

USO DAS CÉLULAS-TRONCO APLICADO À CARDIOLOGIA

* Rogério Sarmiento-Leite, ** Hans Fernando Dohmann

* Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul/Fundação Universitária de Cardiologia. Porto Alegre-RS

** Hospital Pró-Cardíaco. Rio de Janeiro/RJ

Introdução

As doenças cardiovasculares permanecem como uma grande causa de mortalidade na população de nosso país, sendo o que o infarto agudo do miocárdio (IAM) se sobressai entre elas. Entre os sobreviventes do infarto do miocárdio, muitos desenvolvem como seqüela a insuficiência cardíaca (IC), o que gera grande morbidade com piora da qualidade de vida destes pacientes e um enorme consumo de recursos do sistema de saúde público e privado. A probabilidade de evoluir com IC após um IAM é maior nos pacientes não submetidos à terapia de reperfusão nas primeiras horas após o início dos sintomas ou naqueles em que houve insucesso na tentativa de reperfusão miocárdica.¹ Por outro lado, pacientes com IAM submetidos à reperfusão miocárdica bem sucedida, que ocorre em 80% dos casos com o uso de trombolíticos e em mais de 90% com a angioplastia primária, apresentam mortalidade intra-hospitalar inferior a 5%,² evoluem com menor remodelamento cardíaco, maior fração de ejeção do VE e menos comumente cursam com IC.³ Pacientes submetidos à terapia de reperfusão apresentam grau de salvamento miocárdico variável relacionado principalmente ao tempo de isquemia miocárdica e a efetividade da terapia de reperfusão.^{4,5}

A IC, que tem entre suas causas mais freqüentes a cardiomiopatia isquêmica, é um mal epidêmico neste início de século, que afeta de 2 a 4 milhões de pessoas nos Estados Unidos (EUA), e cerca de 15 milhões de pessoas ao redor do planeta. No Brasil, segundo o DATASUS, a IC gera mais de 400.000 internações/ano, sendo a quarta maior causa de internação hospitalar (3,58% de todas as internações feitas em 1997). Este total representa cerca de 37% de todas as internações por doenças circulatórias, sendo que a mortalidade hospitalar foi de 6,39%. Dos pouco mais de R\$ 3 bilhões gastos naquele ano com internações hospitalares pelo Sistema Único de Saúde (SUS), cerca de R\$ 150 milhões foram destinados às internações devido à IC.

Terapia Celular

Hoje, pacientes que evoluem com disfunção sistólica pós-IAM são tratados com inibidores da enzima de conversão da angiotensina e beta-bloqueadores, a fim de modular a ativação neuro-hormonal e o remodelamento miocárdico.^{6,7} Estas estratégias visam a melhorar a resposta de reparação do infarto. Mais recentemente, uma nova perspectiva vem sendo pesquisada a fim de repor a perda celular associada ao infarto: a regeneração tecidual. Com este objetivo, terapias com aplicação de células para o tratamento de doenças cardiovasculares encontram-se sob investigação em vários centros no mundo, usando variadas linhagens celulares em modelos experimentais.⁸⁻¹²

As células-tronco (CT) são o tipo celular com maior potencial e interesse na atualidade. As CT se caracterizam por serem células indiferenciadas, capazes de se auto-regenerarem, e de produzirem um grande número de células diferenciadas funcionais. As CT podem ter origem embrionária ou adulta.

De acordo com a sua capacidade de auto-renovação e diferenciação, as CT podem ser classificadas como toti-potentes, pluri-potentes ou multi-potentes:

- Células toti-potentes têm a capacidade de gerarem sozinhas um novo embrião.

- Células pluri-potentes podem proliferar-se indefinidamente *in vitro* sem se diferenciar, mas também podem diferenciar-se em diferentes linhagens celulares se as condições de cultivo das células forem modificadas. São tipicamente as células-tronco embrionárias (ES). Recentemente várias evidências indicam que algumas células-tronco adultas também possuem esta propriedade.

- Células multi-potentes têm capacidade mais reduzida para diferenciação, estando destinada a linhagens celulares específicas, como por exemplo as células progenitoras de linhagens específicas.

Alguns trabalhos *in vivo* do final da década de 90 utilizaram um outro tipo celular para aplicação cardíaca: as células satélites do músculo esquelético em transplantes celulares.^{11,13} O implante de mioblastos nas áreas de fibrose, realizado durante a cirurgia de revascularização miocárdica, foi a primeira descrição de terapia celular em humanos para tratamento de doenças cardíacas.^{14,15} A reparação tecidual por meio do implante destes mioblastos tem por objetivo aumentar a contratilidade segmentar e reduzir a tensão da parede ventricular e foi realizado por intermédio de injeções transepicárdicas sob visualização direta. No entanto, existe uma preocupação crescente sobre o comportamento eletrofisiológico destas ilhas de miocárdio esquelético em meio a fibrose e mesmo sobre o acoplamento destas novas células com os cardiomiócitos nativos. Arritmias ventriculares malignas foram descritas por alguns centros europeus¹⁶, sendo atualmente recomendável o uso de desfibriladores implantáveis ou drogas anti-arrítmicas nestes estudos.

Células Tronco Embrionárias

Em 1981, dois grupos independentes conseguiram imortalizar células derivadas da massa celular interna de blastocistos de embriões de camundongos. Estas células, denominadas de células ES - do inglês "embryonic stem cells" (células-tronco embrionárias) - são denominadas de pluripotentes e é necessário cultivá-las sob condições especiais para que elas permaneçam indiferenciadas. Outra característica especial destas células é que elas podem ser reintroduzidas em embriões de camundongos, dando origem a células em todos os tecidos do animal adulto, inclusive a células germinativas (óvulos e espermatozoides, que constituem a chamada linhagem germinal). A disponibilidade de células ES de camundongos tornou corriqueira a manipulação genética destes animais. A possibilidade de introduzir genes exógenos ou deletar genes endógenos nas células ES *in vitro* e depois reimplantá-las nos embriões, dando inclusive origem a células germinativas nos animais adultos, tornou possível a geração de camundongos transgênicos, expressando novos genes ou desprovidos de genes normalmente presentes no animal normal (os animais "knockouts"). Estes camundongos transgênicos têm possibilitado a caracterização de muitas doenças humanas resultantes

de alterações genéticas.

O fato de as células ES se integrarem a todos os tecidos do animal adulto, após sua reintrodução nos embriões de camundongo, revela que, potencialmente, elas podem se diferenciar *in vitro* em qualquer célula do organismo, de uma célula da pele a um neurônio. Na realidade, diversos laboratórios obtiveram sucesso com o cultivo e diferenciação das células ES de camundongos em tipos celulares tão distintos quanto as células hematopoiéticas (produtoras de sangue) e células do sistema nervoso (neurônios, astrócitos e oligodendrócitos), dentre outras. A capacidade de direcionar este processo de diferenciação permitiria que, a partir das ES, pudessemos cultivar controladamente os mais diferentes tipos celulares, abrindo a possibilidade de construir *in vitro*, na placa de cultura, tecidos e órgãos, tornando viável a bioengenharia tecidual.

Em 1998, James Thomson e colaboradores conseguiram imortalizar células ES de embriões humanos. No mesmo ano, células embrionárias germinativas humanas (EG do inglês "embryonic germ cells"), derivadas das células reprodutivas primordiais de fetos, foram imortalizadas por John Gearhart e colaboradores. Estas células, como as células ES, são pluripotentes, podendo se diferenciar em qualquer célula do organismo adulto.

A disponibilidade de células ES e EG humanas abriu horizontes inimagináveis para a medicina, mas também trouxe consigo complexos problemas ético-religiosos. Se pudermos imaginar o cultivo de células ES humanas gerando neurônios em culturas que substituiriam as células nervosas danificadas, em doenças como o mal de Parkinson e a doença de Alzheimer, não poderemos nos esquecer de que tais células foram geradas a partir de embriões humanos, que, ao servirem como fonte de células ES, foram sacrificados. Ao mesmo tempo, a disponibilidade de células ES humanas e os experimentos de transferência nuclear tornaram a clonagem de seres humanos uma possibilidade cada vez mais real. Diante de questões tão polêmicas, é necessário que a sociedade como um todo se manifeste, por meio de seus legisladores, para balizar o que se tornará socialmente aceitável no uso de CT embrionárias humanas para fins médicos.

Atualmente a maioria dos estudos em humanos se concentra em células de origem adulta e autóloga, em oposição ao uso de células de origem embrionária.

Células-Tronco Adultas

Na década de 60 foi descoberto que organismos adultos têm capacidade de auto-regenerar determinados tecidos, como a pele, o epitélio intestinal e principalmente o sangue, que tem suas células constantemente destruídas e renovadas, num complexo e finamente regulado processo de proliferação e diferenciação celular. Durante muitas décadas estudou-se o processo de hematopoiese (processo de produção das células sanguíneas) a partir de CT multipotentes, localizadas no interior dos ossos, que são capazes de dar origem a células progressivamente mais diferenciadas e com menor capacidade proliferativa. As células mesenquimais da medula óssea, as CT multipotentes, geram as linhagens progenitoras mielóide e linfóide, que terminam por dar origem a todos os nove tipos celulares presentes no sangue, de hemácias a linfócitos. O processo de renovação celular é tão intenso que diariamente 2^{13} novas células sanguíneas entram na circulação. É assombroso que o organismo consiga manter um processo proliferativo tão exuberante sob controle, impedindo, em circunstâncias normais, que o número de células produzidas exceda o necessário e que as células liberadas na circulação estejam no estágio correto de diferenciação.

A noção de que vários tecidos e órgãos do corpo humano, como o fígado, músculo esquelético, pâncreas, e sistema nervoso, têm um estoque de células-tronco, com uma capacidade limitada de regeneração tecidual após injúria, é recente. Ainda mais recente é a idéia de que as células-tronco presentes nestes vários órgãos não são apenas multipotentes, no sentido de que podem gerar as células constitutivas daquele órgão específico, mas também pluripotentes, no sentido de que também podem gerar células de outros órgãos e tecidos.¹⁷⁻²⁰ Obviamente, a possibilidade de utilizar as próprias células de indivíduos adultos resolvia simultaneamente os dois principais problemas enfrentados pela bioengenharia: a rejeição imunológica de transplantes heterólogos e as objeções ético-religiosas do uso de material fetal. O primeiro relato incontestável desta propriedade das CT adultas foi feito em 1998, por um grupo de cientistas italianos que

estudaram a regeneração do músculo esquelético por células derivadas da medula óssea.²¹

Vários estudos recentes vêm demonstrando, de forma cada vez mais consistente, que células originadas na MO participam de maneira intensa da regeneração de várias estruturas do sistema cardiovascular.

Células da Medula Óssea e Cardiomiócitos

Estudos *in vitro* demonstraram que células mononucleares da medula óssea podem se diferenciar em cardiomiócitos, cuja atividade elétrica espontânea e os receptores funcionais adrenérgicos e muscarínicos foram detectados.²²⁻²⁴ Embora os trabalhos de Makino e Tomita e colaboradores tenham utilizado condições de cultivo dos aspirados de medula óssea que favorecem a seleção de células de estroma, em nenhum dos dois trabalhos os autores se preocuparam com uma caracterização fenotípica mais exata do(s) tipo(s) celular(es) que eram capazes de se diferenciar em cardiomiócitos em cultura.

Estudos *in vivo* foram conduzidos em modelos com ratos, cães e porcos, em modelos de coração normal, pós-IAM e crioinjúria. Orlic et al demonstraram em ratos que células de medula óssea injetadas na borda de áreas infartadas se transformaram em cardiomiócitos.²⁵ Jackson et al demonstraram que após o IAM células marcadas de MO em ratos povoaram a área das bordas do infarto.²⁶ Toma et al demonstraram que células mesenquimais de medula óssea de humanos transplantadas em coração normal de ratos se transformaram em cardiomiócitos.²⁷ Estes resultados foram reproduzidos em modelos suínos de IAM, onde cardiomiócitos, juntamente com novos vasos originados de medula óssea, foram identificados.²⁸ Em recente série de casos de análise histopatológica de autópsias de coração de mulheres submetidas a transplante de medula óssea de doadores homens, Deb et al observaram a presença de cardiomiócitos com cromossomos XY, ou seja, cardiomiócitos com origem na medula óssea.²⁹ Outros estudos já haviam descrito a origem extra-cardíaca de novos cardiomiócitos,³⁰⁻³⁴ mas este foi o primeiro a identificar a MO como fonte de novos cardiomiócitos, revolucionando assim o conceito até então vigente de que não há regeneração da musculatura cardíaca.

Células Precursoras Endoteliais (CPE) se Originam da Medula Óssea e Participam da Angiogênese

O paradigma de que as células endoteliais eram geradas por replicação de células endoteliais maduras foi revolucionado. Asahara et al observaram que grande parte das células envolvidas no processo de angiogênese tinham origem na MO.³⁵ Mais ainda, possibilitaram a descoberta de que há vasculogênese na vida adulta, ou seja, que ocorre surgimento de novos vasos na vida adulta e não somente a replicação de capilares a partir de vasos já existentes, conceito que responde por angiogênese. Após esta publicação muitas outras se seguiram, confirmando estes resultados.³⁶⁻⁴⁵

As células precursoras endoteliais, originadas na medula óssea, poderiam ser identificadas como CD34+ e VEGFR2+, embora outros marcadores como o AC133+ e CD31+ tenham sido descritos.^{46,47} Durante a isquemia tecidual, com a queda dos níveis de oxigênio, ocorre aumento da produção de HIF-1, que por sua vez desencadeará o aumento de vários fatores de crescimento, mais notadamente o VEGF. O aumento de VEGF vai ser o principal estímulo para a mobilização das células da MO, assim como o principal sinal para o "homing" destas células nos tecidos isquêmicos e sua posterior diferenciação em células endoteliais em estruturas tubulares.⁴⁸ A aplicação intra-miocárdica cirúrgica de plasmídeo de DNA codificado para VEGF para a neovascularização terapêutica mobilizou as CPE num estudo clínico.⁴⁹

Shintani et al estudaram pacientes com IAM submetidos a angioplastia primária com sucesso e observaram significativa elevação das CPE (mononucleares CD34+, KDR+) originadas da MO, que apresentaram pico sérico no sétimo dia pós-IAM. Os níveis de CPE tiveram relação com os níveis de séricos de VEGF ($r=0,35$, $p=0,01$).⁵⁰ Kocher et al sugeriram que a neovascularização que ocorre naturalmente após o IAM seria insuficiente para suprir células ainda vivas sob risco e a maior oferta de CPE poderia potencializar esta resposta.⁴⁶

A utilização de células originadas da MO em experimentos de neovascularização já conta com literatura consistente, no quais foram utilizados modelos de isquemia miocárdica aguda e crônica que foram

conduzidos em diversos animais, utilizando a via intra-coronária, via transendocárdica e a via transepicárdica.^{9,46,47,51-59}

O implante de células-tronco originadas na medula óssea (CT-MO) foi capaz de melhorar a contração e a perfusão miocárdica em modelos animais de infarto miocárdico e isquemia crônica.^{9,28,46,58,60} Modelos de membro isquêmico em animais também foram bem sucedidos na neovascularização utilizando células de MO.^{53,56}

Técnica de Obtenção e Transplante do Material Celular

As CT-MO são normalmente retiradas da crista íliaca posterior dos pacientes sob anestesia local na Unidade Coronariana. Um volume total aproximado de 200 ml é aspirado por punções nas cristas íliacas e o material será enviado a um laboratório especializado, onde células mononucleares serão selecionadas e, então, reenviadas ao Hospital responsável pelo transplante.

A medula óssea constitui fonte permanente de elementos celulares para estudos de células hematopoiéticas clonais, histologia, imunocitologia, citogenética e análises moleculares. É um meio fácil, seguro e relativamente barato de diagnosticar importantes anormalidades do sistema hematopoiético. O aspirado de MO pode ser obtido sem risco significativo (porém com discreto desconforto), fácil e prontamente processado para exame.

O aspirado de MO é realizado em ambiente de terapia intensiva ou bloco cirúrgico, com sedação e analgesia do paciente, a fim de minimizar a ansiedade e a dor. Existem diversos tipos de agulhas para este procedimento, a maioria das quais satisfatórias, sendo recomendável uma agulha de 1,8 milímetros de diâmetro.

O procedimento de aspiração é relativamente simples, envolvendo basicamente material cirúrgico de pequeno porte e uma agulha apropriada, que pode ser descartável e/ou agulha de Jamshidi. Após a anti-sepsia adequada da pele, é feita anestesia local com Lidocaína a 1% sem vasoconstritor - não devendo ultrapassar um volume de 20ml- a partir da pele, passando pelo tecido subcutâneo, atingindo o periósteo, em forma de botão. Feito isso, aspira-se um volume com quantidade média de 0.2 a 0.5ml de aspirado, com seringa de 10 ou 20ml, de acordo com as necessidades. A aspiração pode desencadear uma sensação de dor transitória na maioria dos pacientes. Feito o aspirado, pressionar o local por pelo menos 5 minutos; em relação aos pacientes trombocitopênicos, deve-se pressionar por durante 10 a 15 minutos. Obtido o aspirado, o mesmo poderá ser imerso em meio anticoagulante-preservativo, tais como EDTA.

Uma vez coletado o aspirado medular, procurar-se-á enriquecer o conteúdo de células-tronco, separando-as de células já diferenciadas contidas naquele aspirado.

O material será filtrado no kit de coleta de medula óssea (Baxter) para eliminar fragmentos de osso e grumos celulares. O material será em seguida submetido à separação de eritrócitos, por sedimentação, usando o HESPAN (30 min). A fração superior será colhida, as células serão submetidas à seleção negativa das populações que expressam marcadores membranares de diferenciação: Glyco A, CD4, CD8, CD3, CD14, CD16, CD19, CD24 e CD56. As células serão encubadas com esferas magnéticas acopladas com anticorpos específicos para os antígenos citados, e as células reconhecidas serão separadas por campo magnético (tempo estimado 60 min). As células linhagem-negativas (lin⁻) serão colhidas e usadas para a injeção no músculo cardíaco.

Estudos Clínicos com Células Mononucleares da MO na Doença Arterial Coronariana e na Doença Arterial Periférica.

O primeiro relato de caso do uso de CT-MO foi realizado na Alemanha pelo Dr Budo Strauer, em agosto de 2001, que realizou a injeção de CT-MO por via coronariana em um paciente após o IAM com segurança.⁶¹ No mês seguinte, Hamano et al relataram cinco casos realizados no Japão, onde o transplante intra-miocárdico das CT-MO foi realizado durante cirurgia de revascularização miocárdica em territórios não revascularizáveis, quando 3 de 5 pacientes obtiveram melhora da perfusão miocárdica nos territórios injetados.⁶² Recentemente, estes resultados foram reproduzidos na Alemanha.⁶³

Na primeira série de casos de transplante de células por via

coronariana pós-IAM, Strauer et al selecionaram 10 pacientes com IAM tratados por angioplastia primária tardiamente (12 horas). Entre os critérios de inclusão não constaram viabilidade miocárdica na área infartada ou fração de ejeção do VE. Os pacientes foram submetidos ao transplante de células entre 5 e 9 dias após o IAM. As células foram injetadas pelo lumen de um balão de angioplastia, o qual foi insuflado no local da lesão responsável pelo IAM, e o número médio de células foi de $28 \pm 22 \times 10^6$, fracionadas em 6 a 7 injeções. Os procedimentos foram realizados com segurança em todos os pacientes. Ao final de 3 meses, os pacientes apresentaram melhora da contratilidade na área infartada, assim como redução do volume sistólico final (redução de 18%), sugerindo um efeito benéfico no remodelamento cardíaco. Na análise da perfusão em repouso com tálcio, houve redução da área com defeito de perfusão em 26%.⁶⁴

No estudo TOPCARE, também realizado na Alemanha, o uso de CT-MO (n=9) e CT selecionadas no sangue periférico (n=11) por infusão intra-coronariana 4 dias após o IAM tratados por angioplastia primária sugeriu redução da área de necrose ao final de 4 meses. Nos pacientes avaliados por tomografia com emissão de pósitrons houve aumento de 15% na captação de FDG-18 na área infartada. Paralelamente, houve significativa redução de 25% no volume sistólico final, associado à melhora da FE, ambos não observados num grupo controle não randomizado (n=11). Ressalta-se que houve melhora da contratilidade regional, mesmo em pacientes que não tiveram critérios de viabilidade miocárdica ao ecocardiograma com dobutamina.⁶⁵

No Japão, a aplicação de CT-MO para angiogênese em pacientes com doença arterial de membros inferiores grave obteve resultados impressionantes com aplicações musculares no gastrocnêmio.⁶⁶

O grupo do Hospital Procárdico no Rio de Janeiro, em parceria com o Texas Heart Institute, a Universidade Federal do Rio de Janeiro e o Instituto do Milênio, iniciou o Projeto Células-Tronco, com um estudo autorizado pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) para o transplante transendocárdico por cateter de CT-MO em pacientes com grave cardiomiopatia isquêmica sem possibilidade de revascularização miocárdica convencional. Quatorze pacientes foram submetidos à terapia celular. Os transplantes de células foram realizados com o uso dos cateteres NOGA e os procedimentos foram realizados sem complicações maiores, sendo que todos os pacientes receberam alta hospitalar em 48 horas. Em dois meses de acompanhamento houve significativa melhora dos sintomas. Houve melhora da perfusão miocárdica, com redução da área de isquemia miocárdica de 15,1% para 4,5% da área do VE (p=0,02), redução do volume sistólico final em 15% e melhora relativa de 31% na FE.⁶⁷, com resultados mantidos no seguimento de 6 e 12 meses.⁶⁸

Tse et al também realizaram transplantes de CT-MO utilizando cateteres NOGA e observaram redução da área de isquemia à ressonância magnética, avaliando a perfusão miocárdica (de 8,8% para 5,0%; p=0,004) após 3 meses. Houve melhora da contratilidade regional na área injetada.⁶⁹

No Instituto de Cardiologia, um grupo de pesquisa multidisciplinar foi criado e vários projetos estão em criação e desenvolvimento. No mais adiantado deles, pacientes com cardiomiopatia isquêmica crônica de grau avançado, vêm sendo submetidos a procedimentos de revascularização miocárdica cirúrgica associada à terapia celular com injeção direta da fração mono-celular de células de medula óssea autólogas em áreas de infarto sub-endocárdico e transmural sem condições de receberem enxertos venosos ou arteriais. O seguimento é clínico e com cintilografia miocárdica e os resultados têm sido promissores, nos remetendo a importantes considerações e reflexões técnicas e mecanísticas sobre essa patologia e novas possibilidades terapêuticas.

Conclusão e Perspectivas Futuras

A terapia celular e gênica tem-se mostrado muito promissora como opção de tratamento. Reside aqui, provavelmente, a maior perspectiva de uso clínico desta moderna tecnologia, surgindo como alternativa de "solução" para o "paciente sem soluções". Obviamente, ainda nos encontramos em fase inicial de investigação e pesquisa, e os resultados obtidos no mundo ainda são preliminares. Por outro lado, o progresso da cardiologia nos últimos tempos é impressionante, tornando-se evidente que esta área será ainda mais lapidada e evoluída. Novos paradigmas podem firmar-se com o desenvolvimento desses novos recursos. Neste particular, a terapia celular fornece alguns dos substratos necessários às realizações desses

experimentos. Entretanto, serão necessários, ainda, estudos futuros com esforços colaborativos que unam ações governamentais, da sociedade civil e de entidades de pesquisa básica e clínica para uma completa validação e plena difusão do método como uso terapêutico. Um grande investimento com aporte de recursos financeiros e subsídios serão imprescindíveis. Serão fundamentais: ética, transparência e cuidado na aferição e escrutínio dos resultados e paciência para sua completa incorporação ao arsenal terapêutico do cardiologista.

Referências Bibliográficas

1. Wu AH, Parsons L, Every NR, Bates ER. Hospital outcomes in patients presenting with congestive heart failure complicating acute myocardial infarction: a report from the Second National Registry of Myocardial Infarction (NRMI-2). *J Am Coll Cardiol.* 2002;40:1389-94.
2. Henriques JP, Zijlstra F, van 't Hof AW, et al. Angiographic assessment of reperfusion in acute myocardial infarction by myocardial blush grade. *Circulation.* 2003;107:2115-9.
3. Gibson CM, Murphy SA, Rizzo MJ, et al. Relationship between TIMI frame count and clinical outcomes after thrombolytic administration. Thrombolysis In Myocardial Infarction (TIMI) Study Group. *Circulation.* 1999;99:1945-50.
4. Hasche ET, Fernandes C, Freedman SB, Jeremy RW. Relation between ischemia time, infarct size, and left ventricular function in humans. *Circulation.* 1995;92:710-9.
5. Christian TF, Schwartz RS, Gibbons RJ. Determinants of infarct size in reperfusion therapy for acute myocardial infarction. *Circulation.* 1992;86:81-90.
6. Pfeffer MA, Braunwald E, Moye LA, et al. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. *N Engl J Med.* 1992;327:669-77.
7. Dargie HJ. Effect of carvedilol on outcome after myocardial infarction in patients with left-ventricular dysfunction: the CAPRICORN randomised trial. *Lancet.* 2001;357:1385-90.
8. Hughes S. Cardiac stem cells. *J Pathol.* 2002;197:468-78.
9. Fuchs S, Baffour R, Zhou YF, et al. Transendocardial delivery of autologous bone marrow enhances collateral perfusion and regional function in pigs with chronic experimental myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol.* 2001;37:1726-32.
10. Sakai T, Li RK, Weisel RD, et al. Autologous heart cell transplantation improves cardiac function after myocardial injury. *Ann Thorac Surg.* 1999;68:2074-80; discussion 2080-1.
11. Scorsin M, Hagege A, Vilquin JT, et al. Comparison of the effects of fetal cardiomyocyte and skeletal myoblast transplantation on postinfarction left ventricular function. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2000;119:1169-75.
12. Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P, et al. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med.* 1998;4:929-33.
13. Scorsin M, Hagege AA, Marotte F, et al. Does transplantation of cardiomyocytes improve function of infarcted myocardium? *Circulation.* 1997;96:1188-93.
14. Menasche P, Hagege A, Scorsin M, et al. [Autologous skeletal myoblast transplantation for cardiac insufficiency. First clinical case]. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 2001;94:180-2.
15. Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, et al. Myoblast transplantation for heart failure. *The Lancet.* 2001;357:279-280.
16. Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular

dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41:1078-83.

17. Goodell MA, Jackson KA, Majka SM, et al. Stem cell plasticity in muscle and bone marrow. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;938:208-18; discussion 218-20.
18. Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Gene Ther.* 2002;9:754-8.
19. Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, et al. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology.* 2000;32:11-6.
20. Malouf NN, Coleman WB, Grisham JW, et al. Adult-Derived Stem Cells from the Liver Become Myocytes in the Heart in Vivo. *Am J Pathol.* 2001;158:1929-1935.
21. Ferrari G, Cusella-DeAngelis G, Coletta M, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science.* 1998;279:1528-30.]
22. Hakuno D, Fukuda K, Makino S, et al. Bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes (CMG Cells) express functional adrenergic and muscarinic receptors. *Circulation.* 2002;105:380-6.
23. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest.* 1999;103:697-705.
24. Tomita S, Li RK, Weisel RD, et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation.* 1999;100:11247-56.
25. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature.* 2001;410:701-5.
26. Jackson KA, Majka SM, Wang H, et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest.* 2001;107:1395-402.
27. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation.* 2002;105:93-8.
28. Tomita S, Mickle DA, Weisel RD, et al. Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2002;123:1132-40.
29. Deb A, Wang S, Skelding KA, et al. Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart: A study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients. *Circulation.* 2003;107:1247-9.
30. Bayes-Genis A, Salido M, Sole Ristol F, et al. Host cell-derived cardiomyocytes in sex-mismatch cardiac allografts. *Cardiovasc Res.* 2002;56:404-10.
31. Glaser R, Lu MM, Narula N, Epstein JA. Smooth Muscle Cells, But Not Myocytes, of Host Origin in Transplanted Human Hearts. *Circulation.* 2002;106:17-19.
32. Laflamme MA, Myerson D, Saffitz JE, Murry CE. Evidence for cardiomyocyte repopulation by extracardiac progenitors in transplanted human hearts. *Circ Res.* 2002;90:634-40.
33. Muller P, Pfeiffer P, Koglin J, et al. Cardiomyocytes of noncardiac origin in myocardial biopsies of human transplanted hearts. *Circulation.* 2002;106:31-5.
34. Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, et al. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med.* 2002;346:5-15.
35. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997;275:964-7.
36. Asahara T, Isner JM. Endothelial progenitor cells for vascular regeneration. *J Hematother Stem Cell Res.* 2002;11:171-8.
37. Bhattacharya V, McSweeney PA, Shi Q, et al. Enhanced

endothelialization and microvessel formation in polyester grafts seeded with CD34(+) bone marrow cells. *Blood*. 2000;95:581-5.

38. Boyer M, Townsend LE, Vogel LM, et al. Isolation of endothelial cells and their progenitor cells from human peripheral blood. *J Vasc Surg*. 2000;31:181-9.
39. Davidoff AM, Ng CY, Brown P, et al. Bone marrow-derived cells contribute to tumor neovasculature and, when modified to express an angiogenesis inhibitor, can restrict tumor growth in mice. *Clin Cancer Res*. 2001;7:2870-9.
40. Edelberg JM, Tang L, Hattori K, Lyden D, Rafii S. Young adult bone marrow-derived endothelial precursor cells restore aging-impaired cardiac angiogenic function. *Circ Res*. 2002;90:E89-93.
41. Gill M, Dias S, Hattori K, et al. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)/AC133(+) endothelial precursor cells. *Circ Res*. 2001;88:167-74.
42. Gunsilius E. Bone marrow-derived endothelial cells for therapeutic angiogenesis and antiangiogenesis: facts and visions. *J Hematother Stem Cell Res*. 2002;11:153-5.
43. Ikpeazu C, Davidson MK, Halteman D, Browning PJ, Brandt SJ. Donor origin of circulating endothelial progenitors after allogeneic bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2000;6:301-8.
44. Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest*. 2000;105:71-7.
45. Shi Q, Rafii S, Wu MH, et al. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*. 1998;92:362-7.
46. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med*. 2001;7:430-6.
47. Kawamoto A, Tkebuchava T, Yamaguchi J-I, et al. Intramyocardial Transplantation of Autologous Endothelial Progenitor Cells for Therapeutic Neovascularization of Myocardial Ischemia. *Circulation*. 2003;107:461-468.
48. Buschmann I, Schaper W. The pathophysiology of the collateral circulation (arteriogenesis). *J Pathol*. 2000;190:338-42.
49. Kalka C, Tehrani H, Laudenberg B, et al. VEGF gene transfer mobilizes endothelial progenitor cells in patients with inoperable coronary disease. *Ann Thorac Surg*. 2000;70:829-34.
50. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*. 2001;103:2776-9.
51. Asahara T, Kalka C, Isner JM. Stem cell therapy and gene transfer for regeneration. *Gene Ther*. 2000;7:451-7.
52. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*. 1999;85:221-8.
53. Al-Khalidi A, Al-Sabti H, Galipeau J, Lachapelle K. Therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow stromal cells: improved blood flow in a chronic limb ischemia model. *Ann Thorac Surg*. 2003;75:204-9.
54. Carmeliet P, Luttun A. The emerging role of the bone marrow-derived stem cells in (therapeutic) angiogenesis. *Thromb Haemost*. 2001;86:289-97.
55. Hamano K, Li TS, Kobayashi T, et al. Therapeutic angiogenesis induced by local autologous bone marrow cell implantation. *Ann Thorac*

Surg. 2002;73:1210-5.

56. Hamano K, Li TS, Kobayashi T, et al. The induction of angiogenesis by the implantation of autologous bone marrow cells: a novel and simple therapeutic method. *Surgery*. 2001;130:44-54.
57. Ikenaga S, Hamano K, Nishida M, et al. Autologous bone marrow implantation induced angiogenesis and improved deteriorated exercise capacity in a rat ischemic hindlimb model. *J Surg Res*. 2001;96:277-83.
58. Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, et al. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation*. 2001;104:1046-52.
59. Takakura N, Watanabe T, Suenobu S, et al. A role for hematopoietic stem cells in promoting angiogenesis. *Cell*. 2000;102:199-209.
60. Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, et al. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg*. 2002;73:1919-25; discussion 1926.
61. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, et al. [Intracoronary, human autologous stem cell transplantation for myocardial regeneration following myocardial infarction]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2001;126:932-8.
62. Hamano K, Nishida M, Hirata K, et al. Local implantation of autologous bone marrow cells for therapeutic angiogenesis in patients with ischemic heart disease: clinical trial and preliminary results. *Jpn Circ J*. 2001;65:845-7.
63. Stamm C, Westphal B, Kleine HD, et al. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet*. 2003;361:45-6.
64. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation*. 2002;106:1913-8.
65. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, et al. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*. 2002;106:3009-17.
66. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *The Lancet*. 2002;360:427-435.
67. Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation*. 2003;107:2294-302.
68. Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, et al. Improved exercise capacity and ischemia 6 and 12 months after transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic cardiomyopathy. *Circulation*. 2004 Sep 14;110(11 Suppl 1):II213-8.
69. Tse HF, Kwong YL, Chan JK, et al. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet*. 2003;361:47-9.