

CÉLULAS-TRONCO NO TRATAMENTO DAS DOENÇAS CARDIOVASCULARES

* Dr. Edimar Alcides Bocchi, **Dra. Silvia Moreira Ayub Ferreira

*Diretor Da Unidade De Insuficiência Cardíaca E Transplante Cardíaco Do Instituto Do Coração Da Faculdade De Medicina Da Universidade De São Paulo.

**Médica Assistente Da Unidade De Insuficiência Cardíaca E Transplante Cardíaco Do Instituto Do Coração Da Faculdade De Medicina Da Universidade De São Paulo

Endereço para correspondência:

Rua Oscar Freire, 2077 apto 161
Cerqueira César – São Paulo
CEP: 05409-011 SP - Brasil

Resumo:

Insuficiência cardíaca é a evolução final das diversas injúrias que acometem o coração quando não há morte súbita, e diversas propostas de tratamento foram desenvolvidas nas últimas décadas. No presente, somente a terapia com células-tronco é sugerida como regenerativa do tecido lesado. Embora alguns estudos não tenham obtido resultados positivos quanto à pluripotencialidade das células-tronco, diversos trabalhos experimentais e ensaios clínicos recentes em pacientes com miocardiopatia ou infarto do miocárdio são animadores quanto à confirmação da eficácia desse novo método, quando adicionado ao tratamento usual. Os mecanismos pelos quais melhoram a isquemia e a função cardíaca permanecem obscuros. No entanto, os estudos realizados não tiveram observações de longo prazo, a mortalidade não foi avaliada como objetivo principal, a maior parte dos estudos não foi randomizada e os resultados ainda são limitados quanto ao grau de benefício frente à expectativa. Muito embora a manutenção da prevenção e do tratamento já estabelecidos permaneça crucial para a abordagem das cardiopatias, as perspectivas da terapia com células-tronco são estimulantes.

Palavras-chave: células-tronco, terapia celular, doença cardiovascular, insuficiência cardíaca, doença de Chagas, infarto agudo do miocárdio.

Introdução

A doença cardiovascular é condição prevalente e endêmica na população mundial, tanto nos países em desenvolvimento quanto nos desenvolvidos^{1,2}.

Nas últimas duas décadas houve importantes avanços na terapêutica das doenças cardiovasculares. De modo recente, a observação de existência de processos de regeneração no miocárdio colocou a angiogênese, a terapia gênica e o transplante de células como as mais atuais formas potenciais de tratamento das doenças cardiovasculares.

Em uma visão clássica, o miócito cardíaco, assim como as células nervosas, era tido como células pós-mitóticas terminais, altamente diferenciadas e incapazes de regenerar-se. Há pouco tempo, entretanto, demonstrou-se que os miócitos cardíacos são capazes de sofrer mitose; autores têm sugerido um índice mitótico de 0.015%, o que seria suficiente para gerar 100g de miocárdio em menos de três meses³. Por consequência, deveria haver um grau de regeneração para compensar esta perda tecidual.

A relevância clínica destes achados experimentais foi sedimentada em 2001, com a demonstração da existência de divisão de miócitos na periferia de áreas necróticas, em pacientes com infarto

agudo do miocárdio (IAM)⁴.

Os achados de quimerismo pós-transplante cardíaco ajudam a reforçar a teoria de regeneração cardiomiocitária. Em 2002, demonstrou-se que células de receptores de transplante cardíaco eram capazes de migrar e repovoar o enxerto, sugerindo que a capacidade de regeneração do tecido cardíaco pode se dar, pelo menos em parte, pela migração de células pluripotentes extracardíacas⁵.

O coração passa então a ser compreendido de forma diferente. O modelo clássico de um órgão diferenciado, estático, terminal e incapaz de regenerar começa a ser questionado. Estudos atuais fornecem embasamento para novo paradigma, o de um coração com capacidade regenerativa, onde há proliferação de cardiomiócitos na insuficiência cardíaca e após o IAM, quimerismo após o transplante e migração de células da medula.

Com isto, foi concebido novo modelo para explicar a progressão da disfunção ventricular, que ocorreria por desbalanço entre a morte celular (por necrose ou apoptose) e a capacidade tecidual de regeneração. Acredita-se que, sob condições de equilíbrio fisiológico, células-tronco presentes no próprio tecido recomporiam o tecido apoptótico. Entretanto, em condições de aumento da perda celular (como na insuficiência cardíaca), células-tronco circulantes seriam recrutadas em maior número e sofreriam diferenciação em tecidos de órgãos sólidos. Abriu-se assim a perspectiva de novas formas de tratamento que tivessem, como princípio, a amplificação dos mecanismos de regeneração do tecido miocárdico⁶.

Células-tronco

São células primitivas que guardam as propriedades de se auto-regenerar ou de gerar outras células mais diferenciadas. Duas características das células-tronco as distinguem das outras células: (1) se dividir em outra célula com o mesmo potencial e (2) se diferenciar em outros tipos celulares.

Essas células podem ser divididas funcionalmente em (1) células totipotenciais, com capacidade de produzir os três tecidos embrionários primitivos, ectoderma, endoderma e mesoderma; (2) multipotenciais, que podem originar mais de uma linhagem celular, e (3) unipotenciais, que originam uma linhagem celular. Sob o ponto de vista morfológico, as células são classificadas em (1) embrionárias (totipotenciais), (2) células-tronco de medula óssea do adulto (pluripotenciais) ou (3) células-progenitoras (unipotenciais)⁷.

As células-tronco existem em diversos tecidos do indivíduo adulto e em embriões, ou seja, seriam células residentes. Provavelmente estariam em equilíbrio com células circulantes. Com raras exceções,

as células-tronco de tecidos adultos estão comprometidas com a gênese de um número limitado de células e tecidos.

Este tipo de limitação, dado por estrito controle da expressão gênica, é importante para a manutenção da integridade tecidual. Tal maneira de controle garante, por exemplo, que, quando a pele seja ferida, não se formem, na cicatriz, tecidos outros que não o cutâneo.

Em contrapartida, células embrionárias são advindas de estágio anterior ao do comprometimento com a gênese de tecidos específicos do organismo; por isso, células-tronco embrionárias advindas do estágio de blastocisto têm maior versatilidade do que célula-tronco de organismos adultos.

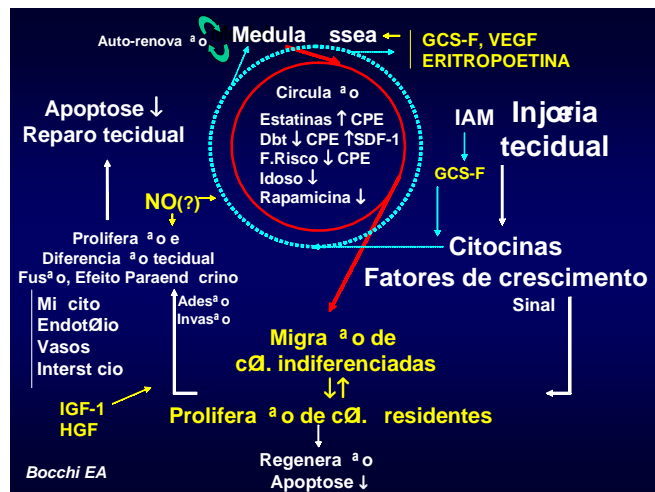
Recentemente tem-se demonstrado que as células-tronco possuem plasticidade, isto é, capacidade de gerar tipos celulares diferentes daquele para o qual havia sido no início programado^{8,9}.

Estudos favoráveis à teoria de diferenciação celular de células-tronco em células esqueléticas^{10,11,12}, células epiteliais¹³, hepatócitos¹⁴, células endoteliais^{15,16}, neurônios^{17,18} e cardiomiócitos¹⁹ são descritos. Outros trabalhos sugerem ser raro o fenômeno da diferenciação^{20,21}. Dois artigos recentes questionam a transformação das células-tronco em cardiomiócitos^{22,23}.

O mecanismo pelo qual o transplante de células é capaz de melhorar o funcionamento cardíaco ainda não é totalmente esclarecido. Três hipóteses vêm sendo hoje levantadas²⁴. Em primeiro, as propriedades elásticas das células implantadas poderão promover um arcabouço que limitaria a progressiva dilatação ventricular; este efeito protetor contra o remodelamento excessivo é suportado por evidência experimental de redução do volume diastólico em corações transplantados com células.

Outra possibilidade é o aumento da capacidade contrátil oferecido pelas novas células; esta argumentação implica a existência da contração sincrônica das células transplantadas com as células autóctones. Em cardiomiócitos, já foram detectadas gap junctions que sugerem a formação de sincícios. Em células derivadas de mioblastos esqueléticos, entretanto, a explicação é menos clara, já que tais junções não foram demonstradas; ainda assim há melhora da função sistólica em corações transplantados com este tipo celular²⁵.

Não se pode excluir a possibilidade de que as células transplantadas tenham função parácrina e funcionem como focos liberadores de fatores de crescimento, de fatores angiogênicos que recrutariam células residentes locais, com formação de novos vasos, e que determinariam a proliferação de cardiomiócitos, reduziriam apoptose, e teriam efeito sobre a matriz intersticial. Todos estes possíveis mecanismos não são excludentes, e ainda são alvos de intensa investigação (FIGURA 1).



Um outro mecanismo de ação poderá ser a fusão das células-progenitoras com as células do órgão a ser regenerado, que poderiam ter um papel parácrino. Em diversas cardiopatias e/ou na presença de fatores de risco e senilidade, haveria redução da mobilização da

medula, da sobrevivência da célula que migrou e que se fixou, da fixação, da transdiferenciação, e da liberação de fatores parácrinos.

Tipos celulares potenciais

O fundamento da terapia celular parte da regeneração pós-natal, recuperando tecidos ou parte deles com a utilização de células-tronco. Hoje uma variedade de células-progenitoras adultas estão em avaliação clínica, todas autólogas, o que evita a rejeição tecidual e necessidade de imunodepressão^{26,27}.

Células progenitoras endoteliais (CPE)

As CPE foram originariamente definidas pela expressão dos marcadores proteicos CD133 e CD34 na superfície celular, pela presença do receptor-2 do fator de crescimento vascular endotelial e por sua capacidade de se incorporar a sítios de neovascularização e se diferenciar em células endoteliais²⁸.

Estas células são encontradas em maior quantidade na medula óssea e podem ser mobilizadas para a periferia com o auxílio de estimuladores de formação de colônias granulocíticas (G-CSF). Acredita-se que o aumento na circulação das CPE facilita sua fixação nos órgãos-alvo (por exemplo, o coração). Esse processo se daria por meio de estímulos quimiotrópicos (i.e., fator de crescimento endotelial vascular, fator estroma-derivado-1, interleucina-8) e integrinas²⁹. Nessa etapa, pode-se aguardar que as células migrem de modo espontâneo para o tecido cardíaco ou se pode selecionar as CPE por intermédio da aférese para serem, posteriormente, infundidas na circulação coronariana através de cateterismo cardíaco. No segundo caso, além dos fatores quimiotrópicos, existe uma oferta local direcionada ao tecido-alvo. Entre as vantagens do uso das CPE, inclui-se o fato de se tratar de um transplante autólogo. Uma desvantagem seria a necessidade de expansão com uso de G-CSF³⁰.

Em pacientes com insuficiência coronariana, parece que as CPE estão enfraquecidas em relação ao número e atividade, além de apresentarem reduzida atividade migratória e formadora de colônias in vitro e reduzida capacidade de neovascularização in vivo, quando comparada com células de indivíduos hígidos³¹.

Células-tronco mesenquimais (CTM)

As CTM representam uma rara população de células CD34⁻ e CD133⁻ presentes no estroma da medula óssea (dez vezes menos abundantes que as células-tronco hematopoéticas) e têm a capacidade de diferenciação em osteócitos, condrócitos e adipócitos. A diferenciação das CTM em cardiomiócitos tem sido observada em condições específicas de cultura e após a injeção em miocárdio sadio ou infartado de animais³². As CTM têm como vantagem serem pluripotentes e criopreserváveis para posterior uso. No entanto, existe a necessidade de cultivo para seleção dessas células porque não há um marcador específico, o que dificulta o seu isolamento³³.

Mioblastos esqueléticos (ME)

Os ME são células-progenitoras que normalmente permanecem em estado latente sob a membrana basal das fibras musculares maduras. Sua utilização requer obtenção das células na musculatura por meio de biópsia, cultivo in vitro para expansão e posterior implante. Os ME se diferenciam em miotubos e retêm propriedades da musculatura esquelética, quando transplantados em cicatrizes de infarto³⁴. Embora os miotubos não se liguem aos cardiomiócitos eletromecanicamente, o transplante de ME tem mostrado aumento da performance sistólica e diastólica em modelos animais de infarto do miocárdio³⁵. A possibilidade de implante autólogo e a resistência da célula são as vantagens do método³⁶. No entanto, constatou-se tendência arritmogênica maior³⁷.

Células-tronco cardíacas residentes (CTCR)

A presença de CTCR capazes de se diferenciar em cardiomiócitos e linhagens vasculares sugere que estas células podem

ser usadas para reparo cardíaco. As CTCR só podem ter seus clones expandidos por meio de biópsias miocárdicas. A injeção intramiocárdica destas células, em casos de IAM, em ratos, promoveu formação de cardiomiócitos e células vasculares e promoveu melhora da função sistólica³⁸.

Células-tronco embrionárias (CTE)

As CTE, derivadas das camadas internas da massa celular do blastocisto, são consideradas como totipotenciais e apresentam a capacidade de se dividirem nas três diferentes linhagens embrionárias e se transformarem em qualquer tipo de tecido. As células derivadas de CTE mostram propriedades estruturais e funcionais de cardiomiócitos em fase precoce de desenvolvimento, que se acoplam eletronicamente com os cardiomiócitos hospedeiros quando transplantados no miocárdio normal³⁹. Questões éticas e legais, preocupações quanto à diferenciação tumoral e a necessidade de células allogênicas para o transplante dificultam os estudos clínicos.

Células da Medula Não Seleccionadas

A maior parte dos trabalhos clínicos utiliza células mononucleares da medula não seleccionadas, obtidas por punção da medula ou por aférese após mobilização.

Rotas de aplicação

O objetivo de qualquer estratégia de fornecimento de células é transplantar número suficiente de células para a região miocárdica de interesse e conseguir o máximo de retenção destas células nessa área. Células-progenitoras para reparo cardíaco têm sido fornecidas por duas vias principais: abordagem transvascular ou injeção direta na parede ventricular.

Abordagem transvascular

Infusão arterial intracoronária

A via intracoronária aumenta a oferta de células-tronco ao tecido cardíaco, facilitando a fixação, já que a primeira passagem se fará necessariamente nos capilares coronarianos. Esse método é, sobretudo, interessante em pacientes com IAM, onde será injetado um concentrado enriquecido de células-tronco próximos ao local da injúria. As células são fornecidas através de um cateter balão durante uma insuflação transitória do balão, para otimizar o tempo de contato das células com a microcirculação da artéria relacionada com o infarto⁴⁰.

Infusão endovenosa e mobilização de células-tronco e células-progenitoras

O processo de estimulação periférica ou via endovenosa é o mais simples de ser realizado. Se a opção for pelo uso de células-progenitoras, apenas o uso de estimuladores de colônia é necessário. Eles mobilizam as células da medula óssea para a circulação que, por sua vez, migram para o órgão-alvo por intermédio de estímulos quimiotáticos. No caso das células mesenquimais e mioblastos existe necessidade de retirada da medula óssea e do músculo esquelético, respectivamente. As células são submetidas à expansão em meios de cultura in vitro e posteriormente são levadas à reinfusão endovenosa.

A desvantagem do método é a atenuação do número de células pelo efeito de primeira passagem através do pulmão ou seqüestro no sistema retículo-endotelial e baço³⁹.

Injeção direta na parede ventricular

A injeção direta é via preferida em casos de obstrução coronariana (miocardiopatia isquêmica) ou quando os sinais de mobilização são fracos (tecido cicatricial). No entanto, a injeção direta de células dentro de miocárdio isquêmico ou cicatricial cria ilhotas de células com suprimento sanguíneo limitado, o que pode comprometer a sobrevivência dessas células.

Via transepicárdica

A via transepicárdica é realizada a céu aberto por meio de minitoracotomia ou durante procedimento cirúrgico. Habitualmente, utiliza-se essa rota de administração em pacientes submetidos a cirurgias de revascularização miocárdica por meio de injeções de concentrado de células mesenquimais, progenitoras ou mioblásticas. Os locais injetados são aqueles onde a revascularização se deu de modo incompleto ou não foi realizada, em pontos diferentes e com musculatura viável. A grande vantagem dessa técnica é a visualização direta dos locais infundidos.

Via transendocárdica

Usando um sistema de injeção com recurso de mapeamento eletromecânico em três dimensões para reconstrução da área cardíaca antes da injeção das células-tronco, a via transendocárdica é uma alternativa interessante de infusão direta no músculo cardíaco sem necessidade de toracotomia. O procedimento é realizado na sala de hemodinâmica, com cateter próprio para o procedimento. Depois de reconstruída visualmente a área cardíaca, os locais que receberão as células-tronco são analisados. Um cateter, cuja extremidade distal é similar a uma agulha, é introduzido na cavidade ventricular e, através dessa extremidade que penetra no miocárdio, são infundidas as células-tronco em diferentes pontos do ventrículo esquerdo. Podem ser utilizadas células-progenitoras, células mesenquimais ou mioblásticas.

Via transvenosa

A tecnologia de infusão de células pela via transvenosa é recente e foi utilizada em poucos estudos até o momento⁴¹. Consiste na instrumentação percutânea de um cateter que contém uma agulha expansível na extremidade distal, para a perfuração da parede do vaso e por onde são infundidas as células-tronco.

Também pode ser feita a perfusão coronariana retrógrada⁴². Foi realizada a injeção de células-tronco de medula óssea de forma retrógrada após a demonstração -com a injeção de material de contraste no seio coronariano ou numa veia coronariana, nos quais a artéria correspondente estivesse obstruída-, em que o fluxo se dirige de forma retrógrada para a área irrigada por esta mesma artéria.

Aplicação terapêutica com células tronco

A reparação do tecido cardíaco e vascular é um processo que ocorre de modo natural após uma lesão. As três etapas mais importantes neste processo são a mobilização das células-tronco da medula óssea, fixação das células no sítio da lesão e a diferenciação das células-tronco em células funcionais do tecido lesionado. Dado que é possível intervir em cada uma das etapas, a adequada compreensão das mesmas direciona as estratégias de transplante miocárdico terapêutico de células-tronco⁴³.

Infarto agudo do miocárdio (IAM) Estudos experimentais

Vários estudos com modelos animais de pequeno e grande porte foram realizados para avaliar os diferentes tipos celulares e modos de injeção das células, a maior parte deles induzindo isquemia miocárdica por congelamento ou oclusão coronariana^{44, 45, 46, 47, 48}.

Usando animais de pequeno porte e injeção direta de células-tronco de medula óssea em tecido adjacente a miocárdio infartado do ventrículo esquerdo de 30 camundongos, obteve-se a reparação do tecido infartado em 12 (40%). A falha na reconstituição dos demais foi atribuída à dificuldade de se transplantar células num tecido miocárdico contraindo-se 600 vezes por minuto⁴⁹.

A origem das células no miocárdio em regeneração foi confirmada pela expressão de proteína fluorescente e pela presença do cromossomo Y nas mesmas. As células da medula óssea transplantadas levaram à formação de novos miócitos, de células

endoteliais e de células musculares lisas, regenerando o miocárdio, incluindo artérias coronárias, arteríolas e capilares.

Outro experimento induziu IAM em 26 ratos Wistar através de ligadura da coronária esquerda. Após nove dias, os ratos foram reoperados e foi realizado o implante de células mesenquimais e mioblásticas esqueléticas, heterólogas, na região do IAM. As cobaias foram reavaliadas após 30 dias. O grupo-controle (n=10) apresentou piora da fração de ejeção (29,31%+5,6% para 23,51+6,51%, p=0,048), e o grupo intervenção, melhora (24.03%+8,68% para 31,77+9,06%, p=0,011)⁵⁰.

Por sua vez, num estudo realizado em cães, demonstrou-se que, durante a injeção de aproximadamente cinco milhões de células mesenquimais por quilo na artéria coronária circunflexa, houve elevação do segmento ST e alteração de ondas T características de IAM. Após sete dias, achados macroscópicos e microscópicos de IAM foram descritos. Também houve aumento na troponina-I e deposição de fibras de colágeno nas lesões⁵¹.

Estudos clínicos

Inspirados nos resultados experimentais, vários estudos clínicos têm sido iniciados para testar a segurança e aplicabilidade da terapia com células tronco (TABELA 1).

TABELA 1 ESTUDOS COM TERAPIA CELULAR EM PACIENTES COM IAM

ESTUDO	(N)	TIPO CELULAR	VIA	TEMPO P. S. IAM	EVOLUÇÃO	
					MELHORA	SEM ALTERAÇÃO
Strauer et al ⁵²	10 tratados 10 controles	CMO	IC	5 a 9 dias	Contra *o segmento I tamanho IAM	FEVE global VDFVE
TOPCARE-AMI ⁵³	29 CMO 30 CPC 11 controles	CMO CPC	IC	5 ± 2 dias	Contra *o segmento FEVE global, fluxo coronariano tamanho IAM	VDFVE
BOOS ^{54,55}	30 tratados 30 controles	CNMO	IC	6 ± 1 dias	Contra *o segmento FEVE global	VDFVE Tamanho IAM
Fernandez-Aviles et al ⁵⁶	20 tratados 13 controles	CMO	IC	14 ± 6 dias	Contra *o segmento FEVE global	VDFVE
Kueth et al ⁵⁷	5 tratados	CMO	IC	6 dias		Contra *o segmento FEVE global
Chen et al ⁵⁸	34 tratados 35 controles	CTM	IC	18 dias	Contra *o segmento FEVE global I tamanho IAM, VDFVE	
Vanderheyden et al ⁵⁹	12 tratados 10 controles	CD133 ⁺	IC	14 ± 6 dias	Contra *o segmento FEVE global Perfus ^o	
MAGIC ⁶⁰	10 infus ^o células 17 mobiliza ^o 15 controle	CMO	IC Mobiliza ^o *o sist ^o ica		Grupo infus ^o : FEVE global Perfus ^o	Grupo mobiliza ^o : FEVE global
Engelmann et al ⁶¹	12 tratados 6 controles	CMO	Mobiliza ^o *o sist ^o ica	5 dias	Contra *o segmento	FEVE global
Merra et al ⁶²	8 tratados	CMO	Mobiliza ^o *o sist ^o ica	1 a 3 dias	Perfus ^o	FEVE global
Leone et al ⁶³	8 tratados 3 placebo	CMO	Mobiliza ^o *o sist ^o ica	5 dias	FEVE global, I VDFVE Contra *o segmento	

CMO, células mononucleares derivadas da medula óssea; CPC, células progenitoras derivadas do sangue circulante; CNMO, células nucleadas derivadas da medula óssea; IC, intracoronária; IAM, infarto agudo do miocárdio; FEVE, fração de ejeção do ventrículo esquerdo; VDFVE, volume diastólico final do ventrículo esquerdo.

Estes estudos incluíram pacientes com IAM que foram submetidos a angioplastia coronariana e implante de stent para abrir a artéria relacionada ao IAM e, na maioria dos estudos, as células foram infundidas por via intracoronariana usando cateter balão para possibilitar a interrupção de fluxo. Neste aspecto, estes estudos diferem dos experimentais, em que a artéria relacionada ao infarto não foi reperfundida e as células foram injetadas direto no miocárdio.

Um primeiro estudo realizou injeção intracoronária de células mononucleares autólogas da medula óssea em 10 pacientes, em adição ao tratamento usual dos mesmos, e compararam a evolução com 10 pacientes que se submeteram apenas ao tratamento usual para IAM. Após três meses de seguimento, a região infartada tinha se reduzido de modo significativo no grupo de terapia celular (de 30+13 para 12+7%, p=0,005), e também foi significativamente menor quando comparada com o grupo de tratamento convencional (p=0,04). Avaliações posteriores no grupo de terapia celular, por intermédio de ecocardiografia de estresse com dobutamina, ventriculografia com radioisótopo e cateterismo cardíaco direito, mostraram melhora expressiva no débito cardíaco, volume sistólico final do ventrículo esquerdo, contratilidade miocárdica e perfusão miocárdica da região infartada⁵².

O estudo TOPCARE-AMI randomizou 59 pacientes que tiveram IAM com supradesnivelamento de ST, reperfundidos com endoprótese (stents) e GPIIb/IIIa. Em 24h os pacientes eram distribuídos de maneira aleatória em dois grupos. O primeiro grupo (n=29) recebeu células-tronco derivadas da medula óssea, e o segundo (n=30), células-progenitoras circulantes (retiradas da circulação e submetidas à expansão em cultura). O procedimento foi associado a significante aumento da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE), de 50+10% para 58+10% (p<0,001) e diminuição significativa do volume

sistólico final (p<0,001). Não houve diferença entre os grupos de terapia celular⁵³.

O estudo BOOST randomizou 60 pacientes após IAM com elevação do segmento ST submetidos a angioplastia coronariana para tratamento convencional somente (n=30) ou associado com terapia celular com células tronco da medula óssea (n=30). Após 6 meses a FEVE mostrou elevação de 0,7% no grupo controle versus 6,7% no grupo células-tronco (p=0,0026). Seguimento tardio de 18 meses mostrou manutenção da FEVE mas sem diferença com grupo placebo^{54,55}.

Outros dois estudos realizaram infusão intracoronariana de células mononucleares derivadas da medula óssea. No primeiro, que incluiu 20 pacientes tratados e 13 controles, houve melhora da contração segmentar e FEVE⁵⁶. No segundo estudo, que incluiu cinco pacientes tratados, não houve melhora dos parâmetros estudados:

As células tronco mesenquimais foram utilizadas em apenas uma análise, que incluiu 34 pacientes tratados e 35 controles. As células foram administradas por via intracoronariana e o grupo tratado apresentou melhora da FEVE, da contração segmentar, diminuição do tamanho do infarto e do volume sistólico final do ventrículo esquerdo⁵⁷.

As células CD133⁺ foram utilizadas em estudo com 12 pacientes tratados e 10 controles. Houve melhora da FEVE, da perfusão e da contração segmentar⁵⁸.

O recente estudo MAGIC comparou dois métodos de transplante de células-tronco em pacientes com IAM: infusão intracoronariana após estimulação da medula óssea com G-CSF e aférese (n=10) ou apenas a mobilização sistêmica de células tronco estimuladas com G-CSF (n=17). Os pacientes do grupo infusão intracoronariana apresentaram melhores resultados em relação ao outro grupo. A FEVE do grupo infusão apresentou melhora de 48,9±8,9% para 56,7±6,8% (p=0,003). Não houve melhora significativa da FEVE no grupo mobilização e no grupo controle⁵⁹.

Outros três estudos analisaram apenas a mobilização sistêmica de células tronco em pacientes com IAM. Em dois não houve melhora da FEVE após três meses e 6 meses^{60,61}. O terceiro estudo mostrou, após seis meses, melhora da FEVE nos pacientes tratados, de 28±8% para 38±8% (p=0,03)⁶².

Uma análise recente avaliou a combinação de CTM e CPE em pacientes com IAM. Foram incluídos 11 pacientes com IAM anteroseptal submetidos à infusão intracoronariana de combinado de CTM e CPE. Houve melhora da contratilidade miocárdica em um ou mais segmentos miocárdicos avaliados pelo ecocardiograma com estresse em 5 dos 11 pacientes estudados (p=0,01)⁶³.

Doença arterial coronariana (DAC)

Apesar dos avanços nas técnicas de revascularização miocárdica, alguns pacientes com DAC e miocardiopatia isquêmica não têm opção terapêutica devido à natureza difusa de sua doença. Estes pacientes experimentam sintomas anginosos refratários e desenvolvem comprometimento segmentar da função ventricular, o qual é parcialmente restaurado com a perfusão tecidual (miocárdio hibernante).

Estudos experimentais

Injeção transendocárdica de células derivadas da medula óssea ou CPE aumenta fluxo colateral, densidade capilar e contratilidade regional em porcos com isquemia miocárdica crônica⁶⁴. Tem sido proposto que as CPE aumentam a perfusão tecidual pela diferenciação em células endoteliais nos sítios de neovascularização⁶⁵.

Estudos Clínicos

Em pacientes com coronariopatia crônica e com indicação de revascularização miocárdica, injetou-se CPE durante o ato cirúrgico, obtendo-se melhora na FEVE⁶⁶. Em estudo de implante de células obtidas da medula, durante cirurgia de revascularização incompleta,

obteve-se melhora da fração de ejeção (45 ± 3 para $51 \pm 2\%$, $p=0,003$) e da perfusão miocárdica. No entanto, não pode ser afastada a possibilidade de melhora pela revascularização^{67,68}.

Estudo prospectivo, não-randomizado e de rótulo aberto, que incluiu 14 pacientes e 7 controles, submeteu pacientes à injeção transcárdica de células de medula óssea mononucleares autólogas. A identificação de miocárdio viável foi realizada por mapeamento endomiocárdio eletromecânico. Indivíduos tratados e controles foram submetidos à avaliação não-invasiva após dois meses, e os indivíduos tratados também foram submetidos a avaliação invasiva após quatro meses. Após dois meses, houve significativa redução nas alterações reversíveis e houve significativa melhora na função ventricular esquerda global, tanto no grupo tratamento quanto entre o grupo tratado e o controle ($p=0,02$). Após quatro meses, houve elevação da fração de ejeção de 20% para 29% ($p=0,003$), e significativa redução no volume sistólico final no grupo tratado ($p=0,03$). O mapeamento endomiocárdio eletromecânico revelou expressiva melhora dos parâmetros mecânicos dos segmentos injetados quatro meses após o tratamento ($p=0,0005$)⁶⁹.

Outros dois estudos, também em pacientes com doença coronariana avançada sem opção terapêutica, analisaram, respectivamente, oito e quinze pacientes tratados com injeção transcárdica de células mononucleares de medula óssea autólogas sob orientação de mapeamento eletromecânico. Em ambos os estudos, houve melhora da perfusão, da angina e da FEVE^{70,71}.

Outro estudo, que também utilizou a técnica de injeção transcárdica sob orientação de mapeamento eletro-mecânico, porém com células nucleadas derivadas da medula óssea, encontrou somente melhora da perfusão e da angina⁷².

A TABELA 2 resume os estudos em doença arterial coronariana.

TABELA 2 ESTUDOS COM TERAPIA CELULAR NA DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA (ISQUEMIA MIOCÁRDICA SEM OPÇÃO DE REVASCLARIZAÇÃO)

ESTUDO	(N)	TIPO CELULAR	VIA	EVOLUÇÃO
Gowdak et al ⁶⁹	10 tratados	CMO	Transcárdica (RM)	↑ Perfus ^o , ↑ FEVE
Perin et al ⁷⁰	14 tratados 7 controles	CMO	Transcárdica (MEE)	↑ FEVE, ↓ VDFVE ↑ Perfus ^o
Tse et al ⁷¹	8 tratados	CMO	Transcárdica (MEE)	↑ Perfus ^o , ↑ FEVE ↑ contra ^o o segmentar
Beeres et al ⁷²	15 tratados	CMO	Transcárdica (MEE)	↑ Perfus ^o , ↑ FEVE
Fuchs et al ⁷³	10 tratados	CNMO	Transcárdica (MEE)	↑ Perfus ^o

CMO, células mononucleares derivadas da medula óssea; CNMO, células nucleadas derivadas da medula óssea; IC, intracoronariana; FEVE, fração de ejeção do ventrículo esquerdo; MEE, mapeamento endomiocárdio eletromecânico; RM, revascularização miocárdica.

Restenose coronariana

Estudo com pacientes com IAM submetidos à terapia celular, na qual houve melhora na função ventricular, foi acompanhado de aumento na estenose intra-stent das lesões angiográficas⁷³. Existe relato de dois casos de infarto do miocárdio e uma morte em um grupo de 12 pacientes com angina intratável⁷⁴. Ambos os pesquisadores fizeram uso de G-CSF e de uma amostra pequena de pacientes. O significado desses estudos permanece incompleto, necessitando de pesquisas adicionais.

Estudos emergentes experimentais sugerem que células progenitoras de músculo liso circulante podem participar na biologia da aterosclerose⁷⁵. Células musculares derivadas da medula são encontradas na aterosclerose em humanos⁷⁶.

Insuficiência cardíaca (miocardiopatia isquêmica e outras)

Estudos Experimentais

O primeiro estudo realizado para avaliar o uso de células progenitoras no tratamento da miocardiopatia dilatada usou modelo animal irradiado e transplantado com célula de medula óssea de cobaias com células marcadas com proteína verde fluorescente. Na

quarta semana, os animais foram esplenectomizados.

Para induzir insuficiência cardíaca, os modelos receberam doxorrubicina na sexta semana. Foram divididos em três grupos. O grupo I ($n=11$) recebeu precocemente G-CSF, na oitava semana. O grupo II ($n=8$) recebeu G-CSF na 11ª semana. E o grupo III ($n=8$) recebeu solução salina na 11ª semana. Ao final de 16 semanas, os animais foram sacrificados e analisados histologicamente. O grupo I apresentou migração maior de células-tronco que os outros dois grupos, sendo que o grupo II recebeu mais que o III. O estudo comprova que o uso precoce de G-CSF na insuficiência cardíaca provocada por doxorrubicina melhora a migração de células-progenitoras. O uso do G-CSF aumentou o número de células-progenitoras no coração das cobaias com insuficiência cardíaca⁷⁷.

Noutro estudo em que foi utilizado o modelo de doxorrubicina para insuficiência cardíaca, a medicação foi aplicada em 52 ratos e, após quatro semanas, os animais de experimentação foram divididos em 3 grupos: grupo transplante ($n=18$) que recebeu o implante de células-tronco derivados de medula óssea por via transepicárdica após toracotomia, grupo controle ($n=18$) que recebeu somente solução salina venosa, e grupo placebo ($n=16$) que foi submetido à toracotomia, mas sem implante de células-tronco. Os resultados mostraram um diâmetro sistólico ventricular, fração de encurtamento e pressão sistólica final menores no grupo transplante ($p<0,05$). Além disso, por meio de microscopia eletrônica, o grupo transplante mostrou maior manutenção do miocárdio⁷⁸.

Estudos clínicos

Miocardiopatia isquêmica

Após relato de caso inicial⁷⁹, inúmeros pequenos estudos têm investigado a segurança e a aplicabilidade da terapêutica com células-progenitoras na miocardiopatia isquêmica (TABELA 3).

TABELA 3 ESTUDOS COM TERAPIA CELULAR EM MIOCARDIOPATIA

ESTUDO	Miocardiopatia	(N)	TIPO CELULAR	VIA	FEVE	EVOLUÇÃO
Menasche et al ⁸⁰	isquêmica	10 tratados	ME	TEP	24 ± 4%	Contra ^o o segmentar FEVE global
Herreros et al ⁸¹	isquêmica	11 tratados	ME	TEP	36 ± 8%	Contra ^o o segmentar, FEVE global, viabilidade /Rea infartada
Siminiak et al ⁸²	isquêmica	10 tratados	ME	TEP	25 ± 40%	Contra ^o o segmentar FEVE global
Smits et al ⁸³	isquêmica	5 tratados	ME	TED	36 ± 11%	Contra ^o o segmentar FEVE global
Stamm et al ⁸⁴	isquêmica	12 tratados	CD133 ⁺	TEP	36 ± 11%	FEVE global, perfus ^o ↓ VDFVE
Assmus et al ⁸⁵	isquêmica	51 CMO 35 CPC 16 controles	CMO CPC	IC	40 ± 11%	S Grupo CMO, FEVE global
Goncalvesova et al ⁸⁶	isquêmica	5 tratados	CTM	IC	13 ± 18%	Capacidade de exercicio
Bocchi et al ⁸⁷	Nº isquêmica	11 mobiliza ^o 5 infus ^o	CMO	MOB IC	21 ± 6%	Nos dois grupos: Capacidade de exercicio, Classe funcional, Índice de Qualidade de vida
Gao et al ⁸⁸	Nº especificada	14 tratados 14 controles	CMO	IC		FEVE

CMO, células mononucleares derivadas da medula óssea; CPC, células progenitoras derivadas do sangue circulante; IC, intracoronariana; ME, mioblasto esquelético; MOB, mobilização; TEP, transcárdica; TED, transcárdica; FEVE, fração de ejeção do ventrículo esquerdo.

Mioblastos esqueléticos

Os estudos que usaram cultura de mioblastos esqueléticos levantaram a preocupação com substrato arritmogênico. O primeiro estudo incluiu 10 pacientes com reduzida FEVE que foram submetidos à revascularização do miocárdio, receberam injeção de mioblastos em região de tecido cicatricial e suprida por artéria coronariana ocluída⁸⁶. Em 4 destes pacientes, taquicardia ventricular sustentada ocorreu entre o 11º e 22º dia de pós-operatório.

Em outros dois estudos similares, que incluíram 21 pacientes, e onde a revascularização miocárdica envolveu regiões onde foi injetado ME e em outras não injetadas, dois pacientes desenvolveram taquicardia ventricular^{80,81}.

Um quarto estudo injetou ME em cinco pacientes com miocardiopatia isquêmica terminal, que foram submetidos a implante de suporte circulatório como ponte para transplante cardíaco. Dois pacientes apresentaram taquicardia ventricular no pós-operatório imediato⁸³.

Um último estudo injetou ME via endocárdica como procedimento isolado em 5 pacientes com insuficiência cardíaca secundária a IAM anterior. Um paciente apresentou elevação de troponina no pós-operatório e outro apresentou taquicardia ventricular 6 semanas após o procedimento³⁷.

Portanto, parece provável que a injeção de ME aumente o risco de arritmias ventriculares nessa população. Mesmo na ausência de acoplamento eletromecânico, os ME provocariam surtos de potências de ação que poderiam induzir extra-sístoles. Além disso, a lesão celular local poderia ser arritmogênica⁸².

Na grande maioria destes estudos notou-se melhora da FEVE e contração segmentar após injeção de ME^{34,35,36,37}.

Células da medula óssea

Em um estudo, células CD133⁺ foram injetadas transepícardicamente na borda da região infartada em 12 pacientes submetidos a revascularização miocárdica de regiões não injetadas. Em contraste com os estudos que utilizaram ME, essas regiões infartadas eram mais recentes. Não foram detectadas complicações durante o procedimento e nenhuma arritmia ventricular grave foi observada em 14 meses de seguimento. Após 6 a 8 meses, a perfusão das áreas injetadas e a FEVE melhoraram⁸³.

Noutro estudo em miocardiopatia isquêmica, 86 pacientes receberam infusão intracoronariana de células mononucleares não selecionadas de medula óssea ou células-progenitoras derivadas do sangue circulante mediante técnica de cateter com interrupção do fluxo de sangue. Após três meses, a FEVE melhorou nos pacientes que receberam células derivadas da medula óssea, mas não apresentou mudança significativa nos que receberam células-progenitoras derivadas do sangue⁸⁴.

Células Mesenquimais

O primeiro estudo clínico com células mesenquimais para miocardiopatia isquêmica incluiu cinco pacientes com história de IAM de parede anterior sem estenose significativa na artéria descendente anterior. Estes pacientes foram submetidos a punção de crista ilíaca e as CTM foram expandidas *ex vivo*. O tempo médio de expansão foi de 19 dias. Após, as CTM foram isoladas e infundidas por via intracoronariana usando-se cateter balão. Os cinco pacientes apresentaram melhora clínica e melhora da capacidade de exercício, porém nem todos mostraram melhora na FEVE⁸⁵.

Miocardiopatia chagásica

O primeiro transplante de células-tronco em pacientes com miocardiopatia chagásica foi realizado por meio da mobilização periférica de células progenitoras com uso de estimulante de formação de colônia granulocítica (G-CSF), aférese e infusão coronariana⁸⁶.

Uma segunda experiência com células tronco em miocardiopatia chagásica é um relato de transplante de células mononucleares autólogas medulares, por via intracoronariana, para um homem de 52 anos com insuficiência cardíaca CF III/NYHA de etiologia chagásica. O paciente já se encontrava sob terapêutica otimizada para insuficiência cardíaca. Sem que tenham sido realizadas alterações do esquema terapêutico usual, a fração de ejeção do ventrículo esquerdo passou de um valor inicial de 24% em repouso para 32%, após 30 dias. Houve melhora da capacidade funcional (avaliada pela classificação da NYHA e pelo teste de corredor de 6 minutos), e da qualidade de vida (escore de Minnesota)⁸⁷.

Miocardiopatia dilatada não isquêmica

Estudo prospectivo realizado em nossa instituição, incluindo 16 pacientes com CF III e IV da NYHA, portadores de miocardiopatia dilatada não isquêmica, realizaram a terapia celular por meio da mobilização periférica com G-CSF de células da medula óssea e foram randomizados em dois grupos: (1) somente mobilização (n=11) e (2) mobilização seguida de aférese e infusão intracoronária do concentrado rico em células (n=5). Obteve-se melhora da classe funcional, capacidade de exercício e qualidade de vida em ambos

grupos^{88,89,90,91,92}.

Estudo recente submeteu 28 pacientes com insuficiência cardíaca em fila para transplante cardíaco para randomização para infusão intracoronariana de células mononucleares derivadas da medula óssea (n=14) ou tratamento convencional (n=14). O grupo intervenção apresentou aumento de 44% na FEVE (p, 0,05)⁹³.

Limitações

Os ensaios clínicos relatados apresentam características similares na metodologia utilizada. O número de indivíduos é pequeno nos estudos, em parte devido à fase de segurança que eles se encontram. Além disso, não dispomos no momento de dados sobre a mortalidade a longo prazo pelo escasso tempo de acompanhamento desses pacientes.

Os estudos não são randomizados em sua maioria e, os que são randomizados, não são cegos. Observa-se a falta de um grupo placebo stricto sensu nas pesquisas. A maioria delas dispõe de um grupo para controle, mas os pacientes não são submetidos a todos os procedimentos do grupo intervenção. Um exemplo disso encontra-se nos trabalhos com infusão de células-tronco via intracoronariana, onde geralmente os controles não realizam cateterismo com infusão placebo e oclusão coronariana. Esse conjunto de fatores ainda limita a capacidade de generalização dos estudos.

Resultados frente às expectativas

A despeito dos resultados positivos em diversos estudos experimentais e clínicos, tais resultados ainda podem ser considerados insuficientemente expressivos em relação às expectativas de regeneração do coração. Nos trabalhos citados, incluem-se todos os modelos: infarto agudo, insuficiência coronariana crônica, miocardiopatia dilatada e doença de Chagas. Analisando a melhora da fração de ejeção apresentada, esta ficou próxima dos 7%, não ultrapassando os 12%. Na maioria das vezes, existiu significância estatística, mas isto ainda não pode ser considerado o ideal.

Envelhecimento

O envelhecimento miocárdico é visto como um efeito inevitável do tempo sobre a função miocárdica. Na maioria dos casos, o indivíduo idoso que evolui com disfunção cardíaca é classificado como etiologia idiopática. Biópsias endomiocárdicas de 19 pacientes idosos portadores de cardiopatia dilatada foram comparadas com biópsias de sete indivíduos da mesma idade com função ventricular preservada. As células senescentes foram identificadas pela expressão do inibidor de ciclo p16^{INK4a} e a morte celular pela hairpin 1 e 2. Os corações comprometidos pelo tempo apresentaram-se com moderada hipertrofia e dilatação, acúmulo de células primitivas e miocíticas que expressavam o p16^{INK4a} positivo e sem alteração estrutural. A morte celular ocorreu de forma marcadamente elevada e somente em células que expressaram o p16^{INK4a} que tiveram significativo encurtamento telomérico⁹⁴. Estudo experimental também comprovou esse mesmo achado. Genes implicados na parada do crescimento e senescentes, como o p27^{Kip1}, p53, p16^{INK4a}, e p19^{ARF}, foram detectados em miócitos de camundongos selvagens jovens e aumentaram com a idade. A IGF-1 atenuou os níveis dessas proteínas em todas as idades⁹⁵.

Baseados nesses achados, o coração envelhecido pode ser visto sob a ótica da limitação de diferenciação das células progenitoras, o que afetaria o turnover de miócitos. Esse processo favorece a perda celular e o acúmulo de células velhas, com conseqüente redução da contratilidade.

Questões Éticas. Utilização para outras doenças

O uso de embriões humanos, nas pesquisas com células-tronco, tem estimulado um intenso debate entre bioeticistas, filósofos, líderes religiosos e cientistas. A questão está em torno do aspecto jurídico-filosófico do embrião humano: ele pode ser descartado? É um ser humano? Uma parcela dos geneticistas acredita que a pesquisa em embriões humanos não traz problemas éticos adicionais aos já

existentes com métodos já aceitos moralmente, como a fertilização in vitro. Na verdade, se ficar claro que as células-tronco embrionárias são a melhor forma de tratamento para uma determinada doença, poderá ser argumentado que moralmente errado seria não utilizá-las, visto que são células originárias de embriões sobressalentes, os quais teriam como destino natural serem descartados^{96,97}.

Células-tronco adultas provenientes da medula óssea são de longe as mais freqüentemente utilizadas⁹. Embora as células-tronco adultas sejam consideradas menos versáteis que as células embrionárias, número cada vez maior de cientistas considera a existência de uma promissora plasticidade das células-tronco adultas, as quais teriam um potencial de transformação para terapia multitecidual ainda não explorado no total¹⁹.

Do mesmo modo, células do cordão umbilical também têm sido consideradas como promissora fonte de células-tronco. Sendo multipotentes, teriam capacidade de diferenciação similar às células-tronco adultas dos tecidos. Células do cordão umbilical seriam colhidas já ao nascimento dos indivíduos, e armazenadas a baixas temperaturas ao longo da vida, podendo ser utilizadas no futuro, se necessário, como terapia para doenças diversas, tais como diabetes, lúpus eritematoso sistêmico, doença de Alzheimer, doença de Parkinson e doenças cardiovasculares^{98,99}.

Perspectivas futuras

As terapias atuais da insuficiência cardíaca, em seus vários estágios, não se apresentam totalmente eficazes no controle dessa patologia. Acredita-se que o uso de células-tronco tem o potencial de auxiliar como uma alternativa mais orientada à regeneração da célula cardíaca, evitando a progressão da insuficiência cardíaca e/ou melhorando a função ventricular em casos graves avançados. Os resultados têm sido promissores e os benefícios dessa nova abordagem deverão ser confirmados por outras pesquisas.

Algumas questões ainda necessitam ser respondidas, tais como: que tipo de célula deve ser utilizado? Qual o melhor método para isolar a célula? Qual a melhor via de administração? Devem ser usados agentes coadjuvantes? Em qual momento da história natural da doença? Qual a quantidade de células? Deve-se repetir a administração? Por quanto tempo?

A realização de pesquisas adicionais, as quais poderão utilizar randomização em um número maior de pacientes, observado por períodos mais extensos, deverá trazer as esperadas respostas relacionadas à extensão de sobrevida dos receptores destas células.

O Ministério da Ciência e Tecnologia está abrindo linha de financiamento para pesquisas com células-tronco em todo o território nacional, o que possibilitará maior conhecimento sobre essa nova tecnologia. No entanto, os resultados até agora apresentados são limitados frente às expectativas, devendo os pacientes serem direcionados às terapêuticas já consagradas pela literatura, necessitando as mesmas serem otimizadas de modo rigoroso antes de se pensar na tentativa de expor os pacientes à promissora porém ainda recente terapia com células-tronco

Referências Bibliográficas

- 1 American Heart Association. Heart and Stroke Statistics – 2003 Update. <http://www.americanheart.org>.
- 2 Datasus. <http://tabnet.datasus.gov.br>.
- 3 Kajstura J, Leri A, Finato N, Di Loreto C, Beltrami CA, Anversa P. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95:8801-5.
- 4 Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan Shao-Min, Finato N, Bussani R. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2001; 344(23): 1750-7.
- 5 Quaini F, Urbanek K, Beltrami A, Finato N, Beltrami CA, Nadal-Ginard B. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med* 2002; 346(1): 5-

15.

6 Anderson DJ, Gage FH, Weissman IL. Can stem cells cross lineage boundaries? *Nat Med* 2001; 7:393-5.

7 Angelini A, Castellani C, Vescovo G, Thiene G. Pathological evidence of stem cell regeneration in the heart. *Int Journal of Cardiol* 2004; 96:499-504.

8 Graf T. Differentiation plasticity of hematopoietic cells. *Blood* 2002; 99:3089-101.

9 Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell* 2004; 116:639-648.

10 Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, et al. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 1999; 401:390-394.

11 Ferrari G, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279:1528-1530.

12 LaBarge MA, Blau HM. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell* 2002; 111:589-601.

13 Krause DS, Theise ND, Collector MI, et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001; 105:369-377.

14 Lagasse E, Connors H, Al Dhalimy M, et al. Purified haematopoietic stem cells can differentiate in to hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000; 6:1229-1234.

15 Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, et al. Neovascularization of ischaemic myocardium by human bone marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 2001; 7:430-436.

16 Grant MB, May WS, Caballero S, et al. Adult hematopoietic stem cells provided functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med* 2002;8:607-612.

17 Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 2000;290:1775-1779.

18 Mezey E, Chandross KJ, Harta G, et al. Turning blood into brain: cell bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 2000;290:1779-1782.

19 Jackson KA, Majka SM, Wang W, et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2001;107:1395-1402.

20 Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, et al. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 2002;297:2256-2259.

21 Wang X, Willenbring H, Akkari Y, et al. Cell fusion is the principal source of bone marrow-derived hepatocytes. *Nature* 2003;30:30.

22 Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 2004;428:664-668.

23 Balsam L, Wagers AJ, Christensen JL, et al. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 2004;428:668-673.

24 Menasché P. Cell transplantation for the treatment of heart failure. *Sem Thorac Cardiovasc Surg* 2002; 14(2): 157-66.

25 Pouzet B, Ghostine S, Allatar N, et al. Long-term functional results of autologous skeletal myoblast transplantation in rats. *Circulation* 2001; 104:II-599.

- 26 Mathur A, Martin JF. Stem cells and repair of the heart. *The Lancet* 2004;364:183-92.
- 27 Dimmeler S, Zeiher A and Schneider MD. Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *J Clin Invest* 2005;115:572-583.
- 28 Asahara T, Kawamoto ^a Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;287:C572-C579.
- 29 Losordo DW, Dimmeler S. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease – part II: cell based therapies. *Circulation* 2004;109:2692-2697.
- 30 Körbling M, Estrov, Z. Adult Stem Cells for Tissue Repair – A New Therapeutic Concept? *N Eng J Med* 2003; 349:570-82
- 31 Heeshen C, Lehmann R, Honold J, et al. Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease. *Circulation* 2004;109:1615-1622.
- 32 Toma C, Pittenger MF, Cahil KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 2002;105:93-98.
- 33 Strauer BE, Brhem M, Zeus T, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002;106:1913-1918.
- 34 Pagani FD, DerSimonian H, Zawadzka A, Wetzel K, Edge AS, Jacoby DB, Dinsmore JH, Wright S, Aretz TH, Eisen HJ, Aaronson KD. Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischemia-damaged myocardium in humans: histological analysis of cell survival and differentiation. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:879-888.
- 35 Dowell JD, Rubart M, Pasumarthi KB, Soonpaa MH, Field LJ. Myocyte and myogenic stem cell transplantation in the heart. *Cardiovasc Res* 2003;58:336-350.
- 36 Smits PC, Geuns RJM, Poldermans D, et al. Catheter based intramyocardial injection of autologous skeletal myoblasts as a primary treatment of ischemic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2003;42:2063-2069.
- 37 Menasché P, Hagege AA, Vilquin JT, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe post infarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:1078-83.
- 38 Messina E, De Angelis L, Frati G, Morrone S, Chimenti S, Fiordaliso F, Salio M, Battaglia M, Latroncio MV, Coletta M, Vivarelli E, Frati L, Cossu G, Giacomello A. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res* 2004;95:911-921.
- 39 Kehat I, Khimovich L, Caspi O, Gepstein A, Shofti R, Arbel G, Huber I, Satin J, Itskovitz-Eldor J, Gepstein L. Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2004;22:1282-1289.
- 40 Wollert KC, Drexler H. Clinical applications of stem cells for the heart. *Circ Res* 2005;96:151-163.
- 41 Brasselet C, Carrion C, Morichetti M, et al. Skeletal myoblast transplantation through a catheter-based coronary sinus approach: an effective means of improving function of infarcted myocardium. *J Am Coll Cardiol* 2004;43(Suppl A):15⁵
- 42 Murad-Netto S, Moura R, Romeo LJM, et al. Terapia de células-tronco no infarto agudo do miocárdio, através de perfusão coronariana retrógrada. Uma nova técnica. *Arq Bras Cardiol* 2004; 83(4): 349-354.
- 43 James, F., Price, M. J., Makkar, R. R. Stem Cell Repair of Infarcted Myocardium: An Overview for Clinicians. *Circulation* 2003;108(9):1139-1145.
- 44 Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, et al. Cardiomyocyte Transplantation Improves Heart Function. *Ann Thorac Surg* 1996;62:654-660
- 45 Scorsin M, Hagege A, Marotte F, et al. Does transplantation of cardiomyocytes improve function of infarcted myocardium? *Circulation* 1997;96(Suppl 2):188-193.
- 46 Sakai T, Li RK, Weisel RD, et al. Autologous heart cell transplantation improves cardiac function after myocardial injury. *Ann Thorac Surg* 1999;68:2074-2080.
- 47 Etzion S, Battler A, Barbash IM, et al. Influence of embryonic cardiomyocyte transplantation on the progression of heart failure in a rat model of extensive myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:1321-1330.
- 48 Muller-Ehmsen J, Peterson KL, Kedes L, et al. Rebuilding a damaged heart: long-term survival of transplanted neonatal rat cardiomyocytes after myocardial infarction and effect on cardiac function. *Circulation* 2002;105:1720-1726.
- 49 Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson, SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone Marrow Cells Regenerate Infarcted Myocardium. *Nature* 2001; 410(5): 701-705.
- 50 Souza LCG, Carvalho KAT, Rebelatto C, et al. O transplante em conjunto de células mioblásticas esqueléticas e mesenquimais (cocultivadas) na disfunção ventricular pós-infarto do miocárdio. *Arq Bras Cardiol* 2004; 83(4): 288-293.
- 51 Vulliet PR, Greeley M, Halloran SM, et al. Intra-coronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction. *Lancet* 2004;363:783-84.
- 52 Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Köstering M, Hernandez, A, Sorg R, Kögler G, Wernet P. Repair of Infarcted Myocardium by Autologous Intracoronary Mononuclear Bone Marrow Cell Transplantation in Humans. *Circulation* 2002;106(15):1913-1918.
- 53 Schächinger V, Assmus B, Britten MB, Honold J, Lehmann R, Teupe C, Abolmaali ND, Vogl TJ, Hofmann WK, Martin H, Dimmeler S, Zeiher AM. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: Final one-year results or the TOPCARE-AMI trial. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:1690-99.
- 54 Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringers-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, Fichtner S, Korte T, Hornig B, Messinger D, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomized controlled clinical trial. *Lancet* 2004;364:141-148.
- 55 Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, Lippolt P, Fichtner S, Ringers-Lichtenberg S, Ganser A, Hertenstein B, Drexler H, Bone Marrow Transfer to Enhance ST-Elevation Infarct Regeneration: Long-term Magnetic Resonance Imaging Follow-up Data from The BOOST-Trial. *Circulation* 2004;III-239.
- 56 Fernandez-Aviles F, San Roman JA, Garcia-Frade J, Fernandez ME, Penarrubia MJ, de la Fuente L, et al. Experimental and clinical regenerative capability of human bone marrow cells after myocardial infarction. *Circ Res* 2004; 95:742-748.
- 57 Chen SL, Fang WW, Ye F, Liu YH, Qian J, Shan SJ, et al. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2004;94:92-95.
- 58 Vanderheyden M, Mansour S, Vandekerckhove B, De Bondt P, Van Haute I, Lootens N, et al. Selected intracoronary CD133⁺ bone marrow cells promote cardiac regeneration after acute myocardial infarction. *Circulation* 2004;110(suppl III):324-325.
- 59 Na SH, Cho HJ, Chung JW, Hahn JY, Lee HY, Kang HJ, et al. Comparison of two methods of peripheral blood stem cell transplantation

in patients with myocardial infarction: intracoronary infusion of mobilized peripheral blood stem cell versus mobilization only (Magic Cell Investigator: Myocardial Regeneration and angiogenesis with G-CSF mobilization and intracoronary infusion of stem cell). *J Am Coll Cardiol* 2005;45(suppl A):4A.

60 Engelmann MG, Theiss HD, Henning C, Winterperger BJ, Huber A, Schoenberg SO, et al. Bone-marrow stem cell mobilization induced by granulocyte-colony stimulating factor in patients undergoing delayed revascularization for ST-segment elevation myocardial infarction: Early results from the G-CSF in STEMI trial. *J Am Coll Cardiol* 2005;45(suppl A):238A .

61 Marra S, Scacciarella P, Tarella C, Tamponi G, Usimiani T, D'Amico M, et al. Feasibility, safety and efficacy of bone marrow-derived cell mobilization with G-CSF and GM-CSF in patients with acute myocardial infarction: a pilot study. *J Am Coll Cardiol* 2005;45(suppl A):238A .

62 Leone AM, Galiuto L, Liuzzo G, Giordano A, Calcagni ML, Garramone B, et al. Granulocyte-colony stimulating factor in the acute myocardial infarction (Rigenera study). *J Am Coll Cardiol* 2005;45(suppl A):238A .

63 Katritsis D, Sotiropoulou P, Karvouni E, Karabinos I, Korovesis S, Perez S, et al. Transcoronary transplantation of autologous mesenchymal stem cells and endothelial progenitors into infarcted human myocardium. *J Am Coll Cardiol* 2005;45(suppl A):77A .

64 Kawamoto A, Tkebuchava T, Yamaguchi J, et al. Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circulation* 2003;107:461-468.

65 Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:3422-3427.

66 Stamm C, Westphal B, Kleine HD, et al. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003;108:2212-2218.

67 Gowdak LHW, Schettert IT, Vieira MCL, et al. Transplantation of autologous bone marrow combined to coronary artery bypass grafting improves myocardial perfusion in severe ischemic heart disease. *Circulation* 2003;108(suppl IV):548.

68 Gowdak LHW, Scgettert IT, Rochitte CE, Cesar LAM, da Luz PL, Krieger JE, et al. Sustained regional improvement in myocardial perfusion one year after transplantation of autologous bone marrow cells in patients with diffuse coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2005;45(suppl A):246A .

69 Perin E, Dohmann HFR, Borojevic R, Silva SA, Souza ALS, Mesquita CT, et al. Transendocardial, Autologous Bone Marrow Cell Transplantation for Severe, Chronic Ischemic Heart Failure. *Circulation* 2003;107(18):2294-2302.

70 Tse HF, Kwong YL, Chan JK, et al. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet* 2003;361:47-49.

71 Beeres SLMA, Zeppenfeld K, Fibbe WE, Bax JJ, van der Laarse A, de Vries T, et al. Intramyocardial injection of autologous bone marrow cells in patients with refractory angina pectoris and chronic ischemia is safe, reduces anginal symptoms and impro myocardial perfusion. *J Am Coll Cardiol* 2005;45(suppl A):56A .

72 Fuchs S, Satler LF, Kornowski R, et al. Catheter-based autologous bone marrow myocardial injection in no-option patients with advanced coronary artery disease: a feasibility study. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:1721-1724.

73 Kang HJ, Kim HS, Zhang SY, et al. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilized with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell

randomized clinical trial. *Lancet* 2004;363:751-756.

74 Hill JP, Paul JD, Powel TM. Efficacy and risk of granulocyte colony stimulating factor administration in patients with severe coronary artery disease. *Circulation* 2003;108(suppl 4):478.

75 Sata M, Saiura A, Kunisato A, Tojo, et al. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med* 2002;8:403-9.

76 Caplice NM, Bunch TJ, Stalboeegr PG, et al. Smooth muscle cells in human coronary atherosclerosis can originate from cells administered at marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:4754-9.

77 Tomita S, Ishida M, Nakatani T, et al. Bone marrow is a source of regenerated cardiomyocytes in doxorubicin-induced cardiomyopathy and granulocyte colony-stimulating factor enhances migration of bone marrow cells and attenuates cardio toxicity of doxorubicin under electron microscopy. *J Heart Lung Transplant* 2004;23:577-84.

78 Ishida M, Tomita S, Nakatani T, et al. Bone marrow mononuclear cell transplantation had beneficial effects on doxorubicin-induced cardiomyopathy. *J Heart Lung Transplant* 2004;23(4):436-445.

79 Menasche P, Hagage AA, Scorsin M, et al. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 2001;357:279-280.

80 Herreros J, Prosper F, Perez A et al. Autologous intramyocardial injection of cultured skeletal muscle-derived stem cells in patients with non-acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2003;24:2012-2020.

81 Siminiak T, Kalawski R, Fiszer D et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for the treatment of postinfarction myocardial injury: phase I clinical study with 12 months of follow-up. *Am Heart J* 2004;148:531-537.

82 Makkar RR, Lell M, Chen OS. Stem cell therapy for myocardial repair: is it arrhythmogenic? *J Am Coll Cardiol* 2003;42:2070-2072.

83 Stamm C, Kleine HD, Westphal B et al. CABG and bone marrow stem cell transplantation after myocardial infarction. *Thorac Cardiovasc Surg* 2004;52:152-158.

84 Assmus B, Honold J, Lehman R et al. Transcoronary transplantation of progenitor cells and recovery of left ventricular function in patients with chronic ischemic heart disease: results of a randomized, controlled trial. *Circulation* 2004;110(suppl III):238.

85 Goncalvesova E, Lakota J, Fridrich V, Fabián. Intracoronary injection of mesenchymal stem cells in patients with severe ischemic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2005;45(suppl A):153A .

86 Bocchi EA, Issa VS. Transplante celular para o tratamento de pacientes com insuficiência cardíaca. *RSOCESP* 2003; 13(4): 427-433

87 Vilas-Boas F, Feitosa GS, Soares MBP, Pinho-Filho JA, Mota A, Almeida AJG, Carvalho C, Carvalho HG, Oliveira AD, Santos RR. Transplante de medula óssea para o miocárdio em paciente com insuficiência cardíaca secundária a doença de Chagas. *Arq Bras Cardiol* 2004;82(2):181-184.

88 Bocchi EA, Bacal F, Guimarães G, et al. Effects of mobilization of marrow bone stem cell in the treatment of refractory congestive heart failure. *Eur H Journal* 2003;24(suppl):610.

90 Bocchi EA et al. Effects of mobilization of marrow bone stem cell in the treatment of refractory congestive heart failure. *J Heart Lung Transpl* 2003;22(suppl 1):S124.

91 Bocchi EA, Bacal F. Mobilization of bone marrow cells (stem cells) by granulocyte-colony stimulating factor associated or not with intracoronary stem infusion improves exercise capacity and quality life in severe heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2004:814-4.

92 Bocchi EA, Bacal F, Issa V, Resende MC, Guimarães G, Cruz F, et al. Mid-term results of bone marrow cell mobilization by granulocyte-colony stimulating factor associated or not with intracoronary stem cell infusion for severe congestive heart failure treatment. *J Am Coll*