



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR  
UNIVERSIDADE DO PORTO

**U.** PORTO

Artigo de Revisão Bibliográfica

6ºano Profissionalizante

Mestrado Integrado em Medicina

2011/2012

# **TERAPÊUTICA COM CÉLULAS ESTAMINAIS NO ENFARTE AGUDO DO MIOCÁRDIO**

Miguel Rogério Figueiredo Nogueira

Orientador: Dr<sup>a</sup> Carla Roque

Porto

## Resumo

O enfarte agudo do miocárdio pode levar à depressão da função sistólica global do ventrículo esquerdo. Uma das principais consequências do enfarte do miocárdio é a remodelação cardíaca que é caracterizada pela substituição do miocárdio necrosado por tecido cicatricial, constituído por fibroblastos e colagénio. Esta remodelação cardíaca tem efeitos negativos na contractilidade do miocárdio, podendo, dependendo da área afetada, evoluir progressivamente para insuficiência cardíaca.

Atualmente, a insuficiência cardíaca pós-enfarte do miocárdio representa uma importante causa de mortalidade e morbidade nos países desenvolvidos, apresentando uma taxa de mortalidade aos 5 anos entre 50-70% nos doentes sintomáticos.

Na era da intervenção coronária percutânea, a terapêutica farmacológica da insuficiência cardíaca, que tem como objetivo atenuar a remodelação do miocárdio, reduzir os sintomas e a morbimortalidade da doença, está associada a uma melhoria modesta da função cardíaca ventricular com um aumento de somente 2 - 4% da função aos 6 meses pós-enfarte agudo de miocárdio.

Na última década, foram realizados vários estudos pré-clínicos, clínicos e meta-análises que mostraram que a terapia com células estaminais leva a uma melhoria da função cardíaca superior aquela que se verifica com a terapêutica atual. No entanto, existem ainda algumas dúvidas e questões que necessitam de melhor esclarecimento no que diz respeito a esta terapêutica. Deste modo, com esta dissertação, pretende-se organizar o conhecimento atual relativamente ao uso de células estaminais na terapêutica do pós-enfarte do miocárdio, analisando as vantagens, limites e perspectivas futuras.

**Palavras chave:** Células estaminais, células progenitoras, pós-enfarte agudo de miocárdio, insuficiência cardíaca.

## Abstract

Acute myocardial infarction can lead to depression of global systolic function of the left ventricle. One key consequence of myocardial infarction is cardiac remodeling which is characterized by replacement of necrotic myocardial by scar tissue, consisting of fibroblasts and collagen. Cardiac remodeling has negative effects in myocardial contractility and, depending on the affected area, may progressively evolve to heart failure.

Currently, post-myocardial infarction heart failure is an important cause of morbidity and mortality in developed countries, with a mortality rate at 5 years between 50 -70% in symptomatic patients.

In the era of percutaneous coronary intervention, the drug therapy for heart failure, which aims to lessen cardiac remodeling, reduce symptoms and mortality of the disease is associated with a modest improvement of cardiac ventricular function with an increase of only 2% - 4 % of the function at 6 months post-myocardial infarction.

In the last decade, several pre-clinical, clinical and meta-analyses studies, were conducted which have shown that stem cell therapy leads to a superior improvement of cardiac function when compared to the current therapy. However, there are still some doubts and questions that need further clarification with regard to this therapy. Thus, it's intended to organize the current knowledge regarding the use of stem cells in the treatment of post-myocardial infarction, analyzing its advantages, limitations and future prospects.

**Keywords:** Stem cells, progenitor cells, post-acute myocardial infarction, heart failure.

## Introdução

O enfarte agudo do miocárdio (EAM) é uma causa frequente de hospitalização nos países desenvolvidos. A taxa de mortalidade precoce (30 dias) é de cerca de 30% , com mais de metade das mortes ocorrendo antes da chegada ao hospital. A taxa de mortalidade pós-admissão hospitalar diminuiu cerca de 30% nas últimas duas décadas, no entanto, aproximadamente 1 em cada 25 doentes dos que sobrevivem ao internamento inicial morre no primeiro ano após o EAM, sendo que a mortalidade é quatro vezes superior nos doentes com mais de 75 anos de idade (Antman EM, Braunwald E, 2008).

Um dos principais problemas, no período pós-enfarte do miocárdio, é a remodelação cardíaca que é caracterizada pela substituição do miocárdio necrosado por tecido cicatricial, constituído por fibroblastos e colagéio. Esta remodelação cardíaca tem efeitos negativos na contractibilidade do miocárdio, eventualmente evoluindo para insuficiência cardíaca (Wei HM et.al. 2009).

Atualmente, a insuficiência cardíaca pós-enfarte de miocárdio representa uma importante causa de mortalidade e morbidade nos países desenvolvidos, apresentando uma taxa de mortalidade aos 5 anos entre 50 -70% nos doentes sintomáticos (Wei HM et.al. 2009).

O tratamento atual do enfarte agudo do miocárdio consiste na revascularização coronária de forma a diminuir a isquemia da área afetada; e inclui ainda estratégias de prevenção secundária cujo objetivo é atenuar a remodelação, disfunção ventricular e a progressão da doença vascular. No entanto, a única terapêutica para a insuficiência cardíaca que aborda o problema fundamental da perda irreversível de cardiomiócitos é a transplantação cardíaca (Wei HM et al. 2009).

A terapia com células estaminais apresenta-se hoje como uma opção para o tratamento da insuficiência cardíaca pós-EAM. O coração, e nomeadamente o miocárdio, era considerado como um órgão cujas células estavam totalmente diferenciadas não existindo a

possibilidade de regeneração celular. Todavia, um número considerável de estudos efetuados há cerca de uma década concluiu que existia um *turnover* de miócitos no coração dos mamíferos, havendo uma regeneração, embora limitada, a partir de células estaminais locais assim como circulantes (Kajstura et al. 1998; Beltrami et al. 2001; Bergmann et al. 2009). A descoberta de mecanismos endógenos de reparação cardíaca abriu o caminho para a terapia com células estaminais em estudos pré-clínicos onde se verificou uma melhoria da função cardíaca pós-EAM. Estes resultados levaram a que se iniciassem estudos clínicos em humanos.

Com esta monografia pretende-se fazer uma revisão das diferentes populações celulares com possibilidade de virem a ser utilizadas na terapêutica do pós-enfarte agudo de miocárdio, apresentando os resultados dos estudos já realizados sobre esta matéria. Numa segunda parte aborda-se as perspetivas e questões a serem respondidas em estudos futuros.

## Células estaminais e progenitoras

As células estaminais são células primitivas, com capacidade de proliferação, autorrenovação mitótica e com capacidade de diferenciação em outras células, sendo que cada uma das células de um ser humano provém deste tipo de células (Tuch BE, 2006; Shah, et al. 2011).

As células estaminais progenitoras são células mais diferenciadas do que as células estaminais, possuindo um potencial limitado de diferenciação, limite de divisões e incapacidade para se autorrenovarem (Tongers, et al. 2011).

Existem vários tipos de células estaminais e progenitoras sendo elas classificadas segundo a origem, os marcadores de superfície e a diferenciação. O CD133, por exemplo, é um marcador das células progenitoras, mais prematuras e menos diferenciadas, que é perdido no processo de diferenciação. Já por exemplo o CD34, é um marcador cuja expressão é mantida até estadios mais tardios de diferenciação. (Tongers, et al. 2011; Shah, et al. 2011).

Um dos aspetos interessantes do uso das células estaminais e progenitoras para regeneração do miocárdio é que ainda não existem certezas sobre o tipo de células que possui mais vantagens, e poucos estudos comparam diretamente as diferentes populações. De facto, apesar de vários estudos clínicos mostrarem resultados positivos apresentando melhorias na função cardíaca com esta terapêutica, ainda não se conhecem exatamente os mecanismos celulares e moleculares associados (Segers, et al. 2008; Lovell et al, 2010). As células da medula óssea não-selecionadas (CMONS) são as mais estudadas até agora em humanos, no entanto, há também estudos com células selecionadas CD133+, CD34+, células estaminais mesenquimatosas (CEM), células estaminais e progenitoras cardíacas (CEC), mioblastos esqueléticos (ME), células estaminais embrionárias (CEE), células pluripotentes induzidas (CPI) e também a mobilização de células estaminais e progenitoras através da administração de G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*).

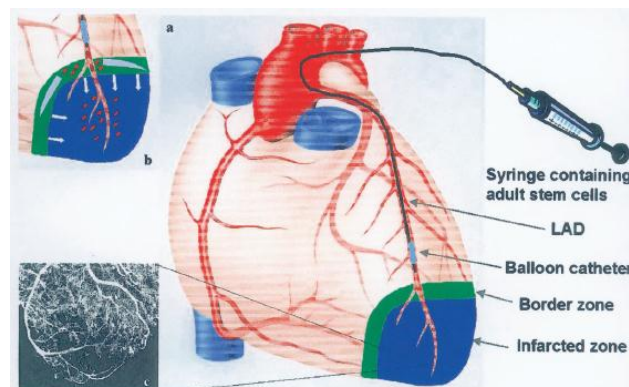
## Vias de administração das células estaminais e progenitoras

O objectivo desta terapêutica passa por transplantar uma quantidade de células em número suficiente para a zona miocárdica desejada e obter uma taxa de retenção celular elevada (fração de células que é retida pelo miocárdio) (Wollert et al, 2005). As vias de administração atualmente disponíveis incluem abordagens transvasculares que abrangem a (1) infusão intracoronária arterial, (2) infusão venosa e (3) infusão retrograda no seio coronário. Pode-se ainda realizar (4) injeção direta intramiocárdica que pode ser epicárdica ou transendocárdica (Dib, et al. 2011). Outra técnica também usada consiste não propriamente numa administração celular mas sim numa (5) mobilização das células endógenas da medula óssea através de G-CSF.

### 1) Infusão intracoronária arterial

A técnica de cateterismo coronário percutâneo usada na cardiologia de intervenção pode ser adaptada de modo

a administrar células na zona miocárdica desejada. É utilizado um cateter com balão. O cateter é colocado na artéria a montante da zona em isquemia, o balão é insuflado, e as células libertadas a alta pressão tal como é ilustrado na figura 1.



**Fig 1 Injeção intracoronária**

Esta técnica depende de um fenómeno de migração celular por quimiotaxia denominado de *cell homing* no qual as células migram preferencialmente em direção às zonas do miocárdio isquémicas, já que estas libertam fatores quimiotáticos. (Dib et al. 2011). Um ponto importante a referir nesta técnica de administração celular é a taxa de retenção. Hou et al. (2005) estudaram a administração intracoronária de células mononucleares do sangue periférico em suínos após EAM. As células administradas foram marcadas com índio111, e a distribuição corporal das células foi analisada uma hora depois, sendo que só  $2,6 \pm 0,3\%$  ( $p < 0,05$ ) foram retidas no miocárdio.

Outro ponto a apontar nesta técnica é que só é possível em doentes cujo vaso alvo esteja desobstruído, não sendo opção para áreas não-revascularizadas (Tongers, et al. 2011).

### 2) Infusão intravenosa

Em alguns modelos experimentais, a administração intravenosa de células endoteliais progenitoras (CEP) ou células estaminais mesenquimatosas (CEM) melhora a função cardíaca após enfarte agudo do miocárdio. É a técnica menos invasiva de administração, todavia, é altamente dependente dos sinais de *homing* libertados pelas células do miocárdio lesado. Barbash, et al. (2003)

mostram que a administração sistêmica por via intravenosa de células estaminais mesenquimatosas derivadas da medula óssea em ratos após EAM, apesar de possível, é limitada pelo aprisionamento das células nos pulmões. Aicher, et al. (2003) mostram através de uma marcação radioativa, que só 2% das CEP administradas se retiveram no miocárdio após EAM em ratos. No entanto, num estudo recente publicado por Hare et al. (2009), a administração de células estaminais mesenquimatosas por infusão intravenosa em humanos apresentou resultados positivos descritos mais á frente.

### **3) Infusão retrógrada no seio coronário**

Alguns estudos pré-clínicos e clínicos em fase precoce mostraram que a infusão retrógrada no seio coronário é uma técnica segura de administração celular. Este método é opção em casos de estenose subtotal grave de uma ou mais artérias coronárias e estenose aórtica grave. Desvantagens desta técnica incluem a variabilidade anatómica do seio coronário e o risco de dissecação do mesmo (Dib, et al. 2011).

### **4) Injeção diretamente na parede ventricular**

A injeção direta de células na parede ventricular é o método com maior taxa de retenção celular miocárdica e é a via de administração preferencial em doentes com doença cardíaca mais avançada como doença coronária grave ou cardiomiopatia dilatada (Dib, et al. 2011). Nestas doenças as artérias coronárias apresentam um grau de oclusão que impede o uso das abordagens transvasculares. A administração de células por injeção direta em doentes com EAM é um desafio técnico principalmente devido à possibilidade de perfuração do tecido necrótico mais friável (Wollert, et al. 2005).

A injeção diretamente na parede ventricular pode fazer-se por uma injeção transendocárdica ou transepicárdica. Na via transendocárdica, é inserido um cateter através da válvula aórtica e as células são injetadas no endotélio do ventrículo esquerdo. É possível ainda realizar um mapeamento eletromecânico para delinear as

áreas do miocárdio isquémico antes da injeção. Na via transepicárdica, a injeção celular é realizada através de uma abordagem cirúrgica minimamente invasiva com mini-toracotomia anterior esquerda, podendo também ser realizada concomitantemente com cirurgia de bypass coronário ou outras cirurgias cardíacas que impliquem toracotomia. As principais desvantagens desta via é o facto de ser invasiva acarretando um risco de perfuração, inflamação local e arritmias cardíacas (Dib, et al. 2010; Wollert, et al. 2005).

### **5) Mobilização de células estaminais e células progenitoras**

Em 2001, Shintani, et al. (2001) mostraram que as células endoteliais progenitoras e células mononucleares CD34+ são mobilizadas para a circulação durante a isquemia miocárdica em humanos. Partindo deste conceito, as células estaminais e progenitoras podem ser mobilizadas da medula óssea através da administração sistêmica de citocinas como a G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*), aumentando assim a taxa de reparação do tecido isquémico. Esta via de mobilização foi já testada em vários estudos em humanos (Ince, et al. 2005; Riopa, et al. 2006; Zohnhöfer, et al. 2006; Engelmann, et al. 2006).

## **Análise das populações de células utilizadas**

### ***Células estaminais adultas – Células estaminais provenientes da medula óssea***

A medula óssea constitui uma fonte de células estaminais adultas (CEA) onde existem diferentes populações celulares com potenciais de migração e diferenciação distintos. Três populações existentes na medula óssea são as células estaminais hematopoiéticas, as células endoteliais progenitoras (CEP) e as células estaminais mesenquimatosas (CEM) (Shah, et al. 2011).

Nos estudos já publicados são administradas diferentes populações celulares. Um grande número de estudos usa células da medula óssea não selecionadas

(CMONS), no entanto, mais recentemente começam a ser publicados estudos em que se administram populações celulares provenientes da medula óssea mais restritas como células CD133+, células CD34+, CEP ou CEM.

### ***Células derivadas da medula óssea não selecionadas***

A administração de células da medula óssea não selecionadas (CMONS) constitui a terapia mais estudada no campo da regeneração celular cardíaca. As CMONS são fáceis de cultivar *in vitro* sendo possível obter um grande número de células. Outro fator que justifica o seu uso é que ainda não é conhecido qual a população celular exata com maior potencial para a reparação e regeneração cardíaca e, assim, utilizando uma população não selecionada abrangem-se vários tipos celulares (Tongers, et al. 2011).

Straeur, et al. (2002) mostraram pela primeira vez, num estudo caso-controlo, que a administração intracoronária de CMO mononucleares autólogas em humanos é segura e com resultados positivos a nível da função cardíaca. Após 3 meses de follow up, a região enfartada no grupo de doentes no qual se realizou terapia celular diminuiu significativamente ( de  $30 \pm 13\%$  para  $12 \pm 7\%$ ,  $P=0,005$ ), sendo também esta diminuição significativamente maior que no grupo controlo ( $P=0,04$ ). Foi também verificada uma melhoria significativa do débito cardíaco, contractilidade e perfusão miocárdica. As funções hemodinâmicas foram avaliadas após a realização de cateterismo cardíaco esquerdo, ventriculografia esquerda e angiografia coronária.

Desde então foram realizados vários estudos que mostram o benefício desta terapêutica como é o caso do estudo **TOPCARE-AMI** (Assmus, et al. 2002; Schächinger, et al. 2004; Leistner et al. 2011), o estudo **BOOST** (Wollert, et al. 2004; Meyer et al. 2006; Meyer et al. 2009), o **REPAIR-AMI** (Schächinger et al. 2006), o **BALANCE** (Yousef et al. 2009) e o estudo por **Cao** et al. (2009).

No estudo **TOPCARE-AMI** (Assmus, et al. 2002; Schächinger, et al. 2004; Leistner et al. 2011)

randomizado e controlado, foram administradas intracoronariamente CMONS autólogas e células progenitoras circulantes. Aos 4 meses de *follow-up*, a melhoria da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) foi significativamente maior no grupo tratado em comparação com o grupo controlo ( $50 \pm 10\%$  para  $58 \pm 10\%$  no grupo tratado e  $51 \pm 10\%$  para  $53,5 \pm 7,9\%$  no grupo controlo ( $p < 0,001$ )). Após 1 ano de follow-up, manteve-se a melhoria da FEVE em relação ao grupo controlo ( $p < 0,001$ ) e verificou-se ausência de hipertrofia reativa do ventrículo, sugerindo uma regeneração funcional ventricular (Schächinger, et al. 2004). Aos 5 anos de follow-up, uma análise por ressonância magnética nuclear a 31 dos doentes tratados mostra uma melhoria persistente da FEVE ( de  $46 \pm 10\%$  no início para  $57 \pm 10\%$  aos 5 anos,  $p < 0,001$ ). Os autores concluem ainda que o tratamento é seguro a longo prazo (Leistner et al. 2011).

No estudo **BOOST** (Wollert, et al. 2004; Meyer et al. 2006; Meyer et al. 2009) randomizado e controlado, foram administradas CMONS autólogas, intracoronariamente, a 30 dos 60 doentes participantes, 8 dias após EAM. Aos 6 meses, a FEVE aumentou 6,7% no grupo tratado e 0,7% no grupo controlo ( $p=0,0026$ ) não se tendo verificado efeitos secundários como reestenose coronária ou arritmias cardíacas (Wollert, et al. 2004). No entanto, no *follow-up* aos 18 meses, apesar da velocidade de recuperação da FEVE, em relação ao grupo controlo, ser maior nos primeiros meses após o EAM, ( $p < 0,001$ ), a diferença aos 18 meses da FEVE entre o grupo tratado e o grupo controlo deixou de ser significativa (Meyer, et al. 2006). Aos 5 anos de follow-up, Meyer et al. concluem que uma administração intracoronária única de CMONS não promove uma melhoria a longo prazo da FEVE em doentes com EAM. Todavia, um subgrupo de doentes com enfarte transmural extenso parece beneficiar desta terapia existindo uma melhoria de 0,7% da FEVE aos 5 anos em relação ao grupo controlo ( $p < 0,04$ ) (Meyer et al. 2009).

O estudo **REPAIR-AMI** (Schächinger et al. 2006) é um estudo multicêntrico, randomizado, duplamente cego

com controlo-placebo, com uma população de 204 doentes. As CMONS são administradas intracoronariamente 3 a 7 dias após o cateterismo coronário inicial. Aos 12 meses, o *endpoint* composto de mortalidade, EAM, e necessidade de revascularização encontrava-se significativamente reduzido no grupo tratado em relação ao placebo ( $p=0,009$ ). Além deste, também o *endpoint* composto de mortalidade, EAM recorrente e rehospitalização por insuficiência cardíaca estava significativamente reduzido ( $p=0,006$ ). Concluiu-se então que a administração intracoronária de CMONS está associada a uma redução significativa da ocorrência de eventos cardiovasculares após EAM.

Em 2009, Yousef et al. (2009) publicam os resultados do estudo **BALANCE**, um estudo com 124 doentes, não randomizado e com grupo controlo, onde foram injetadas células estaminais não selecionadas (CMONS) intracoronariamente. O objetivo era determinar quantitativamente a melhoria da função hemodinâmica, geometria e contractilidade ventricular, assim como avaliar a evolução clínica de doentes tratadas com CMONS autólogas administradas intracoronariamente após EAM. Concluiu-se que a terapêutica levava a melhorias significativas e a longo-prazo (60 meses de follow-up) da performance do ventrículo esquerdo, da qualidade de vida e diminuição da mortalidade (ver figura 2 e figura 3).

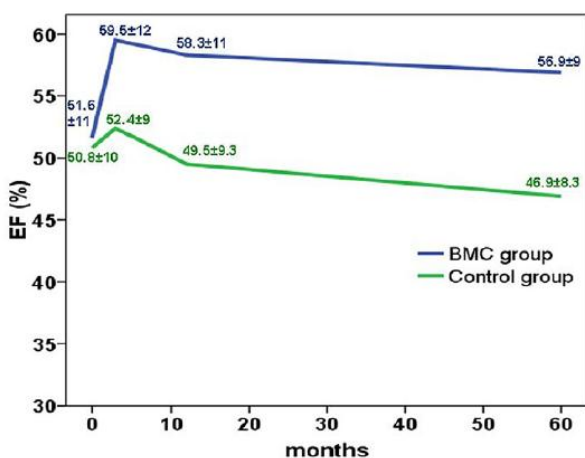


Fig 2 A fração de ejeção aumenta e mantém-se significativamente maior no grupo tratado (Yousef et al. 2011)

Não foram observados efeitos secundários mostrando que é um método seguro.

O estudo faz uma consideração interessante sobre o tempo ideal para a administração celular. O processo inflamatório é maior nos primeiros 5 dias após o EAM, então, a administração celular não deve ser realizada imediatamente após o EAM, já que os sinais de *cell homing* são fracos inicialmente. No entanto, duas semanas após o EAM, o processo cicatricial que se desenvolve pode reduzir o efeito das células estaminais, logo, os autores afirmam que o tempo ideal para administração celular é entre o 5º e o 14º dias pós-EAM.

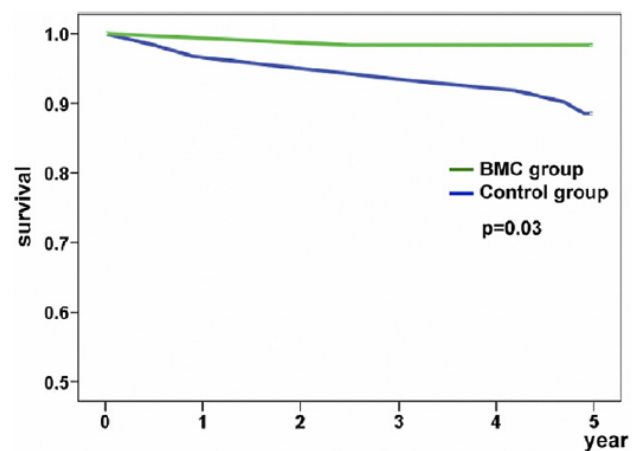


Fig 3 - Verifica-se uma diminuição significativa da mortalidade aos 5 anos (Yousef et al. 2011).

Contudo, alguns autores consideram que os resultados deste estudo devem ser avaliados com precaução já que se trata de um estudo não-randomizado, e que o tamanho da amostra pode ser insuficiente para permitir conclusões sobre a eficácia e segurança desta terapêutica, advogando que são necessários estudos multicêntricos, controlados, randomizados com placebo, e duplamente cegos para que se possam clarificar questões importantes relativamente a este tratamento (Thum, et al. 2010).

Cao et al. (2009), mostram num estudo com 86 doentes, randomizado e com grupo controlo, com 4 anos de follow-up, que a injeção intracoronária de células da medula óssea não selecionadas (CMONS) em doentes após EAM com elevação de ST é possível e segura, tendo sido verificado um aumento significativo da FEVE em

relação ao grupo controlo aos 6 meses (48,4%±0.5 vs. 45,7%±0.6, P = 0.001), a um 1 ano (48,2%±0.7 vs. 44,6%±0.6, P < 0.001), e aos 4 anos (50,5%±0.8 vs. 46,4%±0.8, P < 0.001). Ou seja, a terapia com células estaminais melhorou em 3,5% a FEVE do grupo tratado quando comparada com a FEVE do grupo controlo aos 4 anos. No entanto, não foram encontradas diferenças significativas aos 4 anos entre os vários grupos a nível da viabilidade miocárdica da área enfartada, avaliada através de tomografia computadorizada com emissão de fotões.

Todavia, apesar dos vários estudos que apontam para um benefício da terapêutica com células estaminais, existem também estudos com conclusões contrárias. **Janssens et al. (2006)**, **Lunde et al. (2006)** com o estudo ASTAMI e **Hirsch et al. (2011)** com o estudo **HEBE** concluem que a injeção de CMONS autólogas intracoronariamente não possui nenhum efeito sobre a função ventricular após EAM num período de follow-up entre os 4 e 6 meses.

**Janssens et al. (2006)** concluem que a FEVE não melhora significativamente em relação ao grupo controlo, no entanto, é observada uma redução do volume do enfarte significativamente maior. Existem vários fatores que os autores consideram possíveis responsáveis pela discrepância entre o seu estudo e estudos como o BOOST (Wollert, et al. 2004; Meyer et al. 2006; Meyer et al. 2009) e o REPAIR-AMI (Schächinger et al. 2006). O tempo de isquemia antes do cateterismo cardíaco é de 3,7-4,1 horas neste estudo, enquanto no estudo BOOST é de 8,0-9,8 horas. Um maior tempo de isquemia, e consequentemente uma maior área de enfarte, pode contribuir para uma ação mais significativa da terapêutica com células estaminais já que os sinais de *cell homing* seriam teoricamente mais potentes. Um segundo fator apontado é o facto da taxa de retenção celular no miocárdio ser muito baixa, sendo que só 1,3-2,6% das células administradas intracoronariamente foram detetadas após 75 minutos na zona de miocárdio enfartada (Hofmann et al. 2005).

**Lunde et al. (2006)** referem que entre o grupo tratado e o grupo controlo não existem diferenças significativas a nível do volume ventricular diastólico final, tamanho da área enfartada e número de eventos cardiovasculares. A razão de o estudo ASTAMI (Lunde et al. 2006) não mostrar nenhuns efeitos a nível da função cardíaca ventricular após a injeção coronária de CMONS não é clara. É possível que diferenças no processamento e armazenamento celular tenham contribuído para a divergência de resultados. Apesar de terem sido usados volumes aspirados da medula óssea idênticos no estudo ASTAMI e no estudo REPAIR-AMI, os doentes no estudo REPAIR-AMI receberam cerca de 3 vezes mais CMO mononucleares e cerca de 3,5 mais células com o marcador CD34+ (Schächinger et al. 2006). No entanto, esta correlação entre o número de CMONS e células CD34+ administradas e uma melhoria da função ventricular é controversa. Lunde et al. (2006) refere que tanto no seu estudo, como no estudo TOPCARE-AMI (Assmus, et al. 2002; Schächinger, et al. 2004; Leistner et al. 2011) e no estudo BOOST (Wollert, et al. 2004; Meyer et al. 2006; Meyer et al. 2009) não foi verificada uma correlação entre o número de células CD34+ e uma melhoria da função cardíaca. Tendra et al. (2009) no estudo REGENT também não encontraram diferenças entre a administração de CMONS e células CD34+ CXCR4+. No entanto, Kawamoto et al. (2006), concluem que as células CD34+ possuem uma eficácia superior na preservação da função e integridade do miocárdio do que as CMONS.

No estudo **HEBE**, **Hirsch et al. (2011)** não encontram diferenças significativas a nível dos volumes ventriculares, tamanho e área de enfarte ou número de eventos clínicos. É referido que o protocolo de processamento celular é muito similar aquele usado no estudo REPAIR-AMI (Schächinger et al. 2006), sendo que a fração de células CD34+ é também muito similar. Um dos fatores que poderia explicar a falta de benefício segundo os autores é o tempo reduzido de isquemia dos doentes incluídos no estudo, o que reduziria os sinais de

*cell homing* pelas células em isquemia. De facto, no estudo REGENT (Tendera et al. 2009), é mostrado que os doentes com maior tempo de isquemia até à reperfusão tinham maior probabilidade de apresentar uma melhoria significativa da função cardíaca após a administração celular. Outro fator possível é o facto do follow-up só ter sido realizado aos 4 meses, podendo algum benefício precoce ter passado despercebido. É também referida a baixa retenção celular que se verifica quando se administra intracoronariamente as CMONS e também o tempo desde o cateterismo coronário inicial até à administração celular que variou entre 3 a 8 dias neste estudo.

### **Células CD133+**

O antigénio de superfície CD133, é um indicador de imaturidade celular e baixa diferenciação, é expressado nas células estaminais hematopoiéticas e nas células endoteliais progenitoras. Estes dois tipos de células contribuem para a vascularização de tecidos em isquemia. As células CD133+ possuem a capacidade de se integrar nos locais de neovascularização e se diferenciar em células endoteliais maduras (Wollert, et al. 2005).

Num estudo na fase I/II, Bartunek, et al. (2005) injetaram intracoronariamente células CD133+ em 19 de 35 doentes após EAM. Aos 4 meses de follow-up, a FEVE aumentou significativamente no grupo tratado de  $45,0 \pm 2,6$  % para  $52,0 \pm 3,5$ % ( $p < 0,05$ ) não tendo aumentado significativamente no grupo controlo. Quanto aos efeitos secundários, não se verificou um maior número de arritmias no grupo tratado, contudo, os autores referem que houve uma maior taxa de reoclusão do *stent* coronário, reestenose coronária e lesão *de novo* da artéria correspondente à área enfartada. Estas complicações podem ser provavelmente devidas aos cateterismos realizados para administração intracoronária das células.

Mansour, et al. (2011) publicaram os resultados do estudo COMPARE-AMI, o primeiro estudo duplamente cego, controlado e randomizado comparando a eficácia e segurança da injeção intracoronária de células CD133+ em doentes após enfarte agudo do miocárdio com

disfunção ventricular persistente definida como FEVE menor que 50% mas maior que 25%. Verificou-se uma melhoria significativa da FEVE aos 4 meses de  $41,2\% \pm 1,1$  para  $51,1\% \pm 2,5$  ( $p < 0,001$ ) que se mantinha aos 12 meses ( $52,3\% \pm 2,0$  ( $p < 0,001$ )) sendo que esta melhoria foi superior à verificada no grupo controlo. Não foi relatado nenhum caso de morte, enfarte de miocárdio, acidente vascular cerebral ou arritmia ventricular sustentada mostrando assim a segurança da terapêutica.

### **Células Endoteliais progenitoras/ CD34+**

Existe uma subpopulação de células adultas, presentes na circulação sanguínea, denominada de células endoteliais progenitoras (CEP). Depois de uma lesão isquémica, acredita-se que as CEP, contribuam para a regeneração vascular, diferenciando-se em células endoteliais maduras, secretando fatores angiogénicos e podendo ainda diferenciar-se em cardiomiócitos e células musculares lisas. As CEP circulantes podem ser caracterizadas pela expressão de CD133, CD34, KDR e caderina VE. O marcador usado mais frequentemente para isolamento das CEP no sangue periférico é o CD34 (Jujo, et al. 2008). Depois de isoladas, as CEP podem ser expandidas *in vitro* (Shah, et al. 2011). Vários estudos pré-clínicos mostram que a terapia com CEP e células CD34+ induz a revascularização do miocárdio em isquemia, melhorando a perfusão e a função ventricular (Jujo, et al. 2008). Em 2003, Kawamoto, et al. (2003) mostram num estudo com ratos, no contexto de isquemia crónica do miocárdio, que a injeção transendocárdica de células CD34+ preservava significativamente a função ventricular sistólica e a densidade capilar comparativamente com o grupo controlo. Em 2009, Tendera et al. (2009) publicam os resultados do estudo REGENT, um estudo multicêntrico, randomizado e controlado com uma população de 200 indivíduos com EAM e FEVE < 40%. Nesse estudo compararam-se as diferenças entre a injeção intracoronária de células da medula óssea não selecionadas (UNSEL), células CD34+ CXCR4+ (SEL) e um grupo controlo. Apesar de se ter verificado um aumento de 3% na função ventricular

cardíaca nos grupos SEL e UNSEL, a melhoria não é estatisticamente significativa. No entanto, os autores concluem que o uso de células selecionadas CD34+ CXCR4+ é seguro, praticável e que justifica mais estudos futuros.

### ***Células estaminais mesenquimatosas***

As células estaminais mesenquimatosas (CEM) são células estaminais adultas CD34- e CD133-, presentes em vários tecidos, nomeadamente na medula óssea e no tecido adiposo e que se podem diferenciar em osteoclastos, condrócitos e adipócitos. (Wollert, et al. 2005; Nardi, et al. 2006). Foi mostrado que estas células podem diferenciar-se em cardiomiócitos em determinadas condições e após serem injetadas no miocárdio de animais (Toma, et al. 2002). Amado et al. (2005), injetaram percutaneamente CEM em suínos, após EAM, observando uma redução muito significativa da cicatriz e quase-normalização da função cardíaca. Um ponto importante neste estudo é que as células transplantadas eram de um doador alogénico e não foram rejeitadas, o que representa um grande avanço na aplicação desta terapêutica. Chen et al. (2004) publicam os resultados de um estudo controlado e com placebo onde são avaliados os efeitos da injeção intracoronária de células estaminais mesenquimatosas. Aos 3 e 6 meses de follow-up o grupo tratado apresenta uma melhoria da FEVE e contractibilidade regional. Em 2006, Gnechchi, et al. (2006) mostram que a injeção intramiocárdica de células estaminais mesenquimatosas com expressão do marcador Akt em ratos, promove uma melhoria da função miocárdica pós-EAM, 72 horas após a administração das células. Esta melhoria rápida é explicada pela libertação parácrina de fatores pelas CEM que inibem a apoptose mediada pela hipóxia, diminuindo o tamanho da área enfartada e melhorando a função ventricular cardíaca.

Hare et al. (2009) publicam um estudo duplamente cego, randomizado e controlado onde avaliam a segurança e eficácia da infusão intravenosa de CEM alogénicas em humanos pós-EAM. Tanto o score global da sintomatologia como a FEVE foram significativamente

melhores no grupo tratado em relação ao grupo controlo ( $p=0,0025$ ). A taxa de eventos adversos foi similar tanto no grupo controlo como no grupo tratado mostrando a segurança da terapêutica (Hare et al. 2009).

### ***Mobilização de células estaminais e células progenitoras***

Shintani, et al. (2001) mostram que as células endoteliais progenitoras e células mononucleares CD34+ são mobilizadas para a circulação durante a isquemia miocárdica em humanos. Partindo deste conceito, as células estaminais e progenitoras podem ser mobilizadas da medula óssea através da administração sistémica de citocinas como a G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) aumentado, assim, a taxa de reparação do tecido isquémico.

Ince, et al. (2004) mostram num estudo randomizado e controlado, com uma população de 30 doentes, que a mobilização de células CD34+ com a administração de G-CSF 1 a 6 dias após EAM resultava numa melhoria significativa da FEVE aos 4 e 12 meses de follow-up em relação ao grupo controlo. No entanto, Ripa et al. (2006), num estudo randomizado e controlado com placebo, com uma população de 78 doentes, mostram que a mobilização de células CD34+ com administração de G-CSF 1 a 6 dias após EAM é segura, no entanto, não se verifica melhoria da FEVE comparativamente com o grupo controlo.

No estudo REVIVAL e no estudo G-CSF-STEMI, não é também encontrado qualquer efeito da mobilização de células CD34+ a nível da função cardíaca. Zohnhöfer et al. (2008) publicam uma meta-análise de 10 ensaios clínicos incluindo 445 doentes, que analisavam a função cardíaca após EAM quando administrado G-CSF. Não foram observadas diferenças na FEVE ou no tamanho da área enfartada entre o grupo controlo e o grupo tratado (Zohnhöfer, et al. 2006; Engelman et al. 2006).

### ***Células estaminais cardíacas***

Bergam, et al. (2009) mostram que existe regeneração de cardiomiócitos no miocárdio do ser humano, existindo um *turnover* anual de 1% aos 20 anos

de idade, diminuindo a taxa para 0,3% anuais aos 75 anos de idade, sendo que menos de 50% dos cardiomiócitos são substituídos ao longo da vida. No estudo, os autores referem que esta descoberta abre portas para estratégias terapêuticas que visem a estimulação deste processo para o tratamento de patologias cardíacas.

No estudo SCIPPIO, Bolli et al. (2011), estudaram o efeito que possui a administração intracoronária de células cardíacas estaminais autólogas em doentes com disfunção ventricular esquerda (FE<40%) pós-enfarte agudo de miocárdio. No grupo tratado a FEVE aumentou de  $30,1 \pm 1,9\%$  para  $38,5 \pm 2,8\%$  aos 4 meses ( $p=0,001$ ). No grupo controlo a FEVE não sofreu alterações. Os resultados iniciais deste estudo são bastante motivadores já que mostram que a terapêutica com estas células melhora a função cardíaca e reduz a área de enfarte em doentes com insuficiência cardíaca pós-EAM. No entanto, são necessários estudos maiores de fase 2 para estudar melhor a eficácia desta terapêutica.

### ***Mioblastos esqueléticos***

Os mioblastos esqueléticos (ME) são células progenitoras existentes num estado quiescente debaixo da membrana basal das fibras musculares esqueléticas. Estas células podem ser isoladas de biópsias musculares e expandidas *in vitro* para uso terapêutico (Wollert, et al. 2005)

Em 1996, Murry, et al. (1996), mostram num estudo pré-clínico efetuado em ratos, que ME podem estabelecer novo tecido muscular quando transplantados para corações com lesão. Mais tarde, é mostrado que os transplantes de ME dão origem a uma subpopulação de células híbridas esqueleto-cardíacas de fenótipo desconhecido (Reinecke, et al. 2000).

O valor clínico dos ME ainda não é completamente conhecido. Vários estudos clínicos em fase I foram publicados com resultados promissores. Em 2003, Menasche, et al. (2003), mostraram que a transplantação autóloga de ME em doentes com cardiomiopatia isquémica grave, resulta num aumento da fração de ejeção, com a desvantagem de potenciais eventos

arrítmicos. Em 2004, Herreros et al. (2004), mostraram que a injeção de mioblastos esqueléticos em conjunção com bypass coronário, em doentes com enfarte de miocárdio antigo, é segura e está associada a um aumento global da função ventricular esquerda, sem indução de arritmias. A função cardíaca foi avaliada por ecocardiografia, e a perfusão miocárdica através de PET com Fluorodesoxiglucose ( $^{18}\text{F}$ ) e  $^{13}\text{N}$ -amónia. No estudo não existiu uma população controlo, no entanto, houve contaminação dos ME injetados num doente. Neste doente não se verificou melhorias significativas da FEVE. Os autores afirmam que apesar de se tratar de um achado interessante, não permite tirar conclusões.

No entanto, em 2008, Menasche et al. (2008) publicam resultados do Estudo MAGIC, um estudo multicêntrico, randomizado, controlado e duplamente cego. Neste estudo foram incluídos doentes com disfunção ventricular (Fração de Ejeção <35%), enfarte de miocárdio e com indicação para cirurgia coronária. Neste estudo foram injetados no miocárdio mioblastos esqueléticos em 67 doentes, não tendo sido observada melhoria da função ventricular aos 6 meses. Foi ainda verificada uma tendência para maior número de eventos arrítmicos no grupo em que se efetuou transplantação de mioblastos.

### ***Células estaminais embrionárias***

As células estaminais embrionárias (CEE) podem ser isoladas do embrião cinco dias após a fertilização. O seu uso para regeneração do miocárdio é bastante atrativo já que são totipotentes, possuindo a capacidade de se diferenciar em qualquer célula do ser humano (Lovell, et al. 2010). No entanto, existem alguns obstáculos associados à sua utilização como a rejeição imunológica e a propensão para o desenvolvimento de teratomas quando são injetadas *in vivo*. Levanta-se ainda a questão ética do uso e obtenção das CEE (Segers, et al. 2008).

### ***Células pluripotentes induzidas***

Takahashi et al. (2006) e Wernig, et al. (2007), demonstraram que células diferenciadas, nomeadamente

fibroblastos, podem ser reprogramados para um estado de diferenciação indistinguível das células estaminais embrionárias através da introdução de quatro fatores, Oct3/4, Sox2, c-Myc e Klf4. Estas células, denominadas de células pluripotentes induzidas (CPI), resolvem a questão ética da obtenção de CEE e também a questão da imunossupressão já que as CPI são geradas a partir de células somáticas adultas autólogas (Takahashi, et al. 2006; Mauritz, et al. 2008). Mauritz et al. (2008) demonstram que as CPI podem-se diferenciar em cardiomiócitos funcionais. Em 2009, Nelson, et al. (2009) mostraram que fibroblastos reprogramados para CPI, adquirem potencial de reparação cardíaca no enfarte agudo do miocárdio em ratos, estabelecendo as CPI como células potenciais no tratamento da doença cardíaca. No entanto, neste mesmo estudo, foi observado que alguns ratos desenvolveram tumores o que constitui um problema a ultrapassar nas terapias baseadas em CPI antes de se avançar para ensaios clínicos em humanos.

### Mecanismos de ação propostos das células estaminais

Vários estudos pré-clínicos e em humanos utilizando células estaminais mostraram melhoria da função cardíaca pós-EAM. Inicialmente os mecanismos propostos para esta melhoria passavam pela regeneração celular miocárdica. Todavia, a baixa taxa de retenção celular e baixo número de cardiomiócitos *de novo* demonstrados na maior parte dos estudos torna difícil que a regeneração celular miocárdica seja responsável pela melhoria da função cardíaca observada. Verifica-se ainda, em alguns estudos, uma melhoria da função cardíaca 72 horas após a administração celular, melhoria essa que é demasiado precoce para que possa ser explicada por um mecanismo de regeneração miocárdica (Shah et al. 2011).

A secreção parácrina de fatores pelas células estaminais administradas surgiu assim como uma hipótese para os resultados obtidos. De facto, as células estaminais secretam citocinas variadas que induzem efeitos benéficos como angiogénese, prevenção da

apoptose, ativação e recrutamento das células estaminais e progenitoras residentes e imunomodulação da lesão (Lovell et al. 2010; Gneccchi et al. 2008).

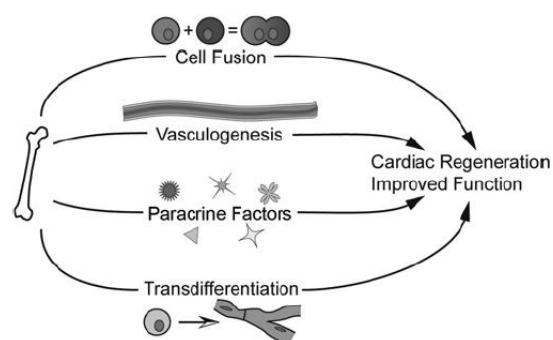


Fig 4 - Alguns mecanismos de ação das células estaminais propostos

### Questões em estudos futuros

O grande objetivo da terapêutica com células estaminais no enfarte agudo de miocárdio é a recuperação da função cardíaca através da regeneração dos cardiomiócitos perdidos. Apesar deste objetivo ser altamente desafiante, os estudos mais atuais apresentam resultados encorajadores.

Os estudos de fase I e II mostraram que o tratamento é seguro e que possui resultados positivos na melhoria da função cardíaca após EAM. Os resultados não são todos uniformes, muito provavelmente devido aos diferentes tipos de populações e concentrações celulares administradas, ao processamento celular distinto e às diferentes técnicas de administração. No entanto, estas incertezas não devem desencorajar a investigação nesta área.

A *Task Force of the European Society of Cardiology on stem cells and repair of the heart* foi criada em 2006 com o objetivo de investigar o papel das células estaminais e progenitoras no tratamento de doença cardiovascular (Bartunek et al. 2006). Nesta *Task Force* foram definidas várias orientações para estudos futuros:

I. Estudos maiores, duplamente cegos, randomizados controlados, sobre o uso de CMO autólogas no tratamento do EAM. A população incluída nestes estudos deve incluir doentes com EAM com menos de 12

horas de evolução e tratados com revascularização imediata, seja angioplastia ou fibrinólise.

II. Um estudo duplamente cego, randomizado, controlado, sobre o uso de CMO autólogas no tratamento de doentes com EAM com mais de 12 horas de evolução ou naqueles sem resposta à terapia. Apesar destes doentes representarem uma pequena fração dos doentes com EAM, o seu prognóstico é reservado.

III. Estudos duplamente cegos, randomizados e controlados que abordem a utilização de CMO autólogas e mioblastos esqueléticos no tratamento de insuficiência cardíaca secundária a doença cardíaca isquémica. O papel da terapêutica de células estaminais e progenitoras necessita de ser avaliado no tratamento de cardiomiopatias, em particular na cardiomiopatia dilatada.

IV. Estudos bem planeados que abordem a segurança e mecanismos de hipóteses específicas como por exemplo estudos com células marcadas radioactivamente ou para estudar mecanismos parácrinos e autócrinos.

V. Estudos que confirmem a segurança e benefício do uso de terapia baseada em administração unicamente de citocinas (Ex: Facto G-CSF) ou citocinas em conjunto com células estaminais ou progenitoras.

Esta *Task Force* foi criada há quase 6 anos, e desde então vários estudos foram já publicados e vários avanços se fizeram na área da regeneração cardíaca.

Hoje em dia o foco dos estudos está nos fatores que são produzidos pelas células estaminais e na capacidade que possuem de induzir neovascularização, modular a inflamação, fibrinogénese, metabolismo cardíaco e no aumento da proliferação e ativação dos cardiomiócitos existentes. Uma análise destes fatores e citocinas levará a um melhor entendimento dos mecanismos de ação das células estaminais.

Outro foco em estudo é o aperfeiçoamento celular por bioengenharia molecular. O conceito passa por modificar as células estaminais e progenitoras antes da sua administração, melhorando assim a sua potência e eficácia terapêutica. Por exemplo, Mias et al. (2008) mostram que o pre tratamento de células estaminais

mesenquimatosas com melatonina melhora a sua sobrevivência e a sua capacidade proangiogénica e mitogénica.

A bionanotecnologia com a engenharia de tecidos terá também um papel preponderante no futuro. Há projetos para o desenvolvimento de biomateriais capazes de suportar as células estaminais transplantadas aumentando assim a sua retenção. Nos biomateriais poderão também ser incorporados fatores e citocinas que aumentem a sobrevivência celular, a proliferação e diferenciação.

Para finalizar, estão a ser iniciados estudos na fase III, randomizados, duplamente cegos e controlados. Estes estudos vão esclarecer por fim qual o grau de eficácia da terapêutica com células estaminais e confirmar que potencial existe para a regeneração cardíaca abrindo assim caminhos para uma fascinante nova era da medicina cardiovascular (Sanz-Ruiz et al, 2010).

## Referências

- Aicher, et al. (2003) Assessment of the tissue distribution of transplanted human endothelial progenitor cells by radioactive labeling, *Circulation*, 107: 2134–2139.
- Amado, et al. (2005) Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 102: 11474–11479.
- Antman EM, Braunwald E. (2008) ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. In: Harrison's Principles of Internal Medicine (Fauci, et.al., 17th ed), McGraw-Hill's Companies.
- Assmus et al. (2010) Clinical outcome 2 years after intracoronary administration of bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction, *Circ Heart Fail*, 3: 89–96.
- Assmus et al. (2002) Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI), *Circulation*, 106(24): 3009–3017.
- Barbash, et al. (2003) Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution, *Circulation*, 108: 863–868.

- Bartunek et al. (2006) The consensus of the task force of European Society of cardiology concerning the clinical investigation of the use of autologous stem cells for repair of the heart, *Eur Heart J*, 27(11): 1338-1340
- Bartunek et al. (2005) Intracoronary injection of CD133-positive enriched bone marrow progenitor cells promotes cardiac recovery after recent myocardial infarction: feasibility and safety, *Circulation*, 112(9): I178–I183.
- Beltrami et al. (2001) Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction, *New England Journal of Medicine*, 344 (23): 1750-1757
- Bergmann, et al. (2009) Evidence for cardiomyocyte renewal in humans, *Science* 2009, 324: 98–102
- Bolli et al. (2011) Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial, *The Lancet*, 378((9806):1847-1857
- Cao et al. (2009) Long-term myocardial functional improvement after autologous bone marrow mononuclear cells transplantation in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: 4 years follow-up, *Eur Heart J*, 30: 1986–1994.
- Chachques et al. (2004) Autologous human serum for cell culture avoids the implantation of cardioverter-defibrillators in cellular cardiomyoplasty, *Int J Cardiol*, 95(1):29 –33.
- Chen et al. (2004) Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction, *American Journal of Cardiology*, 94(1): 92-95.
- Dib et al. (2011) Cell Therapy for Cardiovascular Disease: A Comparison of Methods of Delivery, *J. of Cardiovasc. Trans. Res*, 4:177–181.
- Engelmann et al. (2006) Autologous bone marrow stem cell mobilization induced by granulocyte colony-stimulating factor after subacute ST segment elevation myocardial infarction undergoing late revascularization: final results from the G-CSF-STEMI (Granulocyte Colony-Stimulating Factor ST-Segment Elevation Myocardial Infarction) trial, *Journal of the American College of Cardiology*, 48(8): 1712–1721.
- Fernández-Avilés et al. (2004) Experimental and clinical regenerative capability of human bone marrow cells after myocardial infarction, *Circulation Research*, 95(7): 742–748.
- Fuchs et al. (2003) Catheter-based autologous bone marrow myocardial injection in no-option patients with advanced coronary artery disease: a feasibility study, *J Am Coll Cardiol*, 41: 1721–1724.
- Gersh, et al. (2009) Cardiac cell repair therapy: a clinical perspective, *Mayo Clinic Proceedings*, 84(10): 876-89.
- Gnecchi et al. (2008) Paracrine Mechanisms in Adult Stem Cell Signaling and Therapy, *Circulation*, 103:1204-1219.
- Gnecchi et al. (2006) Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement, *FASEB J.*, 20: 661–669
- Hamano et al. (2001) Local implantation of autologous bone marrow cells for therapeutic angiogenesis in patients with ischemic heart disease: clinical trial and preliminary results, *Jpn Circ J*, 65: 845–847.
- Hare et al. (2009) A randomized, double-blind, placebo controlled, dose escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction, *J Am Coll Cardiol*, 54(24):2277-86.
- Herreros et al. (2003) Autologous intramyocardial injection of cultured skeletal muscle-derived stem cells in patients with non-acute myocardial infarction, *Eur Heart J*, 24: 2012–2020.
- Hirsch et al. (2011) Intracoronary infusion of mononuclear cells from bone marrow or peripheral blood compared with standard therapy in patients after acute myocardial infarction treated by primary percutaneous coronary intervention: results of the randomized controlled HEBE trial, *European Heart Journal*, 32: 1736-1747.
- Hofmann et al (2005) Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium, *Circulation*, 111: 2198-2202.
- Hou et al. (2005) Radiolabeled cell distribution after Intramyocardial, Intracoronary and Interstitial Retrograde Coronary venous delivery: Implications for current clinical trials, *Circulation*, 112:I-150-I156
- Ince et al. (2005) Prevention of left ventricular remodeling with granulocyte colony-stimulating factor after acute myocardial infarction: final 1-year results of the front-integrated revascularization and stem cell liberation in evolving acute myocardial infarction by granulocyte colony-stimulating factor (FIRSTLINE-AMI) trial, *Circulation*, 112(9): I73–I80.
- Janssens et al. (2006) Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomized controlled trial,,” *The Lancet*, 367(9505): 113–121.

- Jujo et al. (2008) Endothelial progenitor cells in neovascularization of infarcted myocardium, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 45(4): 530–544.
- Kajstura J, et al. (1998) Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95 (15): 8801–8805.
- Kawamoto et al. (2006) CD34-Positive Cells Exhibit Increased Potency and Safety for Therapeutic Neovascularization After Myocardial Infarction Compared With Total Mononuclear Cells, *Circulation*, 114: 2163-2169.
- Kawamoto et al. (2003) Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia, *Circulation*, 107(3): 461–468.
- Leistner et al. (2011) Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): final 5-year results suggest long-term safety and efficacy, *Clin Res Cardiol*, 100(10): 925-34.
- Lovell et al. (2010) Republished review: Cardiac stem cell therapy: progress from the bench to bedside, *Heart*, 96: 1531-1537.
- Lunde et al. (2006) Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction, *New England Journal of Medicine*, 355(12): 1199–1209.
- Mansour, et al. (2011) One-Year Safety Analysis of the COMPARE-AMI Trial: Comparison of Intracoronary Injection of CD133 Bone Marrow Stem Cells to Placebo in Patients after Acute Myocardial Infarction and Left Ventricular Dysfunction, *Bone Marrow Res*, 2011:385124, 6
- Mauritz et al. (2008) Generation of functional murine cardiac myocytes from induced pluripotent stem cells, *Circulation*, 118: 507–517.
- Menasche et al. (2008) The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation, *Circulation*, 117: 1189–1200.
- Menasche et al. (2003) Autologous skeletal myoblast transplantation for severe post-infarction left ventricular dysfunction, *J Am Coll Cardiol*, 41: 1078–1083.
- Meyer et al. (2009) Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: 5-year follow-up from the randomized controlled BOOST trial, *Eur Heart J*, 30: 2978–2984.
- Meyer et al. (2006) Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (Bone marrow transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial, *Circulation*, 113(10): 1287–1294.
- Mias et al. (2008) Ex vivo pretreatment with melatonin improves survival, proangiogenic/ mitogenic activity, and efficiency of mesenchymal stem cells injected into ischemic kidney, 26(7):1749-57
- Murry et al. (1996) Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis, *J Clin Invest*, 98: 2512–2523.
- Nardi, et al. (2006) Mesenchymal Stem Cells: Isolation, in Vitro Expansion and Characterization. In: *Stem Cells. Handbook of experimental pharmacology* (Wobus et al.), 174: 249–82.
- Nelson et al. (2009) Repair of acute myocardial infarction by human stemness factors induced pluripotent stem cells, *Circulation*, 120: 408–416.
- Perin et al. (2003) Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure, *Circulation*, 107: 2294 –2302.
- Perin et al. (2004) Improved exercise capacity and ischemia 6 and 12 months after transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic cardiomyopathy, *Circulation*, 110(2): 213–218.
- Reinecke et al. (2000) Electromechanical coupling between skeletal and cardiac muscle. Implications for infarct repair, *J Cell Biol*, 149: 731–740.
- Riopa et al. (2006) Stem cell mobilization induced by subcutaneous granulocyte-colony stimulating factor to improve cardiac regeneration after acute ST elevation myocardial infarction: result of the double-blind, randomized, placebo-controlled stem cells in myocardial infarction (STEMMI) trial, *Circulation*, 113(16): 1983–1992.
- Sanz-Ruiz et al. (2010) Phases I-III Clinical Trials using adult stem cells, *Stem Cells International*, article ID:579142, 12.
- Schächinger et al. (2006) Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial, *European Heart Journal*, 27(23): 2775–2783.
- Schächinger et al. (2004) Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI trial, *Journal of the American College of Cardiology*, 44(8): 1690–1699.

- Segers et al. (2008) Stem cell therapy for Cardiac Disease, *Nature*, 451: 937-942.
- Shah, et al. (2011) Stem Cell Therapy in Acute Myocardial Infarction: A Pot of Gold or Pandora's Box, *Stem Cells International*, 2011(536758):20
- Shah et al. (2007) Bone marrow cells for myocardial repair—a new therapeutic concept, *Indian Heart Journal*, 59(6): 482–490.
- Shah et al. (2007) Stem cell therapy for acute myocardial infarction long term 24 months follow-up: short title: follow-up of ABMSCs therapy in AMI, *Indian Heart Journal*, 59: 394-402.
- Shintani et al. (2001) Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction, *Circulation*, 103: 2776–2779.
- Siminiak et al (2004) Autologous skeletal myoblast transplantation for the treatment of postinfarction myocardial injury: phase I clinical study with 12 months of follow-up, *Am Heart J*, 148: 531–537.
- Smith et al. (2007) Regenerative Potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens, 115: 896-908.
- Strauer et al. (2002) Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans, *Circulation*, 106: 1913–1918.
- Takahashi et al. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, *Cell*, 126(4): 663–676.
- Tendera et al. (2009) Intracoronary infusion of bone marrow-derived selected CD34+CXCR4+ cells and non-selected mononuclear cells in patients with acute STEMI and reduced left ventricular ejection fraction: results of randomized, multicentre Myocardial Regeneration by Intracoronary Infusion of Selected Population of Stem Cells in Acute Myocardial Infarction (REGENT) Trial, *Eur Heart J*, 30: 1313–1321.
- Thum et al. (2010) The Balance Study: Too early to Speculate on Mortality Effects, *J. Am. Coll. Cardiol*, 55: 263-264
- Toma, et al. (2002) Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart, *Circulation*, 105: 93–98.
- Tongers et al. (2011) Stem and progenitor cell-based therapy in ischaemic heart disease: promise, uncertainties and challenges, *European Heart Journal*, 32: 1197-1206.
- Tse et al. (2003) Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation, *The Lancet*, 361: 47– 49.
- Tuch BE (2006) Stem cells—a clinical update, *Australian Family Physician*, 35(9): 719–21.
- Wei HM, et al. (2009) Human bone marrow-derived adult stem cells for post-myocardial infarction cardiac repair: current status and future directions, *Singapore Medical Journal*, 50 (10): 935-942.
- Wernig et al. (2007) In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state, *Nature*, 448(7151): 318–324.
- Wollert, et al. (2005) Clinical applications of stem cells for the heart, *Circ. Res.* 96: 151–163.
- Wollert et al. (2004) Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: The BOOST randomized controlled clinical trial, *The Lancet*, 364(9429): 141–148.
- Yeh et al. (2003) Transdifferentiation of human peripheral blood CD34-enriched cell population into cardiomyocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells in vivo, *Circulation*, 108(17): 2070–2073.
- Yousef et al. (2009) The BALANCE Study: clinical benefit and long-term outcome after intracoronary autologous bone marrow cell transplantation in patients with acute myocardial infarction, *J Am Coll Cardiol*, 53: 2262–2269.
- Zohlnhöfer et al. (2008) Stem cell mobilization y granulocyte colony-stimulating factor for myocardial recovery after acute myocardial infarction: a meta-analysis, *J Am Coll Cardiol*, 51(15):1429-1437
- Zohlnhöfer et al. (2006) Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: a randomized controlled trial, *Journal of the American Medical Association*, 295(9): 1003–1010.