular myocardial specimens from human beings either by open or closed

percutaneous routes was demonstrated in 1956 [4]. These old experiences proved that the heart tolerated these procedures very well, the myocardium quickly contracting around the small effect so that bleeding spontaneously ceased.

Studies on stem cells, based on laboratory data demonstrate functional improvement and reduction of myocardial ischemia when used in animals with acute myocardial infarction. Animal studies have shown different results, depending on the route used for the injection of the cells.

¹ Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (FMRP-USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Work carried out at Faculty of Medicine of Ribeirão Preto – USP (FMRP-USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Work funded by CNPq, FAPESP, FAPESP and USP

Correspondence address:

Paulo Roberto Barbosa Evora
Department of Surgery and Anatomy, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto,
University of São Paulo
Avenida Bandeirantes, 3900 – Monte Alegre – Ribeirão Preto, SP, Brazil –
Zip Code: 14048-900
E-mail: prbevara@fmrp.usp.br

Article received on April 7th, 2013
Article accepted on June 25th, 2013

There is a clear superiority of results when direct myocardial injections are compared with intracoronary injections. Alternative methods of application of cell therapy products in myocardial infarction, acute or subacute, were tested. Direct injection as adjunctive therapy to revascularization surgery is a viable proposition, but it caters to a select group of patients referred for surgical revascularization immediately after an acute ischemic event [5-8].

The aim of this presentation is to describe a method of percutaneous puncture and injection of stem cells in the myocardium. This device is an adaptation Soubiê needle that was used in the fifties and sixties for myocardial biopsies [9].

METHODS

The instrument is equipped with a locking mechanism, which allows its perfect mobilization as one single unit for micro lesions, and it can be used only as a needle, so it becomes a biological injection instrument. The instrument for myocardium puncturing and injection of biological material is composed of an external needle, which contains at its end a blunt tip and multiple 0.5 mm diameter holes. Internally it is fitted with a blunt mandrill, which when introduced into the external needle, can be mobilized inside to fill the lateral holes occluding or releasing them. This instrument is harmless to myocardial fibers and coronaries as it had been proved when its first designed shape was used to perform heart biopsies, in the past (Figures 1 and 2).

Fig. 1 - Schematic presentation. The instrument has a locking mechanism (1,2,3) and is composed of an external needle with blunt tip, with multiple 0.5 mm diameter holes (4,5). Internally it is fitted with a mandrill needle, which can be mobilized inside occluding or releasing the lateral holes. The procedure for producing micro lesions is done by exchanging the blunt mandrill for a brush-mandrill, provided with micro bristles that are structurally designed to fill the holes with small exteriorization of bristles (6). As an option to brush mandrill there is a second self-expandable feather shaped mandrill (7).

Fig. 2 - Photo presentation. A: Locking mechanism; B: External needle with blunt tip, with multiple 0.5 mm diameter holes. C: Brush-mandrill; D: Self-expandable feather shaped mandrill

The main objective of the puncturing procedure is to release stem cells into the myocardium. For that, micro lesions should be performed to "receive" the stem cells. The procedure for producing micro lesions is done by exchanging the blunt mandrill by a brush-mandrill, provided with micro bristles that are structurally designed to fill the holes with small exteriorization of bristles. As an option to brush mandrill there is a second self-expandable feather shaped mandrill.

DISCUSSION

A very important characteristic of this instrument is safety. The blunt end of the needle guaranties that during the punching process, in case of unexpected touch of a coronary artery, the vessel will not be hurt or cut, but the needle will slide sideways from it. Therefore, stem cells are injected into the heart while it is perfectly pumping, with the chest unopened. A real possibility is the direct intramyocardial injection during thoracotomy through specific or during the surgical treatment of coronary artery disease [10,11].

Authors' roles & responsibilities

NVSJ	Original idea and design of the project
AS	Project planning
AASA	Technical support
PRBE	Study design and writing of the paper

ACKNOWLEDGEMENTS

To FAPESP, CNPq, FAEPa and University of São Paulo for funding the research. To Dr. José Eduardo Krieger and Dr. Rafael Dariolli for their support and guidance during preliminary testing needle in INCOR-SP.

REFERENCES

1. Sutton GC, Driscoll JF, Gunnar RM, Tobin JR Jr. Exploratory mediastinotomy in primary myocardial disease. *Progr Cardiovasc Dis*. 1964;7:83-97.
2. Henschen K. Die wiederbelebung des herzens durch peri- und intrakardiale injektion durch herzaderlass und herzzinfusion. *Schweiz Med Wchmschr*. 1920;1:261.
3. Lauter S. Kreislaufprobleme. *Miinchener Med Wchmschr*. 1930;77:526.
4. Kent G, Sutton DC, Sutton GC. Needle biopsy of the human ventricular myocardium. *Q Bull Northwest Univ Med Sch*. 1956;30(3):213-4.
5. Strauer BE, Kornowski R. Stem cell therapy in perspective. *Circulation*. 2003;107(7):929-34.
6. Perin EC, Geng YJ, Willerson JT. Adult stem cell therapy in perspective. *Circulation*. 2003;107(7):935-8.
7. Ladage D, Ishikawa K, Tilemann L, Müller-Ehmsen J, Kawase Y. Percutaneous methods of vector delivery in preclinical models. *Gene Ther*. 2012;19(6):637-41.
8. Krause K, Jaquet K, Schneider C, Haupt S, Lioznov MV, Orte KM, et al. Percutaneous intramyocardial stem cell injection in patients with acute myocardial infarction: first-in-man study. *Heart*. 2009;95(14):1145-52.
9. Soubiê NV. Herzbiopsie. *Thoraxchirurgie*. 1961;9:31.
10. Galantier M, Moreira GB, Bub RF, Galantier J, Buffolo E, Carvalho AC, et al. Revascularização transmiocárdica a laser. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 1996;11(2):67-74.
11. Dallan LA, Gowdak LH, Lisboa LA, Schetttert I, Krieger JE, Cesar LA, et al. Cell therapy plus transmyocardial laser revascularization: a proposed alternative procedure for refractory angina. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2008;23(1):46-52.

ANEXO C- LEGENDA

« Uso exclusivo do INPI »

INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
18/06/2013 12:06:03
BR 10 2013 015282 0

Espaço reservado para o protocolo Espaço reservado para a etiqueta Espaço reservado para o código QR

INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA <small>Título do Documento</small>	Tipo de Documento Formulário	DIRPA	Página 1/3
Depósito de Pedido de Patente		Código FQ991	Versão 2
		Processamento DIRPA-PQ001	

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:
O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. **Depositante (71):**

1.1 Nome: Dr.Nathan Valle Soubiê Junior

1.2 Qualificação: Médico

1.3 CNPJ/CPF: 071.706.728-98

1.4 Endereço Completo: Av.Independência n° 3181 - sls-jd.Sumaré-Ribeirão Preto- SP

1.5 CEP: 14025-350

1.6 Telefone: 16-39119595 1.7 Fax: 16-39119596

1.8 E-mail: clivioavassimon@netvite.com.br

☐ continua em folha anexa

2. **Natureza:** ☒ Invenção ☐ Modelo de Utilidade ☐ Certificado de Adição

3. **Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):**

SISTEMA DE AGULHA DE PUNÇÃO E INJEÇÃO DE MATERIAIS BIOLÓGICOS OU MEDICAMENTOS NO MIOCÁRDIO

☐ continua em folha anexa

4. **Pedido de Divisão: do pedido Nº** **Data de Depósito:**

5. **Prioridade:** ☐ Interna (56) ☐ Unionista (30)

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

Folha ou Organização do depósito	Número do depósito (se disponível)	Data do depósito

☐ continua em folha anexa