

“Células Estaminais no Tratamento da Doença Coronária”

Trabalho de Revisão

LILIANA PIMENTA DOS SANTOS

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Endereço:

Rua do Agro nº 13

3850-009 Albergaria-a-Velha

Resumo

Ao longo da última década, as terapias baseadas em células estaminais emergiram e cresceram enquanto potencial inovação no tratamento de várias doenças, nomeadamente do enfarte do miocárdio. Várias células estaminais foram estudadas mas permanece por determinar o tipo de células ideal a ser implementado.

As células estaminais embrionárias são totipotentes pelo que se podem diferenciar em vários tipos celulares. Esta característica tornou-as bastante promissoras embora, apesar do enorme entusiasmo, a sua utilização clínica esteja limitada por questões éticas, pelo elevado risco de formação de teratomas e pelos efeitos imunogénicos.

Os mioblastos esqueléticos foram também estudados, entre as suas vantagens incluem-se a origem autóloga, elevada capacidade proliferativa, capacidade de diferenciação limitada às células da linha miogénica e a elevada resistência à isquémia. Foram estas as primeiras células aplicadas clinicamente, tendo demonstrado eficácia clínica. No entanto não provaram diferenciação em cardiomiócitos e, no que diz respeito à sua segurança surgem algumas preocupações pelo risco de suscitarem arritmias.

As células estaminais derivadas de medula óssea adulta incluem as células progenitoras hematopoiéticas, as células progenitoras mesenquimatosas e também as células progenitoras endoteliais. As características destas células permitem ultrapassar questões éticas e clínicas associadas às células estaminais embrionárias e, em modelos animais, demonstraram grau variável de cardiomiogénese, melhoria significativa da função cardíaca e segurança na sua utilização. Contudo, a sua aplicação está limitada pelo tamanho da população necessário, pelo tempo dispendido na manipulação e pelo diminuto potencial de diferenciação.

As células estaminais derivadas do tecido adiposo têm vindo a ganhar importância no campo da terapia celular devido às suas vantagens, provêm de um tecido abundante nos doentes, existem em elevada densidade nesse tecido, têm fácil acesso, existe um curto período de tempo para estarem aptas para o transplante e não foram ainda descritos efeitos secundários. É contudo importante esclarecer o seu mecanismo de acção e aguardar pelos resultados dos ensaios clínicos em curso.

A investigação da terapia celular para aplicação cardíaca sofreu uma importante revolução quando se evidenciou que o coração, até então considerado um órgão diferenciado de forma terminal, possuía células-tipo cardiomiócitos com capacidade mitótica. As células progenitoras cardíacas representam um reservatório de células estaminais do miocárdio adulto. Possuem vantagens como o facto de serem autólogas, específicas do tecido e pré concebidas para pertencer a linhagens cardiovasculares. Contudo, permanecem dúvidas relativamente a estas células como a sua origem, os marcadores que expressam e os mecanismos pelos quais actuam no tecido lesado.

Palavras-chave

Doença coronária; Terapia Celular; Células estaminais embrionárias; Mioblastos esqueléticos; Células derivadas da medula óssea; Células derivadas do tecido adiposo; Células progenitoras cardíacas; Células pluripotentes induzidas;

Abstract

Over the last decade, stem cell-based therapies have emerged and grown as a potential innovation in the treatment of large number of diseases including myocardial infarction. Several types of stem cells have been studied; however the ideal cell type to be implemented remains to be determined.

Embryonic stem cells are totipotent so that they can differentiate into various cardiac cell types. This feature has made them very promising, but despite the huge enthusiasm, their clinical use is limited by both ethical issues, the high risk of teratoma formation and the immunogenic effects.

The skeletal myoblasts were also studied and it includes among its advantages autologous origin, high proliferative capacity, differentiation capacity limited to myogenic cell line and high resistance to ischemia. These were the first cells applied clinically and they demonstrated clinical efficiency, despite its inability to differentiate into cardiomyocytes. With regard to its security there are raising concerns about the risk of arrhythmias.

Stem cells derived from adult bone marrow include hematopoietic stem cells, mesenchymal progenitor cells and also endothelial progenitor cells. The application of these cells avoids the ethical and clinical embryonic stem cells issues. In animal models have shown varying degree of cardiomyogenesis, significant improvement in cardiac function and safety. However, its use is limited by population size, by time spent in handling and the diminished potential for cardiovascular differentiation.

Adipose tissue-derived stem cells have been receiving attention in the cell therapy because of its advantages, they come from for an abundant tissue in patients, they has a high density in this tissue, they can be easily harvested, require a short period of time

to be fit for transplantation and has not been described side effects yet. However it's important to clarify its mechanism of action and wait for the results of ongoing clinical trials.

The investigation of cell therapy for cardiac application has undergone a major revolution when it became evident that the heart, until then considered an organ in a differentiated terminal state, had cell-type cardiomyocytes with mitotic capacity, cardiac progenitor cells represent a reservoir of stem cells from adult myocardium. They have advantages such as the fact that they are autologous tissue-specific and pre-conceived to belong to cardiovascular lineages. However, some questions remain regarding these cells as its origin, which markers they express and about processes of homeostasis and mechanisms by which they act on the injured tissue

Conteúdo

▸ Introdução	5
▸ Células Estaminais Embrionárias	9
▸ Células Estaminais Adultas	14
○ Mioblastos Esqueléticos	14
○ Células derivadas de Medula óssea	18
▪ Células Estaminais Hematopoiéticas	19
▪ Células Estaminais Mesenquimatosas	22
▪ Células Progenitoras Endoteliais	24
▪ Ensaios clínicos	26
○ Células derivadas do Tecido Adiposo	31
○ Células Progenitoras Cardíacas	35
▸ Células Pluripotentes Induzidas	40
▸ Conclusão	42
▸ Bibliografia	44

Introdução

“It’s easy to be excited about stem cell research”
(Deborah J. Sweet, PhD)

As doenças cardiovasculares continuam a ser a causa de maior morbidade e mortalidade no mundo ocidental, causando a morte de cerca de 17,1 milhões de pessoas em cada ano. Segundo a Organização Mundial de Saúde, estima-se que em 2030, cerca de 23,6 milhões de pessoas morrerão devido a doença cardíaca. (Bollini S, 2010). O enfarte do miocárdio é causado por uma súbita redução do aporte sanguíneo ao miocárdio, com consequente diminuição da disponibilidade de oxigénio face às suas necessidades. Esta situação conduz a necrose do miocárdio e apoptose de cardiomiócitos que desencadeia diminuição da espessura cardíaca e remodelação cardíaca, com proliferação de fibroblastos, deposição de colagénio e formação de tecido fibroso. Em termos fisiológicos verifica-se uma diminuição da capacidade do coração para bombear eficazmente o sangue e, sequentemente o aparecimento de insuficiência cardíaca ou mesmo a morte do doente. (Christophorou N, 2007) (Marecos C., 2010).

Apesar dos progressivos avanços na terapêutica da miocardiopatia isquémica, podendo os doentes ser submetidos a tratamento farmacológico (inibidores da enzima de conversão da angiotensina, beta-bloqueadores, estatinas entre outros), tratamento de reperfusão (Tousoulis D, 2008), terapêutica de resincronização cardíaca e também a transplantação cardíaca, única opção terapêutica num estadio de insuficiência cardíaca terminal, verificam-se ainda algumas lacunas no tratamento convencional para controlo da mortalidade cardiovascular nomeadamente pelo limitado número de dadores face ao número crescente de candidatos a transplante cardíaco. (Bollini S, 2010).

Neste contexto surgiram abordagens alternativas para restauração da função cardíaca através da promoção de processos regenerativos endógenos e transferência de células progenitoras para produção de miocárdio.

Os cardiomiócitos eram até há relativamente pouco tempo considerados células pós-mitóticas. Nos últimos anos alguns investigadores identificaram mitoses em corações humanos após situações de enfarte do miocárdio e sugeriram que cardiomiócitos estão continuamente a ser repostos através de processos que envolvem diferenciação, maturação, senescência e morte. Verificaram ainda que o processo de regeneração envolve o recrutamento de células progenitoras endógenas e subsequente diferenciação em diferentes tipos de células por um processo controlado pelo tecido hospedeiro. Assim, as terapias de reposição celular têm como objectivo a produção de tecido funcional após injeção de células precursoras no órgão lesado. (Gonzales C, 2009)

Vários tipos de células estaminais e progenitoras, quer autólogas quer alogénicas, foram estudadas quanto às suas características. Com estudos *in vitro* avaliaram-se as suas capacidades de diferenciação em cardiomiócitos e posteriormente investigaram-se as características funcionais dessas células. Já *in vivo* avaliou-se a capacidade de enxerto das células estaminais no miocárdio hospedeiro, a resposta funcional cardíaca ao tratamento e também a própria segurança da sua utilização. (Christophorou N, 2007) (Ortak J, 2008) (Bollini S, 2010)

Apesar do sucesso obtido em alguns estudos, desconhecem-se os mecanismos de acção das células utilizadas, propondo-se como possibilidades a diferenciação em miócitos, a promoção da angiogénese (Lunde K, 2006) e a secreção de factores parácrinos, como a IGF-1 (Insulin Growth factor), capazes de aumentar a função dos miócitos sobreviventes (Wollert KC, 2004). Outro processo possível será a secreção de factores parácrinos capazes de

aumentar a mobilização de células estaminais residentes no coração. Pode verificar-se ainda a oposição à destruição da matriz extracelular com diminuição da apoptose dos cardiomiócitos e a fusão entre células transplantadas e os miócitos residentes. (Marecos C., 2010)

É importante notar que o coração contém vários tipos de células musculares e não-musculares. Assim, a regeneração do miocárdio requererá a produção de cardiomiócitos funcionais (miócitos pacemaker, auriculares e ventriculares) e o desenvolvimento de uma rede de vasos sanguíneos (células endoteliais, células de músculo liso arterial e venoso) de modo a suportar e permitir irrigação dos novos cardiomiócitos. O principal desafio consiste então em identificar uma ou várias células progenitoras cardiovasculares que possam dar origem a cardiomiócitos, células de músculo liso e células endoteliais de modo a restaurar o normal funcionamento cardíaco. (Gonzales C, 2009)

As características do tipo de célula ideal foram articuladas por muitos especialistas que consideraram que o tipo de célula deve ser tanto quantitativa como temporalmente disponível; deverá proporcionar segurança na sua administração; ser eficaz no enxerto; ter capacidade de diferenciação e, mais importante, aptidão para reparar o tecido cardíaco. Alguns autores argumentam que uma fonte de células autóloga será a ideal para evitar qualquer possibilidade de rejeição contudo, reconhece-se que a terapia com células alogénicas é também uma forte possibilidade. Outras considerações de ordem prática, como o custo da terapêutica, são também factores de elevada importância para tornar acessível a realização desta nova terapia. (Heldman A, 2011)

O propósito deste artigo de revisão será apresentar resultados de estudos clínicos e pré-clínicos sobre os vários tipos de células estaminais estudados: Células Estaminais Embrionárias; Mioblastos Esqueléticos; Células Estaminais Derivadas De Medula Óssea entre as quais Células Estaminais Hematopoiéticas, Células Estaminais Mesenquimatosas e Células

Progenitoras Endoteliais; Células Estaminais Derivadas do Tecido Adiposo, Células Progenitoras Cardíacas e Células Pluripotentes Induzidas. Serão referidos os resultados sobre a sua eficácia, capacidade de enxerto no miocárdio hospedeiro, resposta funcional cardíaca e também sobre a segurança com referência aos efeitos secundários à sua utilização.

Tipo Célula	Origem	Marcadores Fenotípicos	Potencial de Diferenciação	Aplicação
Células Estaminais Embrionárias	Interior de blastocistos	SSEA-1, OCT-3/4, Sox-2, FoxD-3, Nanog	Totipotência (mesoderme, endoderme, ectoderme)	1. Modelo de desenvolvimento 2. Modelo farmacológico e tóxicológico 3. Terapia celular: reparação cardíaca; formação vascular; reparação neural; diabetes; lesão hepática;
Mioblastos esqueléticos	Músculo Esquelético	Pax7+, CD34+, CD45 ^À , Sca1 ^À , receptor c-met	Mioblastos esqueléticos	1. Reparação músculo esquelético 2. Reparação cardíaca
Células estaminais hematopoiéticas	Medula óssea; Sangue periférico; Cordão umbilical; Placenta;	Lin, CD34, CD38, CD43, CD45RO, CD45RA, CD59, CD90, CD109, CD117, CD133, CD166, HLA DR	1. Células sanguíneas: eritrócitos; granulócitos; macrófagos; linfócitos; 2. Células não-sanguíneas: Células musculares (mioblastos esqueléticos e cardiomiócitos), células hepáticas; pele; pulmão; rim...	1. Falência medula óssea 2. Reparação cardíaca 3. Doenças auto-imunes
Células estaminais mesenquimatosas	Medula óssea; Cartilagem; Sangue periférico; Cordão umbilical; ...	Negativo para: CD34, CD45, CD14, CD31, CD133; Positivo para: CD105, CD166, CD54, CD55, CD13 CD44	1. Células derivadas da mesoderme como: osteoblastos, adipócitos e condrócitos 2. Células não mesodérmicas como: neurónios, cardiomiócitos, Pulmão, fígado, intestino...	1. Defeitos do osso/cartilagem 2. Isquémia Vascular 3. Doenças Cardiovasculares 4. Lesões epidérmicas 5. Reparação neural 6. Lesão hepática 7. Diabetes
Células progenitoras endoteliais	Medula óssea; Sangue periférico; Cordão umbilical; Células estaminais hematopoiéticas; Hemangioblastos; tecido adiposo;	CD34, CD133, VEGFR2	1. células endoteliais 2. cardiomiócitos	1. Isquémia dos membros 2. Enfarte do miocárdio 3. Lesão vascular
Células estaminais cardíacas	Coração	c-kit+, SCA1+, Abcg2+, Islet-1+	Cardiomiócitos	Reparação Cardíaca

Tabela 1: Origem, características e aplicações das Células estaminais.

Adaptado de: “The role of vascular stem cells in atherogenesis and post-angioplasty restenosis” (Qian H, 2007)

Células Estaminais Embrionárias

Durante a década 50, alguns estudos experimentais em modelos animais culminaram na produção de teratomas, teratocarcinomas e posterior isolamento de células estaminais dos carcinomas embrionários. Estava assim dado o passo inicial para o conhecimento das células estaminais embrionárias. Já em 1985, Doetshman e colaboradores descreveram pela primeira vez o potencial cardiogénico de células estaminais embrionárias de ratinho (Doetschman TC, 1985). O primeiro isolamento de células estaminais embrionárias humanas obtido a partir de blastocistos humanos veio apenas a realizar-se em 1998. (Thomson JA, 1998) Estas células, caracterizadas pelo facto de derivarem de embriões em pré-implantação ou peri-implantação (Tousoulis D, 2008) tornaram-se grandes promessas terapêuticas pela característica totipotência que possuem, isto é, pela sua capacidade de proliferação em estados indiferenciados, com manutenção da possibilidade de diferenciação em linhas celulares das três camadas germinativas embrionárias. (Odorico JS, 2001)

Quando cultivadas em suspensão, as células estaminais embrionárias formam corpos embrióides, que correspondem a agregados de células das três camadas germinativas, verificando-se a expressão de marcadores dessas camadas durante a sua formação. Corpos embrióides pulsáteis de forma síncrona contêm células miogénicas positivas para marcadores de cardiomiócitos como a cadeia pesada de miosina, α -actinina, desmina e troponina I mas, não possuem o aspecto padrão embrionário. (Desbaillets I, 2000)

A primeira diferenciação de células estaminais embrionárias humanas em cardiomiócitos foi descrita em 2001 por Kehat (Kehat I, 2001). Já em 2004, o mesmo autor e seus colaboradores verificaram que células estaminais embrionárias se podiam diferenciar em cardiomiócitos com capacidade de propagar potenciais de acção de modo semelhantes às células musculares lisas e células endoteliais (Kehat I, 2004) (Li Z, 2007).

Após estudos em que se verificou que a implantação de corpos embrióides pulsáteis revertia completamente o bloqueio auriculo-ventricular concluiu-se que a plasticidade das células estaminais embrionárias seria melhor do que a das células estaminais adultas. A morfologia das células transplantadas assemelhava-se à dos cardiomiócitos embrionários, com miofibrilhas desorganizadas localizadas na periferia das células. (Kehat I, 2004) Mais tarde verificou-se que a sua administração em modelos animais de enfarte do miocárdio resultou no enxerto seguido de melhoria da função ventricular esquerda e diminuição da remodelação ventricular esquerda. (Singla DK, 2006) (Laflamme MA, 2007)

Atribui-se a diferenciação de células estaminais embrionárias em cardiomiócitos aos efeitos parácrinos de sinalização do hospedeiro, nomeadamente da superfamília de proteínas TGF- β . (Behfar A, 2002)

Apesar de promissoras, o elevado potencial das células estaminais embrionárias comporta um elevado risco na sua aplicação *in vivo* pelo que até ao momento apenas existem estudos esporádicos sobre a sua utilização na reparação cardíaca. O seu potencial teratogénico maligno não está ainda bem esclarecido mas, de acordo com observações realizadas *in vitro*, a administração *in vivo* de linhas de células estaminais embrionárias humanas poderá propiciar a formação de teratomas. Os teratomas são formados por estruturas endodérmicas, mesodérmicas e ectodérmicas constituídas por células maduras; já os teratocarcinomas contêm células indiferenciadas e possuem um compartimento de células estaminais. É preocupante o facto de células estaminais embrionárias e células de carcinoma embrionário apresentarem alguns marcadores comuns como Oct4 e Nanog. Além disso, a capacidade autoreplicativa das células estaminais embrionárias e das células de carcinoma embrionário é modulada por mecanismos semelhantes. Uma vez que teratomas de localização cardíaca possuem comportamento maligno e, ainda mais importante, o facto de as células estaminais embrionárias injectadas de modo intravenoso se poderem hospedar e colonizar vários órgãos

com o possível desenvolvimento de lesões neoplásicas, alertam para o facto de a sua aplicação poder associar-se a efeitos dramáticos. (Leri A, 2005) Em 2006, num estudo avaliou-se a prevalência da formação de teratoma após administração de células estaminais embrionárias de ratinho em ratinhos com enfarte do miocárdio; os autores revelaram que 21% dos corações tratados desenvolveram tumores derivados destas células no espaço pericárdico. (Nelson TJ, 2006)

A formação de teratomas permite-nos concluir que, isoladamente, o tecido cardíaco adulto não fornece as indicações necessárias para a linhagem de cardiomiócitos. Além disso, aqueles resultados também fazem realçar a necessidade de assegurar a ausência de células indiferenciadas pluripotentes residuais no grupo de células a transplantar em futuros processos de tratamento clínico. Esta tarefa pode ser conseguida através da selecção positiva dos cardiomiócitos previamente diferenciando *in vitro*, embora persista o problema da pureza do preparado, uma vez que a pluripotencialidade das células pode persistir entre a população enriquecida de miócitos. Assim, a injeção destas células pode ainda conduzir à formação de tumores visto que não existem métodos rigorosos para diferenciação de células estaminais embrionárias em cardiomiócitos *in vitro* (Kehat I, 2004) (Leri A, 2005) (Christophorou N, 2007); ou pelo recurso à selecção negativa isto é, pela eliminação das células que expressarem marcadores de células indiferenciadas. Sugeriu-se também que através da exposição das células estaminais embrionárias humanas *ex-vivo* a factores promotores da linhagem mesodérmica ou cardíaca, se poderia culminar num compromisso a ser seguido pelo enxerto *in vivo* pressupondo maior diferenciação cardiomiogénica. Usando essa abordagem, Tomescot e colaboradores demonstraram que o transplante de células estaminais embrionárias humanas, previamente tratadas com BMP2 e SU5402 (um inibidor do receptor de factor de crescimento de fibroblastos),

para coração de ratos sujeitos a enfarte, resultou na formação do tecido cardíaco humano, sem formação de teratomas. (Tomescot A, 2007)

Outra limitação da utilização de células estaminais embrionárias é a imunorejeição quando estas são alogénicas ou quando se diferenciam (Drukker M, 2004). Considera-se que as células estaminais embrionárias possuem privilégio na imunidade devido ao seu desenvolvimento precoce que lhes permite não serem reconhecidas pelas defesas imunes do receptor. A falta de expressão de MHC (complexo de histocompatibilidade major) poderá ser o potencial mecanismo subjacente a esta diminuta resposta imune às células embrionárias estaminais. Contudo, num estudo de Thompson em 1998, células com elevado nível de MHC também foram isentas de ataque imunológico, o que se opõe à noção de que a expressão de MHC seria a razão fundamental do privilégio imune das células estaminais embrionárias (Thomson JA, 1998). Verificou-se também (Drukker M, 2002) que a expressão de receptores para células Natural Killer, cuja activação depende da distinção do self/não-self, na superfície das células estaminais embrionárias era baixa ou mesmo ausente, o que também sugere o escape das células ao ataque das células NK. Pela comparação de resultados encontra-se divergência de conclusões de que é exemplo o estudo de Li (Li L., 2004) e o de Swijnenburg (Swijnenburg RJ, 2005): no primeiro concluiu-se que estas células possuem mecanismos que neutralizam a resposta imunológica proporcionando uma protecção às células estaminais embrionárias derivadas de aloenxertos; no entanto, esta mesma propriedade benéfica revelava também o risco de crescimento neoplásico. Já no estudo de Swijnenburg (Swijnenburg RJ, 2005) este verificou que *in vivo*, células estaminais embrionárias diferenciadas desencadeiam uma resposta imunológica acelerada comparativamente com a observada por células estaminais embrionárias indiferenciadas. Esses dados mostraram que o transplante alogénico de células estaminais embrionárias ou seus derivados no tratamento da doença cardíaca, pode exigir terapia imunossupressora uma

vez que as propriedades das células estaminais embrionárias relacionadas com o sistema imun, podem ser alteradas num microambiente de enfarte do miocárdio, onde a infiltração de células inflamatórias está intensificada, com progressão da diferenciação de células estaminais embrionárias alogénicas. Assim, a terapia imunossupressora parece ser aconselhável quando este tipo de células é usado no tratamento do enfarte do miocárdio. No entanto, este tratamento imunossupressor é pouco tolerado e debilita a qualidade de vida do doente. O estado de imunodeficiência dos ratinhos que desenvolveram teratoma após implantação de células estaminais embrionárias reflecte o grau de imunossupressão necessário para que não ocorra rejeição de células estaminais embrionárias (Leri A, 2005). Várias estratégias têm sido discutidas com o objectivo de prevenir a potencial rejeição imune contra as células transplantadas, nomeadamente microquimerismo, uso de células estaminais embrionárias isogénicas com o receptor ou a formação de bancos de células estaminais. Contudo, estes métodos deverão ainda ser melhor estudados para que a sua utilização se possa considerar como opção. (Yuan X, 2007) (Christophorou N, 2007)

O potencial de utilização terapêutica das células estaminais embrionárias humanas ostenta profundas preocupações éticas estando a questão fundamental relacionada com a noção do status moral de embriões humanos. As pesquisas sobre células estaminais embrionárias humanas são desejáveis, mas o dever de curar indivíduos doentes não deverá superar o objectivo de tratar seres humanos como sujeitos e não como objectos. Um ponto de vista interessante foi recentemente proposto: em paralelo com a definição de morte orgânica do adulto, que ocorre quando os critérios de morte cerebral são observados, também um embrião pode ser considerado organicamente morto quando perde uma função fundamental. Consistindo a sua função na continuidade, divisão celular integrada, crescimento e diferenciação, a paragem irreversível da divisão das células, mais do que a morte de cada célula, corresponde a morte orgânica do embrião. Aproximadamente 60%

dos embriões fecundados *in vitro* não se dividem às 24h. Muitas vezes, esse crescimento reflecte anormalidades genéticas graves, mas não significa necessariamente que todas as células do embriões sejam anormais. Nestes embriões mosaico, pelo menos um blastómero diplóide normal pode ser encontrado. Assim, a ética quando para a doação de órgãos poderia ser aplicada à colheita dos células estaminais humanos a partir de embriões organismicamente mortos. Isso proporcionaria uma base comum em que a necessidade de proteger os direitos humanos, dignidade e progresso na pesquisa biomédica não entrariam mais em conflito. (Leri A, 2005)

As limitações descritas conduzem ainda há impossibilidade de se realizarem testes em humanos (Heldman A, 2011) contudo, não desencorajaram os promotores das células estaminais embrionárias que consideram serem necessárias mais investigações para ultrapassar estes problemas biológicos, e também o cepticismo do uso terapêutico das células estaminais embrionárias. Deverá considerar-se ainda que o estudo das células embrionárias estaminais poderá também fornecer informação sobre os mecanismos de desenvolvimento embrionário e, dessa forma, conduzir a intervenções terapêuticas *in útero* e correcção de malformações congénitas.

Células Estaminais Adultas

Em contraste com as células estaminais embrionárias, as células estaminais adultas apresentam uma capacidade de diferenciação mais limitada mas permitem ultrapassar as questões éticas relacionadas com aquelas.

MIOBLASTOS ESQUELÉTICOS

O músculo esquelético é capaz de se regenerar por si após lesão uma vez que contém células satélite, também conhecidas como mioblastos, abaixo da membrana basal das fibras

musculares maduras, (Hagege AA, 2003) que possuem a capacidade de se fundir com as fibras musculares circundantes e de se diferenciar em músculo esquelético funcional. (Christophorou N, 2007)

Tendo por base o conceito de que os mioblastos esqueléticos possuem plasticidade suficiente para dar origem a músculo cardíaco, estas células, obtidas de biópsia do músculo esquelético, estão entre os tipos celulares mais precocemente estudados para regeneração cardíaca.

Entre as suas vantagens considera-se a sua origem a partir de células autólogas o que facilita a sua acessibilidade, as questões éticas e a ausência de necessidade de imunossupressão; além disso, são resistentes à isquémia o que constitui uma enorme vantagem visto que serão implantadas em tecido cicatricial pós enfarte no qual a vascularização é diminuta. Estas células estão consignadas à linhagem miogénica possuindo assim elevada capacidade proliferativa num estadio tardio de diferenciação, como tal são menos teratogénicas e possuem menor risco tumoral que as células estaminais embrionárias. (Menasché P, 2007) (Ortak J, 2008)

Através de estudos pré-clínicos e clínicos em situação pós enfarte do miocárdio em que se administraram mioblastos esqueléticos, demonstrou-se a sua capacidade para colonizar a região isquémica pós-enfarte e para contribuir na regeneração cardíaca e melhoria da função ventricular quer sistólica quer diastólica em modelos animais (Hagege AA, 2003) (Tousoulis D, 2008) São exemplos de estudos, o trabalho realizado por He e colaboradores, que usando um modelo animal de insuficiência cardíaca crónica demonstraram um significativo aumento da pressão sistólica após o transplante de mioblastos esqueléticos autólogos. Num outro estudo, utilizando coelhos com lesão cardíaca, Van den Bos e colaboradores relataram uma melhoria na espessura da parede regional (sem alteração concomitante na fracção de ejeção

global) e uma atenuação da remodelação ventricular no grupo tratado com estas células. (He KL, 2005) (Van den Bos EJ, 2005)

No entanto, os mioblastos implantados não provaram a sua diferenciação em cardiomiócitos. (Christophorou N, 2007). Estes achados são conducentes com a ideia de que os efeitos benéficos da sua administração derivam de efeitos parácrinos com aumento da angiogénese; redução da remodelação ventricular (Gonzales C, 2009); contracção autónoma; redução da área de enfarte ou alteração de propriedades mecânicas da cicatriz. (Menasché P, 2007)

Uma variedade de estudos clínicos aferiu segurança e eficácia de mioblastos esqueléticos usando ambos os modos de administração – intracoronária ou intramiocárdica – em doentes com cardiomiopatia isquémica crónica. (Ortak J, 2008) Contudo, a incapacidade dos mioblastos se transdiferenciarem em cardiomiócitos e de formarem conexões electrofisiológicas com o miocárdio hospedeiro, por não possuírem as proteínas N-caderina e conexina 43 no disco intercalar, tem levantado preocupações sobre o potencial de formação de substrato para taquicardia ventricular de reentrada. Esta constatação é reforçada por estudos nos quais se verificou que a super-expressão de conexina 43 induzida geneticamente, reforçou a lacuna da condutância juncional e diminuiu a arritmogenicidade. (Christophorou N, 2007) (Menasché P, 2008)

Devido às suas características anteriormente referidas como a facilidade de obtenção pela biópsia, elevada capacidade de proliferação *in vitro etc*, estas células foram o primeiro tipo celular usado em estudos clínicos de terapia celular no tratamento da doença cardíaca. (Christophorou N, 2007)

Num estudo, orientado por Siminiak, 10 doentes receberam doses variáveis de células. A fracção de ejeção média, antes do procedimento 35,2%, aumentou significativamente ao

fim de 4 meses para 42%, e este efeito manteve-se durante os 12 meses de follow-up. (Siminiak T, 2004)

O estudo MAGIC, multicêntrico, randomizado, controlado por placebo, duplamente cego, publicado em 2008, incluiu doentes com disfunção ventricular esquerda e indicação para cirurgia bypass da artéria coronária, teve como principais objectivos avaliar a segurança (pela ocorrência de efeitos adversos cardíacos e arritmias ventriculares durante os primeiros 6 meses pós cirurgia) e a eficácia (por alterações na função do ventricular esquerda regional e global) desta terapêutica celular. Estes pacientes receberam células (400 ou 800 milhões) obtidas de biópsia de músculo esquelético ou solução de placebo injectada em 30 locais em volta da cicatriz. Um cardioversor-desfibrilhador foi implantado em todos os doentes antes da alta hospitalar pelo possível risco arritmico. Aos 6 meses, não se verificaram mais efeitos adversos nos doentes com administração de mioblastos do que nos controlos. No que diz respeito à eficácia verificou-se que, os mioblastos transferidos não aumentaram a função do ventrículo esquerdo regional ou globalmente além do visualizado nos controlos. Curiosamente, no entanto, o grupo submetido a elevada dose demonstrou diminuição nos volumes finais de diástole e sístole do ventrículo esquerdo comparativamente com o grupo placebo.

Daqui se concluiu que injeções de mioblastos como adjuvante de cirurgia coronária em doentes com cardiomiopatia isquémica e diminuição da função do ventrículo esquerdo parecem seguras mas falham na melhoria da função cardíaca ecocardiográfica no follow up aos 6 meses. (Menasche P, 2008)

Pelo contrário, o estudo CAuSMIC, um follow-up após um ano de um pequeno ensaio clínico controlado e randomizado, no qual os mioblastos esqueléticos foram injectados através

de um sistema de cateter tridimensional mostrou melhoria da função ventricular esquerda, alívio dos sintomas, e qualidade de vida. (Dib N, 2009).

Pela análise do conjunto de trabalhos, parece haver alguma concordância entre eles, (Ince H, 2004) (Gnecchi M, 2005), (Dib N, 2005), (Dib N, 2009), sobre a recuperação funcional dos corações transplantados, como indicado pela melhoria da fração de ejeção e da contractilidade regional nos segmentos com mioblastos implantados, que no entanto não foi corroborada pelo estudo MAGIC. (Menasche P, 2008)

Entretanto, uma "segunda geração" de mioblastos esqueléticos, alterada por técnicas de aprimoramento de células tem também sido colocada como alternativa. (Menasché P, 2008)

CÉLULAS ESTAMINAIS DERIVADAS DA MEDULA ÓSSEA

Na dependência da medula óssea encontram-se várias subpopulações de células diferenciadas como as células do estroma, vasculares, adipócitos, osteoblastos e osteoclastos; e também células estaminais adultas, multipotentes, como células hematopoiéticas, células mesenquimatosas e células progenitoras endoteliais, que têm sido extensivamente investigadas na sua capacidade para regenerar miocárdio. Estas células estaminais podem ser estratificadas de acordo com os marcadores de superfície que expressam e têm sido empregues nos estudos para reparação de órgãos lesados a partir de tecidos distintos dos seus órgãos de origem. (Leri A, 2005)

Um dos primeiros estudos que avaliou a capacidade regenerativa das células da medula óssea consistiu na administração de medula óssea de ratinhos machos em ratinhos fêmea com distrofia. Verificou-se que tanto o músculo esquelético como o músculo cardíaco dos ratinhos receptores, possuíam células musculares específicas contendo o cromossoma Y.

Desta forma sugeriu-se que células de medula óssea circulantes podiam ser recrutadas pelo tecido cardíaco e diferenciar-se em cardiomiócitos. (Bittner RE, 1999)

As células da medula óssea podem ser isoladas após aspiração directa de medula óssea ou podem ser obtidas da circulação periférica após mobilização de citocinas como o G-CSF (factor estimulante de colónias de granulócitos). (Ortak J, 2008). No que diz respeito ao efeito da administração de G-CSF na função cardíaca foram realizados vários trabalhos cujos resultados foram contraditórios. Na meta-análise de Zohlhofer, (Zohlhofer D, 2008) foram incluídos dez ensaios nos quais se procedeu a mobilização de células estaminais por G-CSF, com um total de 445 doentes. Observou-se melhoria da fracção de ejeção ventricular esquerda em ambos grupos: os G-CSF e placebo. No entanto, comparativamente com o grupo placebo a mobilização de células estaminais por G-CSF não proporcionou aumento significativo na fracção de ejeção. Além disso, a diferença média de redução da área de enfarte entre os grupos também não foi significativa.

Células estaminais hematopoiéticas:

As células estaminais hematopoiéticas são comumente identificadas pela expressão dos antígenos de superfície CD34 e CD133; estas células dão origem a todas as linhas hematopoiéticas. Além da sua relação primária com a hematogénese, também revelaram capacidade para se diferenciarem numa grande variedade de fenótipos, incluindo músculo esquelético, hepatócitos, células endoteliais e também cardiomiócitos. (Alessandro DA, 2010)

Num estudo de 2001 (Jackson KA, 2001), células estaminais hematopoiéticas derivadas de medula óssea foram usadas em ratinhos que sofreram oclusão da artéria coronária. As células do dador expressavam LacZ na sua constituição o que permitia a sua fácil identificação. Os autores identificaram a expressão de lacZ nos cardiomiócitos com uma

prevalência de 0,02% na região peri-enfarte. Também identificaram células endoteliais numa prevalência aproximada de 3,3% nos pequenos vasos adjacentes à região com enfarte.

Ainda nesse ano, (Orlic D, 2001) Orlic e colaboradores examinaram a capacidade regenerativa de células estaminais hematopoiéticas derivadas de medula óssea. Neste estudo, células estaminais hematopoiéticas que expressavam proteína fluorescente verde (PFV) foram injectadas na parede de miocárdio contráctil perifericamente à região de enfarte produzida por bloqueio da artéria coronária. Verificaram então que o novo miocárdio formado estava a ocupar 68% da região de enfarte do ventrículo 9 dias após transplantação, e o tecido desenvolvido continha miócitos em proliferação e estruturas vasculares organizadas em arteríolas coronárias e estruturas capilares. As células transplantadas expressavam PFV e marcadores específicos de cardiomiócitos. A nível funcional os corações de animais transplantados exibiam recuperação significativa, avaliada por ecografia e por parâmetros hemodinâmicos, quando comparado com animais controlo.

Em 2004, três estudos foram publicados a contradizer as observações relatadas no estudo de Orlic. No primeiro destes estudos, (Murry CE, 2004) células estaminais hematopoiéticas foram isoladas de ratinhos contendo o transgene que controla a expressão de lacZ ou PFV através do promotor da cadeia pesada de α -miosina cardíaca. Considerava-se que células estaminais hematopoiéticas que expressassem proteína das cadeias pesada da α -miosina como resultado da sua transdiferenciação em cardiomiócitos, deveriam também expressar lacZ ou PFV e assim seriam facilmente detectáveis nos corações dos animais receptores. As células estaminais hematopoiéticas foram injectadas no miocárdio dos animais que tiveram oclusão coronária e como tal sofreram enfarte. Os autores descreveram que não encontraram evidência da expressão do transgene específico cardíaco e não existia diferenciação cardíaca significativa de células estaminais hematopoiéticas após a sua transplantação, apesar da sua capacidade para exercer alguns efeitos benéficos. Um estudo

publicado simultaneamente (Balsam LB, 2004) também avaliou a capacidade das células estaminais hematopoiéticas isoladas de medula óssea para regenerar miocárdio enfartado e se diferenciar em cardiomiócitos. Células estaminais hematopoiéticas isoladas de ratinhos transgênicos que expressando PFV foram injectadas directamente no miocárdio isquémico em ratinhos. Células PFV+ expressam marcadores hematopoiéticos maduros CD45 e Gr-1 sem detecção da expressão de marcadores cardíacos. Eles concluíram que no microambiente do coração lesado, células estaminais hematopoiéticas adoptam apenas percursos de diferenciação tradicionais. Finalmente, no estudo de Nygren (Nygren JM, 2004) foi descrito que, tanto a população não fraccionada de células de medula óssea como a população purificada de células estaminais hematopoiéticas, apenas se enxertam transitoriamente no miocárdio enfartado. Baixos níveis de cardiomiócitos derivados de medula óssea de dador foram observados no miocárdio do hospedeiro que resultaram da fusão celular e não de transdiferenciação.

As observações descritas nos quatro estudos acima referidos conduziram a conclusões contraditórias. Ao contrário do estudo de Orlic que reportou a transdiferenciação de células estaminais hematopoiéticas derivadas de medula óssea em cardiomiócitos no tecido lesado, os outros três estudos relataram apenas eventos raros que poderiam ser explicados através de fusão celular. (Christophorou N, 2007). Assim, o grupo que publicou o estudo original usando células estaminais hematopoiéticas derivadas de medula óssea repetiu o seu trabalho (Kajstura J, 2005) usando células c-kit+ isoladas de medula óssea de ratinhos macho transgênicos que expressam na sua constituição PFV. Os investigadores reproduziram os resultados obtidos inicialmente pela demonstração de que células injectadas se diferenciaram em cardiomiócitos e vasos coronários, sem diferenciação em células hematopoiéticas e sem aparente detecção de efeito parácrino ou fusão celular.

Células Estaminais Mesenquimatosas

Células estaminais mesenquimatosas são células estaminais não-hematopoiéticas, multipotentes que possuem potencial para se diferenciar em vários tipos celulares mesodérmicos. (Picinich SC, 2007) Estas células inicialmente encontradas na medula óssea, localizam-se também no cordão umbilical, líquido amniótico, tecido adiposo entre outros, e possuem capacidade para se diferenciar em células como os adipócitos, condrócitos e também cardiomiócitos *in vitro* (Gonzales C, 2009). Possuem características que as tornaram um modelo interessante a estudar no contexto da terapia celular, nomeadamente a facilidade de isolamento; elevado potencial de proliferação; estabilidade genética; ausência de complexo major de histocompatibilidade e portanto capacidade de transplantação alogénica; e a capacidade para secreção de factores angiogénicos. (Tousoulis D, 2008)

Makino e colaboradores em 1999 (Makino S, 1999), foram quem primeiro verificou o potencial de diferenciação em cardiomiócitos das células estaminais mesenquimatosas derivadas de medula óssea de rato. A morfologia de 30% das células tratadas com 5-azacitina (agente desmetilante de DNA) alterou-se após uma semana e, ao fim de duas semanas contraíam espontaneamente e expressavam marcadores cardíacos. Em 2002, (Bittira B, 2002) um grupo de investigadores procedeu ao isolamento das células estaminais mesenquimatosas derivadas de medula óssea, seleccionadas pela presença de Lac Z e foram formados dois grupos: um de células tratadas com 5-azacitina e outro com células não tratadas. Estas células foram injectadas em miocárdio crio-lesado de ratos isogénicos. Quatro a oito semanas após o injecção verificou-se que os ratinhos submetidos à administração de células tratadas apresentavam estruturas tipo miotúbulos com expressão do marcador cardíaco troponina I-C enquanto que os ratinhos aos quais tinham sido administradas células não-tratadas, apresentavam células pouco diferenciadas, algumas das quais com outros fenótipos. Com

estes resultados sugeriu-se que o tratamento com um agente desmetilante seria necessário para a diferenciação das células mesenquimatosas em cardiomiócitos.

Outro estudo de 2002, de Shake (Shake JG, 2002), focou-se na implantação de células estaminais mesenquimatosas autólogas em modelos suínos de enfarte de miocárdio, injectadas 2 semanas após o enfarte, na área lesada. Registou-se uma significativa melhoria no grau de disfunção contráctil nos animais transplantados com redução da fragilidade da parede miocárdica. Num estudo de Bittira de 2003 (Bittira B, 2003), no qual células mesenquimatosas derivadas de medula óssea de rato marcadas com LacZ foram injectadas na veia da cauda verificou-se que estas células tiveram capacidade de se instalar na área lesada do coração e foram encontradas em concentrações elevadas na região peri-enfarte do miocárdio.

Ainda em 2002, Toma e colaboradores (Toma C, 2002) realizaram um trabalho com injeção de células estaminais mesenquimatosas derivadas de medula óssea humana no ventrículo esquerdo de ratinhos. Uma semana após a injeção apenas um número limitado de células tinha sobrevivido. Nestas verificou-se a expressão de marcadores específicos cardíacos semelhantes aos do miocárdio hospedeiro.

Num modelo suíno de enfarte do miocárdio (Amado LC, 2005) em que se procedeu à administração de células estaminais mesenquimatosas alogénicas, três dias após o enfarte, verificou-se diminuição do tamanho de enfarte e melhoria da função ventricular esquerda sem ocorrência de reacção inflamatória devido a rejeição. Apesar de a retenção de células estaminais mesenquimatosas diminuir ao longo do tempo e não existir evidência da diferenciação em cardiomiócitos, foi evidente o reaparecimento de tecido miocárdico e a melhoria da função ventricular regional o que sugere que as células estaminais mesenquimatosas estimulam mecanismos de reparação endógena. Alguns estudos sugeriram

ainda a melhoria da sobrevivência destas células através da sua transferência com o gene de codificação Akt (Mangi AA, 2003) ou pela administração do factor-1 de crescimento insulina-like (Davis ME, 2006) ou ainda pela modificação das células estaminais mesenquimatosas através de vector heme-oxigenase regulador de hipóxia permitindo melhoria na resposta à terapêutica celular. (Tang YL, 2005)

Num estudo clínico com infusão intracoronária de células mesenquimatosas derivadas de medula óssea autóloga em doentes que sofreram enfarte do miocárdio, verificou-se melhoria funcional da parede e 14% de melhoria na fracção de ejeção quando comparado com doentes controlo injectados com solução salina. (Chen SL, 2004)

Sobre as células estaminais mesenquimatosas derivadas de medula óssea é descrita a capacidade de instalação nas áreas cardíacas sujeitas a lesão resultante de enfarte do miocárdio e o potencial para transdiferenciação em cardiomiócitos *in vivo*. (Toma C, 2002) Outra das suas vantagens é o facto de serem células autólogas o que torna desnecessário o uso de terapia imunossupressora. Contudo, o tempo necessário para que as células estaminais mesenquimatosas proliferem em cultura de forma suficiente para serem usadas na transplantação é longo comparativamente com o pouco tempo que os doentes têm para a sua administração no pós enfarte. (Christophorou N, 2007)

Células Progenitoras Endoteliais

As células progenitoras endoteliais circulantes ou derivadas de medula óssea são precursoras funcionais de células endoteliais que expressam CD133, CD34 e outros marcadores de superfície de células endoteliais como Flk-1. (Tousoulis D, 2008) Possuem propriedades semelhantes aos angioblastos embrionários em diferentes estadios de maturação, com importante papel na manutenção da integridade endotelial e neovascularização pós-natal (Asahara T, 1997).

Estas células podem circular no sangue periférico ou ser incorporadas em regiões de neovascularização activa, isquémia dos membros ou miocárdio isquémico. Evidências sugerem que as células progenitoras endoteliais participam não apenas no processo de vasculogénese substituindo as perdas de células endoteliais, mas também na endotelização de enxertos. (Tousoulis D, 2008) Existem evidências de que a disponibilidade e compromisso das células progenitoras endoteliais ocorre na presença de múltiplas condições cardiovasculares, incluindo doença coronária e insuficiência cardíaca. (Pelliccia F, 2009)

Num trabalho experimental, em 2001, usaram-se ratinhos modelo com enfarte do miocárdio aos quais se administraram células progenitoras endoteliais por via intravenosa; verificou-se neovascularização do tecido isquémico com redução da apoptose nos animais tratados. (Kocher AA, 2001). Já em 2004, Schuster e seus colaboradores procederam a um estudo experimental tendo injectado células progenitoras endoteliais localmente no miocárdio lesado donde resultou também proliferação de miócitos e de estruturas vasculares. Considerou-se então que o mecanismo de acção destas células é mediado pela neovascularização e formação de vasos de grande calibre que protegem os cardiomiócitos hipertrofiados da apoptose (Schuster MD, 2004). Em 2005, Erbs realizou um estudo clínico randomizado onde se procedeu à infusão intracoronária de células progenitoras endoteliais antes da recanalização da oclusão total crónica. Verificou-se melhoria da função ventricular esquerda, da perfusão miocárdica e redução da área de enfarte. (Erbs S, 2005)

Demonstrou-se que os níveis de células progenitoras endoteliais CD34 circulantes estão elevados em doentes com lesão endotelial, lesão vascular e enfarte agudo do miocárdio o que implica um aumento na reciclagem de células endoteliais. (Tousoulis D, 2008). Por outro lado, baixo número destas células progenitoras foi correlacionado com baixa função vascular (Hill JM, 2003) constituindo assim um marcador celular que prediz de forma independente o prognóstico de doentes com doença cardiovascular.

Ensaio Clínicos

Nos estudos iniciais a terapia celular com células mononucleares derivadas da medula óssea revelou segurança e viabilidade com possíveis efeitos favoráveis na função ventricular esquerda, perfusão miocárdica e volume telesistólico ventricular esquerdo.

Estes resultados conduziram à realização de vários ensaios clínicos, caracterizados por metodologias heterogêneas, ausência de standartização, e falta de uniformidade no que diz respeito ao objectivo primário e aos métodos de medida utilizados. Embora muitos estudos tenham revelado benefícios com a utilização desta terapia, noutros obtiveram-se resultados díspares. (Gersh B, 2009)

Em 2004, foi apresentado o estudo BOOST (Wollert KC, 2004) um estudo randomizado com doentes submetidos a intervenção coronária percutânea e transferência de células de medula óssea autólogas. Os autores verificaram que seis meses após o transplante, a transferência de células tinha melhorado a função ventricular esquerda sistólica, que aumentou 6,7%, num segmento miocárdico adjacente à área de enfarte quando comparado com os que apenas receberam intervenção coronária percutânea onde se verificou aumento de 0,7%. Contudo, no follow-up aos 18 meses já não havia mais diferença na fracção de ejeção ventricular esquerda entre os dois grupos devido a aumento no grupo placebo o que sugere que as células derivadas de medula óssea apenas aceleram a recuperação da fracção de ejeção. Posteriormente, no follow-up aos 5 anos, confirmou-se esta perda de significância estatística na melhoria da fracção de ejeção. (Meyer GP, 2009)

No estudo REPAIR-AMI de 2006, um estudo multicêntrico, duplamente cego, randomizado, controlado com placebo que incluiu 204 pacientes, revelou que a infusão intramiocárdica de células derivadas de medula óssea três a sete dias após o enfarte resultou no aumento da função do ventrículo esquerdo aos 4 meses e redução significativa da

mortalidade, recorrência do enfarte e da necessidade de qualquer procedimento de revascularização a um ano.

Num outro estudo de 2006, (Schachinger V, 2006) doentes com enfarte agudo do miocárdio receberam infusão intracoronária de células de medula óssea ou placebo, em média 3 a 7 dias após terapia de reperfusão. Os autores registaram uma pequena, mas significativa, melhoria da fracção de ejeção ventricular esquerda global (5,5% +/- 7,3% vs 3,0% +/- 6,5%) aos quatro meses pós terapia. Também registaram redução nos casos fatais previstos, na recorrência de enfarte do miocárdio e em qualquer procedimento de revascularização a 1 ano pós-terapia.

Também o estudo BALANCE (Yousef M, 2009), demonstrou benefícios clínicos após 5 anos da administração intracoronária de células mononucleares derivadas de medula óssea em doentes com enfarte agudo do miocárdio, e confirmou a estabilidade do efeito da terapia celular na contractilidade, parâmetros hemodinâmicos, geometria do ventrículo esquerdo e aumento na capacidade de exercício.

No entanto, outros estudos publicados sobre o uso de células de medula óssea no tratamento de enfarte do miocárdio geraram controvérsia sobre o papel clínico potencial desta nova terapia. No estudo ASTAMI, (Lunde K, 2006), desenvolvido na mesma altura que o REPAIR-AMI, doentes com enfarte agudo miocárdio da parede anterior com supradesnivelamento do segmento ST foram tratados com intervenção coronária percutânea e injeção de células de medula óssea autólogas, intracoronariamente. Quando comparados com os doentes controlo (que receberam apenas tratamento por via percutânea) exibiam um aumento de 0,6% na fracção de ejeção ventricular esquerda numa emissão fotónica única da tomografia computadorizada, uma melhoria de 0,6% na ecocardiografia e um decréscimo de 3% na ressonância magnética. Os autores concluíram que não haviam efeitos significativos da

injecção de células de medula óssea na função ventricular global. Uma explicação avançada para justificar as diferenças entre os estudos REPAIR-AMI e ASTAMI diz respeito aos diferentes métodos de isolamento e protocolos de armazenamento utilizados. (Seeger FH, 2007)

Janssens e colaboradores no seu estudo controlado por placebo, randomizado duplamente cego com 67 doentes, onde procederam à administração destas células um dia após a intervenção coronária percutânea, também não encontraram melhoria na fracção de ejeção global após terapia celular com células mononucleares injectadas intracoronariamente, embora considerem que esta terapia pode afectar favoravelmente a remodelação miocárdica. (Janssens S, 2006)

Já em 2010 Wohrle (Wohrle J, 2010), descreveu os seus achados em doentes com enfarte agudo do miocárdio, tratados com células mononucleares derivadas de medula óssea 5 a 7 dias após angioplastia. Quarenta e dois doentes foram randomizados, neste estudo duplamente cego e controlado por placebo. Nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos aos 1, 3 e 6 meses na fracção de ejeção ventricular, tamanho de enfarte, dimensões do ventrículo esquerdo nem nos efeitos adversos major. O estudo foi revogado porque não se verificaram efeitos benéficos da terapia celular nas análises preliminares. De notar que o tempo entre o aparecimento de sintomas e a administração de células (média 20,8 +/- 12h) foi superior àquele utilizado em estudos anteriores. Este facto associado ao baixo número de doentes em ambos aos grupos e uma não divisão dos géneros, torna estes resultados difíceis de interpretar. Os resultados dos actuais e futuros ensaios clínicos deverão ter determinado o tempo óptimo para a terapia celular nos doentes pós enfarte do miocárdio.

O estudo REGENT (2009) investigou a eficácia das subpopulações de células da medula óssea. Este estudo foi desenhado para avaliar a eficácia de uma subpopulação de

células progenitoras de medula óssea autólogas seleccionadas pela presença dos marcadores de superfície CD34 e CXCR4. Duzentos doentes com enfarte agudo do miocárdio e submetidos a intervenção coronária percutânea foram inscritos em cinco centros da Polónia. Os doentes foram aleatoriamente distribuídos para receber células de medula óssea autólogas ou células desmarcadas e comparados com um grupo que não tinha sido submetido a intervenção percutânea coronária. Os grupos tratados foram distribuídos e as células foram administradas na artéria relacionada com o enfarte. No follow-up aos seis meses, o grupo com tratamento celular não obteve melhoria significativa da fracção de ejeção do ventrículo esquerdo, no entanto, nos doentes com fracção de ejeção ventricular esquerda inferior a 37%, verificou-se uma tendência de melhoria estatística que não se verificou no grupo controlo. Houve uma melhoria absoluta na fracção de ejeção ventricular esquerda de 3% em ambos os grupos tratados com células enquanto que no grupo controlo não ocorreu alteração. Contudo, este estudo não é cego e existiu um largo abandono pelos doentes sobretudo no grupo controlo. Estes investigadores também encontraram uma tendência para a necessidade de revascularização do vaso-alvo em ambos os grupos embora não estatisticamente significativa. (Tendera M., 2009)

Nos últimos anos também foram publicadas meta-análises sobre a terapêutica com células derivadas da medula óssea no enfarte do miocárdio. Dois desses trabalhos demonstraram que a administração intracoronária das células mononucleares derivadas de medula óssea após enfarte agudo do miocárdio resultava em melhoria significativa da fracção de ejeção do ventrículo esquerdo, diminuição do volume telesistólico ventricular e diminuição da área de enfarte (Lipinski MJ, 2007) (Martin-Rendon E, 2008). A meta-análise realizada por Abdel-Latif (Abdel-Latif A, 2007) revelou também efeito favorável da terapia celular. No entanto é de ressaltar que avaliava uma população heterogénea com casos de enfarte agudo do miocárdio e também de doença coronária crónica.

Em 2009, Singht e colaboradores publicaram mais uma meta-análise sobre sete estudos clínicos randomizados nomeadamente, Wollert KC, 2004; Chen SL, 2004; Janssens S, 2006; Lunde K, 2006; Schachinger V, 2006; nos quais se procedeu à administração intracoronária de células derivadas de medula óssea, após o sucesso da intervenção percutânea coronária em doentes com enfarte agudo do miocárdio. Esta análise resultou em 516 doentes e, o grupo submetido a terapia celular obteve melhoria estatisticamente significativa da fracção de ejeção ventricular esquerda aos 3 a 6 meses comparativamente com o grupo controlo (6,1% vs 2,7%). (Singh S., 2009)

Numa segunda meta-análise de 2009, Zhang e colaboradores, (Zhang S, 2009) agruparam os dados de sete estudos controlados e randomizados nos quais se utilizaram células derivadas de medula óssea, e examinaram o efeito do tempo da administração na eficácia das células. Nos doentes tratados com células 4 a 7 dias após a intervenção percutânea coronária de emergência, obteve-se maior aumento na fracção de ejeção e volume sistólico final comparativamente com os doentes tratados ao fim de 24 horas. O tempo de administração das células também parece ter impacto nos efeitos adversos, o grupo com tratamento tardio teve significativamente menos efeitos adversos, incluindo a necessidade de revascularização e recorrência de enfarte do miocárdio. Tal benefício não foi observado no grupo com tratamento precoce. Segundo os próprios autores ainda não se percebeu o motivo para justificar estas diferenças embora se presume que o mesmo se deva às diferenças no microambiente bioquímico do miocárdio provocadas pelo processo inflamatório

As percepções dos resultados desta primeira fase de estudos clínicos são contraditórias. Por um lado, a maioria das células transplantadas desaparece do miocárdio numa semana, e a ausência de provas concretas de revitalização do miocárdio é uma fonte de decepção. Por outro lado, estes dados fornecem-nos oportunidades para investigar mais profundamente os mecanismos dos possíveis benefícios e desenvolver estratégias que

reforcem a sobrevivência e retenção das células. A tendência de melhoria em relação à função ventricular esquerda, perfusão e tamanho da zona de enfarte, além de aparentar segurança é animadora e gerou novas questões para a próxima fase de ensaios clínicos. Talvez o optimismo desenfreado inicial tenha dado lugar a um espírito mais realista e uma consciência das múltiplas questões que deverão ser abordados (Gersh B, 2009).

Poucos ensaios clínicos randomizados com células estaminais derivadas de medula óssea foram realizados em situações de doença arterial coronária crónica e insuficiência cardíaca crónica. No entanto, os resultados são semelhantes aos pacientes com enfarte agudo do miocárdio, mostrando uma melhoria na função ventricular regional e global, perfusão e redução dos sintomas de angina de peito (Losordo DW, 2007).

A utilização de células progenitoras derivadas de medula óssea e sua capacidade para regenerar miocárdio enfartado é bastante controversa para inferir conclusões sobre as evidências das diferentes observações e conclusões descritas nos estudos mencionados. Isto quer apenas dizer que mais estudos são necessários para determinar inequivocamente a real capacidade cardíaca das células estaminais derivadas de medula óssea.

CÉLULAS ESTAMINAIS DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO

O tecido adiposo é formado por adipócitos maduros e por uma fracção vascular de estroma. Incluídas nesta fracção encontram-se populações de células vasculares e de células tipo fibroblastos, recentemente descritas como células estaminais multipotentes (Tousoulis D, 2008) e identificadas pela expressão de CD44 e CD105. (Bai X., 2010)

As células estaminais derivadas do tecido adiposo, que compartilham propriedades com as células mesenquimatosas derivadas da medula óssea tais como o imunofenótipo da

superfície celular, sendo positivo para CD10, CD13, CD90, e CD106; e também a sua capacidade de diferenciação em múltiplas linhas celulares, (Hong S., 2010) tornaram-se uma fonte celular atraente para a aplicação clínica na reparação de miocárdio atingido pela isquémia. Entre as determinantes vantajosas do tecido adiposo encontram-se a abundância deste tecido na maioria dos pacientes, a facilidade de aceder ao mesmo através de lipoaspiração minimamente invasiva (Bai X., 2010) ou abdominoplastia electiva (Alessandro DA, 2010), o diminuto espaço de tempo necessário para preparar a amostra a ser administrada, (Hong S., 2010) a elevada densidade de células estaminais no tecido adiposo (5%) quando comparada com a medula óssea (0,01%) (Fraser JK., 2006), e a capacidade de expansão *in vitro* sem necessidade de 5-azacitidina. (Tousoulis D, 2008)

Bai e colaboradores procederam à administração na zona peri-enfarte de grupos de ratinhos 1) células estaminais derivadas de tecido adiposo humano recém-isoladas, 2) o mesmo tipo de células mas após cultura 3) placebo. Após quatro semanas verificaram que tinha havido diminuição da função cardíaca nos ratinhos que receberam placebo enquanto que nos ratinhos submetidos à administração de células não só não se verificou deterioração da função cardíaca como o volume telesistólico do ventrículo esquerdo era significativamente inferior ao dos ratinhos que receberam placebo. (Bai X., 2010) Também os estudos de Cai e Zhu demonstraram resultados semelhantes. (Cai L., 2009) (Zhu XY, 2009)

Num outro trabalho, procedeu-se à indução de enfarte do miocárdio agudo transmural em modelos porcinos. De seguida administrou-se solução controlo ou células estaminais derivadas de tecido adiposo previamente cultivadas. Após quatro semanas procedeu-se a avaliação cintigráfica tendo-se verificado que a fracção de ejeção ventricular tinha aumentado significativamente ($11,39 \pm 4,62\%$) quando comparado com o controlo ($1,95 \pm 4,7\%$); além disso, a espessura da parede do ventrículo esquerdo era significativamente maior

no grupo que recebeu a terapia celular com células estaminais derivadas de tecido adiposo. (Valina C., 2007)

Os mecanismos subjacentes ao efeito benéfico destas células na regeneração do miocárdio não foram ainda totalmente compreendidos. Existem evidências crescentes que indicam que o transplante das células melhora a função cardíaca através da sua diferenciação em cardiomiócitos, identificados *in vitro* pela expressão de marcadores como a troponina I e a miosina de cadeia leve, e por estudos electrofisiológicos que revelaram a presença de canais de cálcio e potássio dependentes da voltagem. (Bai X., 2007) Também a diferenciação em células vasculares foi demonstrada nomeadamente pelo estudo de Ning no qual ocorreu diferenciação de células estaminais derivadas de tecido adiposo em células endoteliais identificadas pela presença de CD31, factor de von Willebrand e sintetase de oxido nítrico endotelial. (Ning H., 2009) Estes dados foram sustentados pelo estudo *in vivo* de Bai que identificou as células também pela presença dos marcadores conexina 43 e troponina I, no caso das células que se diferenciaram na linhagem cardiomiogénica, e factor de Von Willebrand e actina do músculo liso na diferenciação em células vasculares. (Bai X., 2010) Estes dados foram contrariados pelo trabalho de Strem que administrou células estaminais derivadas de tecido adiposo em ratinhos e, após 2 semanas, verificou que as células expressavam marcadores cardíacos, mas não marcadores de células endoteliais como o CD31 ou o factor de von Willebrand. (Strem BM., 2005) Também no trabalho de Rigol se verificou que após administração das células estaminais em modelos porcinos de enfarte do miocárdio ocorria a presença de células vasculares mas não se identificava a presença de cardiomiócitos. (Rigol M., 2010) Estas discrepâncias de resultados poderão dever-se aos diferentes procedimentos de isolamento das células, de cultura, de vias de administração, de modelos animais e mesmo aos limites da análise histológica.

Alguns trabalhos também sugerem que a secreção de factores parácrinos também poderá contribuir para o mecanismo de acção desta terapêutica, nomeadamente através de IGF-1 e VEGF, que se revelaram capazes de melhorar a angiogénese e de reduzir as taxas de apoptose celular (69,5% pelo IGF-1 e 34,2% pelo VEGF). (Sadat S., 2007)

É também importante notar que não há descrição do aparecimento de arritmias ou tumorigénese em qualquer dos estudos realizados com estas células. (Bai X., 2010)

Com base nos dados já conhecidos de que as células estaminais derivadas de tecido adiposo poderão melhorar significativamente a função do músculo cardíaco, estudos clínicos foram iniciados. O primeiro ensaio clínico, APOLLO (The Adipose-Derived Stem Cells in the Treatment of Patients with ST-Elevation Myocardial Infarction) trata-se de um estudo fase I, prospectivo, duplamente-cego, randomizado, controlado com placebo, que pretende avaliar a segurança e a eficácia das células estaminais derivadas de tecido adiposo. O trabalho incluiu 14 doentes aos quais foi administrada terapia celular ou placebo 24 horas após terapia coronária percutânea, aguarda-se a publicação dos resultados. (Duckers HJ., 2009) Um segundo ensaio clínico fase I – PRECISE (A Randomized Clinical Trial of Adipose-Derived Stem Cells in Treatment of Non Revascularizable Ischemic Myocardium) foi concebido para testar a segurança e a viabilidade destas células em doentes com patologia isquémica que não são candidatos a terapia de revascularização, também se aguarda a publicação dos resultados. (Alessandro DA, 2010)

As células estaminais derivadas do tecido adiposo assumem-se assim como potencial fonte na terapia celular de doenças cardiovasculares devido à sua capacidade de aumentar o crescimento vascular e também de reparar os tecidos; além disso, podem ser rapidamente isoladas em grandes quantidades e ser obtidas por liposucção minimamente invasiva. (Hong S., 2010) No entanto, a conclusão dos ensaios clínicos e a delineação de estudos capazes de responder com clareza a questões como o seu mecanismo de acção, o método ideal para

selecção das células (recém isoladas versus cultura), o efeito das várias vias de administração e a determinação do seu potencial de actuação nos doentes de acordo factores como a idade ou comorbilidades são necessários para clarificar o papel destas células no campo da terapia celular. (Bai X., 2010)

CÉLULAS PROGENITORAS CARDÍACAS

Tradicionalmente o coração foi considerado como um órgão estático, incapaz de reparar qualquer espécie de dano. De acordo com este paradigma, o número de miócitos estaria estabelecido à nascença e esta população de miócitos já diferenciados seria insubstituível durante a vida do órgão e do organismo, deste modo a idade dos miócitos estaria ditada pela idade do organismo. De acordo com este conceito, o coração não teria qualquer mecanismo de reserva que compensasse a morte celular e o desgaste resultante dos fenómenos fisiológicos. (Leri A, 2005)

Evidências recentes sugeriram que há um grupo de células estaminais cardíacas residentes no miocárdio (Anversa P, 2002). Estas células estaminais poderão representar a melhor fonte de células progenitoras para gerar novo miocárdio. A sua origem pensa-se que sejam os cardioblastos durante a embriogénese, embora a análise de órgãos pós-transplante indique a possibilidade da existência de uma fonte extra cardíaca de células estaminais que poderá repôr o pool de células estaminais cardíacas. (Leri A, 2005). O seu actual papel na homeostase miocárdica é desconhecido e, apesar de possuírem elevado potencial proliferativo este é incapaz de compensar lesões extensas como as verificadas no enfarte agudo do miocárdio. (Bearzi C, 2007) (Gersh B, 2009).

Não se identificaram ainda marcadores de superfície específicos para identificar as células estaminais cardíacas no coração do adulto como tal, marcadores de superfície que são

usados para reconhecer populações de células estaminais noutros tecidos, foram também usados no tecido cardíaco. Os marcadores de superfície c-kit (receptor tirosina-cinase), e Sca-1 (antígeno 1 de células estaminais) foram inicialmente demonstrados em células estaminais hematopoiéticas na medula óssea e posteriormente identificados noutras células como mastócitos, timócitos, melanócitos etc. O potencial cardiogénico de células estaminais hematopoiéticas c-kit⁺ foi bastante investigado na sua capacidade de mediar a cardiomiogénese.

A primeira descrição de células progenitoras residentes no coração e positivas para c-kit ocorreu em 2003 por Beltrami e seus colaboradores que isolaram células c-kit⁺, Lin⁻ e CD45⁻ com potencial marcado de diferenciação em todas as linhagens cardíacas e capacidade de regeneração miocárdica (Beltrami AP, 2003). Estas células estaminais cardíacas têm propriedades clonogénicas, de multipotência e de auto-renovação e podem diferenciar-se *in vitro* e expressar marcadores de cardiomiócitos maduros como actinina α -cardíaca, miosina cardíaca, desmina e conexina 43 (Beltrami AP, 2003) (Bearzi C, 2007). Quando injectadas intracoronariamente ou directamente no miocárdio de rato que sofreu enfarte, estas células reconstituíram cerca de 70% do miocárdio, melhoraram a função cardíaca e permitiram também restituição dos vasos sanguíneos (Dawn B, 2005) (Tillmanns J, 2008). Verificou-se ainda que a eficácia destas células melhorou, aumentando a sua resposta angiogénica, quando se procedeu a administração prévia de factor de crescimento insulina-like e factor de crescimento hepatocitário em ratinhos com enfarte do miocárdio. (Tillmanns J, 2008). Apesar da sua aparente utilidade terapêutica, existem ainda ressalvas em relação às células progenitoras cardíacas c-kit⁺ uma vez que são muito raras no miocárdio e, os seus derivados cardiomiócitos são relativamente imaturos no que diz respeito à sua ultra-estrutura e manejo de Ca²⁺. (Bollini S, 2010)

Outros estudos basearam-se na identificação de células estaminais cardíacas de rato adulto com Sca-1, um membro da família de Ly-6. A expressão de Sca-1 foi inicialmente identificada em células estaminais hematopoiéticas murinas e posteriormente também em populações de células progenitoras do sistema esquelético, glândula mamária, próstata, fígado, etc. Uma população de células estaminais cardíacas não hematopoiéticas positiva para Sca-1 foi também isolada no coração de rato adulto. Estas células expressam marcadores cardíacos precoces como GATA4 e MEF2C. Apesar de não poderem diferenciar-se espontaneamente em cardiomiócitos, uma pequena fracção pôde diferenciar-se em cardiomiócitos quando estimulada por agentes de demetilação de DNA como a 5-azacitidina (Oh H, 2003). Num outro estudo *in vitro*, células progenitoras cardíacas Sca1+, c-kit+, CD45+ e CD34+, foram estimuladas com ocitocina o que resultou em geração de cardiomiócitos pulsáteis. (Matsuura K, 2004) Após transplantação as células iniciaram a produção de proteínas cardíacas funcionais. Foram isoladas 2 semanas após a sua injeção e nessa altura verificou-se a fusão de células do dador com as do hospedeiro em 50% das células identificadas e diferenciação das restantes 50% em cardiomiócitos (Oh H, 2003) (Matsuura K, 2004) Células estaminais cardíacas semelhantes a Sca-1 foram isoladas de ratinhos e foi demonstrada a sua diferenciação em cardiomiócitos maduros funcionais (Rosenblatt-Velin N, 2005). Quando injectadas intravenosamente estas células alojaram-se no coração e contribuíram para a regeneração do tecido cardíaco. Neste estudo, revelou-se que o factor-2 de crescimento fibroblástico detinha um papel importante na regulação do processo de diferenciação cardiogénico. Assim, por trás do efeito angiogénico, o factor-2 de crescimento de fibroblasto parece participar na auto-regeneração do coração pela aceleração da mobilização e diferenciação de células estaminais residentes na reparação cardíaca. (Gonzales C, 2009)

Populações que expressam Abcg2 foram identificadas nos ratinhos adultos tendo-se verificado a sua diferenciação em células α -actinina positivas quando cultivadas com cardiomiócitos adultos (Martin CM, 2004). Estas células também expressam antigene de células estaminais Sca-1 e possuem capacidade para se diferenciar em cardiomiócitos (Pfister O, 2005).

Através da expressão de SSEA1 (stage-specific embryonic antigen 1) células estaminais cardíacas multipotentes foram isoladas do coração de ratinhos neonatais e adultos. Estas células podem expandir-se *in vitro* e dar origem a cardiomiócitos, células do músculo liso e células endoteliais. Quando injectadas em miocárdio enfartado, induziram melhoria funcional e atenuação da remodelação cardíaca. Sugeriu-se que as células progenitoras cardíacas SSEA-1+ representam uma população de células estaminais cardíacas primitivas tipo-embrionárias que pode dar origem a células c-kit+, Sca-1+, Abcg2+ em estados avançados de diferenciação. (Ott HC, 2007)

A presença de células progenitoras cardíacas em coração de roedores estimulou os investigadores a pesquisar populações destas células no coração humano. Estudos com doentes pós-transplantados e doentes com estenose aórtica permitiram identificar uma população endógena cardíaca c-kit positiva (Urbanek K, 2003). Estas células não expressam marcadores de células estaminais hematopoiéticas nem de células progenitoras endoteliais, o que sugeriu que podiam corresponder à expressão de progenitores com expressão de c-kit antes descrita em modelos animais. Mais recentemente descreveu-se o isolamento e propagação de células com expressão de c-kit em peças cirúrgicas humanas (Bearzi C, 2007).

Contudo, outro grupo de investigadores não foi capaz de identificar progenitores com expressão de c-kit em biópsias endomiocárdicas de enxertos cardíacos e de biópsias dos apêndices auriculares direitos colhidas durante cirurgia de by-pass (Pouly J, 2008). Baseados

na presença de triptase e ausência de expressão de Isl1 e Nkx2.5 a população de células com expressão de c-kit correspondia a mastócitos. Estes estudos forneceram advertências quanto à identificação de células cardíacas marcadas com c-kit.

Num outro estudo, células estaminais cardíacas isoladas a partir de biópsias de aurículas e ventrículos, mostraram ter capacidade de auto-organização em cardiosferas que correspondem a populações misturadas de células com expressão predominante de c-kit mas que também revelam expressão de marcadores progenitores endoteliais como CD34. Após dissociação em células individuais elas foram cultivadas com cardiomiócitos de ratinhos neonatais e diferenciaram-se em cardiomiócitos pulsáteis. (Messina E, 2004) Num outro estudo, células derivadas de cardiosfera foram isoladas de biópsias endomiocárdicas de ventrículo direito de adultos doente, cultivadas e revelaram elevado potencial enquanto fonte de células estaminais cardíacas autólogas (Messina E, 2004) (Smith RR, 2007) Estas células demonstraram potencial cardiogénico quer *in vitro* quer *in vivo*. A vantagem das cardiosferas humanas é que as células progenitoras cardíacas podem ser rapidamente expandidas a partir de um tecido humano; no entanto as cardiosferas podem conter uma proporção de cardiomiócitos diferenciados que podem justificar a pulsatilidade espontânea (Andersen DC, 2009). Estes resultados exigem a caracterização das cardiosferas antes de serem usadas como fonte de células estaminais cardíacas nos estudos clínicos. (Bollini S, 2010)

Alguns investigadores procederam ao isolamento de células estaminais cardíacas a partir de corações adultos e fetais com base na utilização directa de anticorpos Sca1 em ratinho (Goumans M, 2007). Apesar de o antígeno Sca 1 não ser expresso em humanos, os autores isolaram uma fracção de células que demonstraram potencial cardiogénico. Se estas células representam ou não uma fonte adequada de células precursoras para terapia celular permanece incerto.

O estudo clínico SCIPIO (Cardiac Stem Cell Infusion in Patients with Ischemic Cardiomyopathy) é um estudo de fase 1 em curso, que avalia estas células em doentes com cardiomiopatia isquémica. Vinte doentes com fracção de ejeção ventricular esquerda inferior a 40% e com área de acinesia serão comparados com um grupo controlo. Os objectivos primários passam pela avaliação da capacidade de isolar e proliferar as células progenitoras cardíacas obtidas de tecido auricular e também verificar a incidência de efeitos adversos. Além disso também se pretende avaliar a alteração da fracção de ejeção ventricular e as alterações da área de acinésia. (Alessandro DA, 2010)

Recentemente foram identificados progenitores derivados do epicárdio (Cai CL, 2008) (Zhou B, 2008) tendo-se demonstrado que populações epicárdicas possuem capacidade de produzir células de músculo liso, cardiomiócitos e células endoteliais durante o desenvolvimento. Assim, desde que estas células ainda estejam presentes no coração pós-natal representam uma fonte de células progenitoras.

As populações de células progenitoras cardíacas adultas descritas nos estudos mencionados são fenotipicamente diferentes e apresentam expressão de marcadores variável. Se estas células estaminais cardíacas indiferenciadas representam subpopulações distintas de um grupo major de células estaminais cardíacas ou, se representam diferentes linhagens capazes de se diferenciar em cardiomiócitos ainda terá de ser determinado. Também a eficácia de um tipo de células progenitoras cardíacas específico comparativamente com a eficácia de mistura de células, incluindo Sca-1+, islet-1, cardioesferas etc permanece por esclarecer. (Gersh B, 2009).

CÉLULAS PLURIPOTENTES INDUZIDAS

Células estaminais pluripotentes induzidas são produzidas através de reprogramação de células somáticas, como os fibroblastos, usando elevada expressão de factores de células estaminais como Oct4, Sox2, c-myc e Klf4. Estas células possuem as mesmas características que as células estaminais embrionárias no que diz respeito à morfologia, marcadores da superfície celular e perfis de expressão genética. A sua grande vantagem comparativamente com as células estaminais embrionárias é a possibilidade de gerar células estaminais multipotentes específicas do doente, evitando assim o risco de rejeição imunitária. Além disso, células estaminais pluripotentes induzidas podem ser mantidas durante vários meses em cultura, possuem capacidade para se diferenciar em células das três camadas germinativas e podem originar cardiomiócitos sem que seja necessário o recurso a embriões. Infelizmente, as preocupações sobre a formação de teratoma permanecem relativamente a estas células e, a possível formação de outros tumores devido à integração no vector não pode ser excluída. Células estaminais pluripotentes sem integração de vector foram recentemente geradas a partir de células somáticas. Outro problema subjacente a este tipo de células é o facto de este procedimento ser demorado o que poderá impedir a sua utilização no tratamento do enfarte agudo do miocárdio; uma possível solução passará pela formação de bancos de células estaminais induzidas e células estaminais embrionárias de forma a ultrapassar a problemática da incompatibilidade entre células e receptores. (Gonzales C, 2009) (Gersh B, 2009). No estudo de Zhang concluiu-se que células pluripotentes induzidas humanas se podem diferenciar em cardiomiócitos funcionais e como tal são uma opção viável como fonte de células autólogas para reparação cardíaca e uma poderosa ferramenta de pesquisa cardiovascular. (Zhang J, 2009)

Conclusão

A terapia celular no tratamento da miocardiopatia isquémica tornou-se um conceito entusiasmante quer para cientistas quer para o próprio público. Desde a sua concepção inicial, há cerca de uma década atrás, um grande variedade de tipos de células têm sido utilizadas e as suas capacidades para melhorar a função cardíaca examinadas. Estudos pré-clínicos demonstraram que células estaminais transplantadas possuem capacidade para repor parcialmente o miocárdio lesado e prevenir a remodelagem patológica associada à insuficiência cardíaca pós-isquémia. As descrições actuais sobre a transdiferenciação celular em miócitos foram decepcionantes, mas isso não significa que o objectivo se tenha tornado irrealista. Esta área de estudos ainda se encontra numa fase inicial de conhecimento e, o uso de diferentes tipos celulares dirigido pelo desenvolvimento e melhor compreensão dos mecanismos ainda poderá dar resultados. É possível que o processo ineficiente de transdiferenciação possa ser aprimorado por métodos direccionados para a célula.

A transposição da terapia celular cardíaca para a área clínica é um objectivo intrigante, desafiador e uma meta de um percurso em exploração. Ensaios clínicos foram já descritos para alguns dos tipos de células estaminais revistos neste trabalho e que revelaram dados promissores na recuperação funcional cardíaca.

No entanto, ainda existem muitas questões que precisam ser abordadas antes que esta tecnologia possa ser devidamente instituída numa grande população, nomeadamente: qual o tipo de célula com o melhor potencial terapêutico?; qual o número ideal de células a transplantar?; qual a via ideal de administração?; qual a sobrevivência das células enxertadas a longo prazo?; quais os tempos ideais para proceder à aquisição, cultura e transplante das células?; qual a garantia sobre a pureza celular?; que imunossuppressores utilizar no caso de células alogénicas?; será que a etiologia do enfarte influencia o sucesso da terapia?;

De referir ainda que as células estaminais embrionárias que suscitaram enorme entusiasmo, se associam a problemas éticos e revelaram potencial teratogénico e imunoreactividade que limitam a sua utilização.

Talvez a chave para o futuro da terapia com células estaminais passe pela compreensão dos substratos de genómica e proteómica que modificam os múltiplos sistemas de sinalização e homing envolvidos na transformação da célula pluripotente em miócito.

Medicina regenerativa e células estaminais parecem ser o novo futuro para o tratamento da doença cardíaca e o seu papel pode assegurar uma boa qualidade de vida para os milhões de doentes. Importa, pois, prosseguir a investigação não fechando portas que poderão vir a revelar-se, num futuro que se deseja próximo.

*“In a time of drastic change, it is the learners who inherit the future.
The learned find themselves equipped to live in a world that no longer exists.”
(Eric Hoffer 1973)*

Bibliografia

Abdel-Latif A, Bolli R, Tleyjeh IM, Montori MD, Perin EC, et al. 2007. Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and metaanalysis. *Arch Intern Med* 167, pp. 989-997.

Alessandro DA, Michler RE., 2010. Current and future status of stem cell therapy in heart failure. *Cur Treat Opt Card Med* 12, pp. 614-627.

Amado LC, Saliaris AP, Schuleri KH, St John M, Xie JS., 2005. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, pp. 11474-11479.

Andersen DC, Andersen P, Schneider M, Jensen HB, Sheikh SP., 2009. Murine Cardiospheres are not a source of stem cells with cardiomyogenic potential. *Stem Cells* 27, pp. 1571–1581.

Anversa P, Nadal-Ginard B., 2002. Myocyte renewal and ventricular remodelling. *Nature* 415, pp. 240-243.

Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, Van der Zee R, Li T., 1997. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275, pp. 964-967.

Bai X., Alt E., 2010. Myocardial regeneration potential of adipose tissue-derived stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 401, pp. 321-326.

Bai X., Pinkernell K., Song YH., Nabzdyk C., Reiser J., Alt E., 2007. Genetically selected stem cells from human adipose tissue express cardiac markers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353, pp. 665–671.

Bai X., Yan Y., Song YH., Seidensticker M., Rabinovich B., Metzle R., et al. 2010. Both cultured and freshly isolated adipose tissue-derived stem cells enhance cardiac function after acute myocardial infarction. *Eur. Heart J.* 31, pp. 489–501.

Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T., Weissman IL, Robbins RC. 2004. Hematopoietic stem cells adopt mature hematopoietic fates in ischemic myocardium. *Nature* 428, pp. 668-673.

Bearzi C, Rota M, Hosoda T, Tillmanns J, Nascimbene A, De Angelis A, et al. 2007. Human cardiac stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, pp. 14068–14073.

Behfar A, Zingman LV, Hodgson DM. 2002. Stem cell differentiation requires a pancreatic pathway in the heart. *FASEB J* 16, pp. 1558-1566.

Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chiment S, et al. 2003. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 114, pp. 763–776.

Bittira B, Kuang JQ, Al-Khalidi A, Shum-Tim D, Chiu R. 2002. In vitro preprogramming of marrow stromal cells for myocardial regeneration. *Ann Thorac Surg* 74, pp. 1154-1160.

Bittira B, Shum-Tim D, Al-Khalidi A, Chiu RC. 2003. Mobilization and homing of bone marrow stromal cells in myocardial infarction. *Eur J Cardiothorac Surg* 24, pp. 393-398.

Bittner RE, Schofer C, Weipoltshammer K, Ivanova S, Streubel B, Hauser E, et al. 1999. Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. *Anat Embryol* 199, pp. 391- 396.

Bollini S, Smart N, Riley PR. 2010. Resident cardiac progenitor cells: at the heart of regeneration. *J Mol Cell cardiol*, p. in press.

Cai CL, Martin JC, Sun Y, Cui L, Wang L, Ouyang K, et al. 2008. A myocardial lineage derives from Tbx18 epicardial cells. *Nature* 454, pp. 104–108.

Cai L., Johnstone BH., Cook TG., Tan J., Fishbein MC., Chen PS., et al. 2009. Human adipose tissue-derived stem cells induce angiogenesis and nerve sprouting following myocardial infarction, in conjunction with potent preservation of cardiac function. *Stem Cells*. 27, pp. 230-239.

Chen SL, Fang WW, Ye F, Liu YH, Quian J, Shan SJ, et al. 2004. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 94, pp. 92-95.

Christophorou N, Gearhart J. 2007. Stem cells and their potential in cell based cardiac therapies. *Progress in Cardiovascular Diseases* 49, pp. 396-413.

Davis ME, Hsieh PC, Takahashi T, Song Q, Zhang S, Kamm RD, et al. 2006. Local myocardial insulin-like growth factor 1 (IGF-1) delivery with biotinylated peptide nanofibers improves cell therapy for myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, pp. 8155-8160.

Dawn B, Stein AB, Urbanek K, Rota M, Whang B, Rastaldo R, et al. 2005. Cardiac stem cells delivered intravascularly traverse the vessel barrier regenerate infarcted myocardium and improve cardiac function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, pp. 3766–3771.

Desbaillets I, Ziegler U, Groscurth P, Gassmann M. 2000. Embryoid bodies: an in vitro model of mouse embryogenesis. *Exp Physiol* 85, pp. 645–651.

Dib N, Dinsmore J, Lababidi Z, White B, Moravec S, Campbell A, et al. 2009. One-year follow-up of feasibility and safety of the first U.S., randomized, controlled study using 3-

dimensional guided catheter-based delivery of autologous skeletal myoblasts for ischemic cardiomyopathy (CAuSMIC study). *JACC Cardiovasc Interv* 2, pp. 9-16.

Dib N, Michler RE, Pagani FD, Wright S, Kereiakes DJ, Lengerich R, et al. 2005. Safety and feasibility of autologous myoblast transplantation in patients with ischemic cardiomyopathy: Four-year follow up. *Circulation* 112, pp. 1748- 1755.

Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R. 1985. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol* 87, pp. 27-45.

Drukker M, Benvenisty N. 2004. The immunogenicity of human embryonic stem-derived cells. *Trends Biotechnol* 22, pp. 136–141.

Drukker M, Katz G, Urbach A, Schuldiner M, Markel G, Itskovitz-Eldor J, et al. 2002. Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, pp. 9864–9869.

Duckers HJ., Houtgraaf J., Geuns RJ., Fernandez-Aviles FJ., Serruys PW., 2009. First-in-man experience of adipose-derived stem cell transplantation in the treatment of patients with an acute ST-elevation myocardial infarction (Apollo trial). *JACC* 55 p. 10A.

Erbs S, Linke A, Adams V, Lenk K, Thiele H, Diederich KW, et al. 2005. Transplantation of blood-derived progenitor cells after recanalization of chronic coronary artery occlusion: first randomized and placebo-controlled study. *Circ Res* 97, pp. 756–762.

Fraser JK., Wulur I., Alfonso Z., Hedrick MH., 2006. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 24, pp. 150-154.

Gersh B, Simari R, Behfar A, Terzic C, Terzic A. 2009. Cardiac cell repair therapy: a clinical perspective. *Mayo Clinic Proc* 84, pp. 876-892.

Gnecchi M, He H, Liang OD, Melo LG, Morello F, Mu H, et al.: 2005. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med* 11, pp. 367-368.

Gonzales C, Pedrazzini T., 2009. Progenitor cell therapy for heart disease. *Exper Cell Res* 315, pp. 3077-3085.

Goumans M, Boer TP, Smits AM, Van Laake LW, Van VP, Metz CH, et al. 2007. TGF-beta1 induces efficient differentiation of human cardiomyocyte progenitor cells into functional cardiomyocytes in vitro,. *Stem Cell Res. 1*, pp. 138–149.

Hagege AA, Carrion C, Menasche P, Vilqui J, Duboc D, Marolleau JP, et al. 2003. Viability and differentiation of autologous skeletal myoblast grafts in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet* 361, pp. 491- 492.

He KL, Yi GH, Sherman W, Zhou H, Zhang G, Gu A, et al. 2005. Autologous skeletal myoblast transplantation improved hemodynamics and left ventricular function in chronic heart failure dogs. *J Heart Lung Transplant* 24, pp. 1940-1949.

Heldman A, Zambrano J, Hare J., 2011. Cell Therapy for Heart Disease. Where are we in 2011? *J Amer Col Card* 57, pp. 466–468.

Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi A, et al. 2003. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function and cardiovascular risk. *N. Eng J Med* 348, pp. 593-600.

Hong S., Traktuev D., March K., 2010. Therapeutic potential of adipose-derived stem cells in vascular growth and tissue repair. *Curr Opin Organ Transplant* 15, pp. 86-91.

Ince H, Petzsch M, Rehders TC, Chatterjee T, Nienaber CA. 2004. Transcatheter transplantation of autologous skeletal myoblasts in postinfarction patients with severe left ventricular dysfunction. *J Endovasc Ther*, pp. 695–704.

Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley C, Majesky M, et al. 2001. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem-cells. *J Clin Invest* 107, pp. 1395-1402.

Janssens S, Dubois C, Bogaert J, et al. 2006. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with STsegment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 367, pp. 113-121.

Kajstura J, Rota M, Whang B, Cascapera S, Hosoda T, Bearzi C, et al. 2005. Bone marrow cells differentiate in cardiac cell lineages after infarction independently of cell fusion. *Circ Res* 96, pp. 127-137.

Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, et al. 2001. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* 108, pp. 407-414.

Kehat I, Khimovich L, Caspi O, Gepstein A, Shofti R, Arbel G. 2004. Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 22, pp. 1282–1289.

Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, et al. 2001. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts

prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 7, pp. 430–436.

Laflamme MA, Chen KY, Naumova AV, Muskheli V, Fugate JA, Dupras SK, et al. 2007. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol* 25, pp. 1015–1024.

Leri A, Kajstura J, Anversa P. 2005. Cardiac Stem Cells and Mechanisms of Myocardial Regeneration. *Physiol Rev* 85, pp. 1373–1416.

Li L., Baroja M., Majumbar A., Chadwick K., Rouleau A., Gallacher L., et al. 2004. Human Embryonic Stem Cells Possess Immune-Privileged Properties. *Stem Cells* 22, pp. 448–456.

Li Z, Wu JC, Sheikh AY, Kraft D, Cao F, Xie X, et al. 2007. Differentiation, survival, and function of embryonic stem cell derived endothelial cells for ischemic heart disease. *Circulation* 116, pp. 146–154.

Lipinski MJ, Biondi-Zoccai GG, Abbate A, Khianey R, Sheiban I, Bartunek J, et al. 2007. Impact of intracoronary cell therapy on left ventricular function in the setting of acute myocardial infarction: a collaborative systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *J Am Coll Cardiol* 50, pp. 1761-1767.

Losordo DW, Schatz RA, White CJ, Udelson J, Veereshwarayya V, Durgin M, et al. 2007. Intramyocardial transplantation of autologous CD34+ stem cells for intractable angina: a phase I/IIa double-blind, randomized controlled trial. *Circulation* 26, pp. 3165-3172.

Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland Tet al. 2006. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 355, pp. 1199-1209.

Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, et al. 1999. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 103, pp. 697-705.

Mangi AA, Noiseux N, Kong D, He H, Rezvani M, Ingwall JS, et al. 2003. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat Med.* 9, pp. 1195-1201.

Marecos C., Falcão LM., 2010. Terapêutica com células estaminais no enfarte agudo do miocárdio e insuficiência cardíaca pós-enfarte. *Revista SPMI* 17, pp. 187-195.

Martin CM, Meeson AP, Robertson SM, Hawke TJ, Richardson JA, Bates S, et al. 2004. Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter Abcg2, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart. *Dev. Biol.* 265, pp. 262–275.

Martin-Rendon E, Brunskill SJ, Hyde CJ, Stanworth SJ, Mathur A, Watt SM, et al. 2008. Autologous bone marrow stem cells to treat acute myocardial infarction: a systematic review. *Eur Heart J* 29, pp. 1807-1818.

Matsuura K, Nagai T, Nishigaki N, Oyama T, Nishi J, Wada H, et al. 2004. Adult cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* 279, pp. 11384–11391.

Menasché P. 2007. Skeletal Myoblast as a therapeutic agent. *Prog in Card Dis* 50, pp. 7-17.

Menasché P. 2008. Skeletal myoblasts and cardiac repair. *J Mol and Cell Card* 45, pp. 545–553.

Menasche P, Alfieri O, Janssens S, McKenna W, Reichenspurner H, Trinquart L., 2008. The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first

randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation* 117, pp. 1189-1200.

Messina E, De AL, Frat G, Morrone S, Chimenti S, Fiordaliso F, et al. 2004. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart,. *Circ. Res.* 95, pp. 911–921.

Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, Pirr J, Rager U, Lippolt P, 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, pp. 2978-2984.

Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, et al. 2004. Hematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes. *Nature* 428, pp. 664-668.

Nelson TJ, Ge GD, Van Orman J, Barron M, Rudy-Reil D, Hacker T, et al., 2006. Improved cardiac function in infarcted mice after treatment with pluripotent embryonic stem cells. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 288, pp. 1216-1224.

Ning H., Liu G., Lin G., Yang R., Lue TF., Lin CS., 2009. Fibroblast growth factor 2 promotes endothelial differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *J Sex Med* 6. pp. 967–979.

Nygren JM, Jovinge S, Breitbach M, Säwén P, Röhl W, Hescheler J, et al. 2004. Bone marrow derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion but not transdifferentiate. *Nature Medicine* 10, pp. 494-501.

Odorico JS, Kaufman DS, and Thomson JA. 2001. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 19, pp. 193–204.

Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussin V, Mishina Y, et al. 2003. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, pp. 12313–12318.

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, et al. 2001. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410, pp. 701-705.

Ortak J, Akin I, Kische S, Nienaber CA, Ince H. 2008. Stem cell use for cardiac disease as of 2008. *Transf and apher Science* 38, pp. 253-260.

Ott HC, Matthiesen TS, Brechtken J, Grindle S, Goh SK, Nelson W., 2007. The adult human heart as a source for stem cells: repair strategies with embryonic-like progenitor cells. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 4, pp. S27–S39.

Pelliccia F, Pasceri V, Cianfrocca C, Vitale C, Pristipino C, Speciale G, et al. 2009. Endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease and left ventricular dysfunction. *Coron Artery Dis* 20, pp. 303-308.

Pfister O, Mouquet F, Jain M, Summer R, Helmes M, Fine A, et al. 2005. CD31 but not CD31 cardiac side population cells exhibit functional cardiomyogenic differentiation. *Circ. Res.* 97, pp. 52–61.

Picinich SC, Mishra PJ, Mishra PJ, Glod J, Banerjee D. 2007. The therapeutic potential of mesenchymal stem cells. *Expert Opin Biol Ther.* 7, pp. 965-973

Pouly J, Bruneval P, Mandet C, Proksch S, Peyrard S, Amrein C., 2008. Cardiac stem cells in the real world. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg* 135, pp. 673–678.

Qian H, Yang Y, Li J, Huang J, Dou K, Yang G. 2007. The role of vascular stem cells in atherogenesis and post-angioplasty restenosis. *Ag reser rev* 6, pp. 109-127.

Rigol M., Solanes N., Farre J., Roura S., Roque M., Berruezo A., et al. 2010. Effects of adipose tissue-derived stem cell therapy after myocardial infarction: impact of the route of administration. *J. Card. Fail.* 16. pp. 357-366.

Rosenblatt-Velin N, Lepore MG, Cartoni MG, Beermann F., 2005. FGF-2 controls the differentiation of resident cardiac precursors into functional cardiomyocytes. *J. Clin. Invest.* 115, pp. 1724–1733.

Sadat S., Gehmert S., Song YH., Yen Y., Bai X., Gaiser S., et al. 2007. The cardioprotective effect of mesenchymal stem cells is mediated by IGF-I and VEGF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 363. pp. 674–679.

Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Elsässer A, Haberbosch W, Hambrecht R, et al. 2006. Intracoronary bone marrow derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 355, pp. 1210-1221.

Schuster MD, Kocher AA, Seki T, Martens TP, Xiang G, Homma S, et al. 2004. Myocardial neovascularization by bone marrow angioblasts results in cardiomyocyte regeneration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284, pp. 525–32.

Seeger FH, Tonn T, Krzossok N, Zeiher AM, Dimmeler S., 2007. Cell isolation procedures matter: a comparison of different isolation protocols of bone marrow mononuclear cells used for cell therapy in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 28, pp. 766-772.

Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA ,Senechal G, Meyers J, Redmond JM et al. 2002. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg* 73, pp. 1919-1925.

Siminiak T, Kalawski R, Fiszer D, Jerzykowska O, Rzezniczak J, Rozwadowska N, 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, pp. 531–537.

Singh S., Arora R., Handa K., Khraisat A., Nagajothi N., Molnar J., et al. 2009. Stem cells improve left ventricular function in acute myocardial infarction. *Clin Cardiol* 32. pp. 176–180.

Singla DK, Hacker TA, Ma L, Douglas PS, Sullivan R, Lyons GE, et al. 2006. Transplantation of embryonic stem cells into the infarcted mouse heart: formation of multiple cell types. *J Mol Cell Cardiol* 40, pp. 195–200.

Smith RR, Barile L, Cho HC, Leppo MK, Hare JM, Messina E, et al. 2007. Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens. *Circulation* 115, pp. 896–908.

Strem BM., Zhu M., Alfonso Z., Daniels EJ., Schreiber R., Beygui R., 2005. Expression of cardiomyocytic markers on adipose tissue-derived cells in a murine model of acute myocardial injury. *Cytotherapy* 7 pp. 282–291.

Swijnenburg RJ, Tanaka M, Vogel H, Bakker J, Kofidis T, Gunawan F, et al. 2005. Embryonic stem cell immunogenicity increases upon differentiation after transplantation into ischemic myocardium. *Circulation* 112, pp. 1166–1172.

Tang YL, Tang Y, Zhang YC, Qian K, Shen L, Phillips MI. 2005. Improved graft mesenchymal stem cell survival in ischemic heart with hypoxia-regulated heme oxygenase-1 vector. *J Am coll Cardiol* 46, pp. 1351-1353.

Tendera M., Wojakowski W., Ruzyllo W., Chojnowska L., Kepka C., Tracz W., 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. *Eur Heart J* 30, pp. 1313–1321.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS et al. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, pp. 1145-1147.

Tillmanns J, Rota M, Hosoda T, Misao Y, Esposito G, Gonzalez A, et al. 2008. Formation of large coronary arteries by cardiac progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105. pp. 1668–1673.

Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. 2002. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 105, pp. 93-98.

Tomescot A, Leschik J, Bellamy V, Dubois G, Messas E, Bruneval P, et al. 2007. Differentiation in vivo of cardiac committed human embryonic stem cells in postmyocardial infarcted rats. *Stem Cells* 25, pp. 2200–2205.

Tousoulis D, Briasoulis A, Antoniadis C, Stefanadi E, Stefanadis C., 2008. Heart Regeneration: what cells to use and how? *Cur opin in pharm* 8, pp. 211-218.

Urbanek K, Quain F, Tasca G, Torella D, Castaldo C, Nadal-Ginard B, et al. 2003. Intense myocyte formation from cardiac stem cells in human cardiac hypertrophy,. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, pp. 10440–10445.

Valina C., Pinkernell K., Song YH., Bai X., Sadat S., Campeau RJ., et al. 2007. Intracoronary administration of autologous adipose tissue-derived stem cells improves left ventricular function, perfusion, and remodelling after acute myocardial infarction. *Eur. Heart J.* 28, pp. 2667–2677.

Van den Bos EJ, Thompson RB, Wagner A, Mahrholdt H, Morimoto Y, Thomson L, et al. 2005. Functional assessment of myoblast transplantation for cardiac repair with magnetic resonance imaging. *Eur J Heart Fail* 7, pp. 435-443.

Wohrle J, Merkle N, Mailander V, Nusser T, Schauwecker P, von Scheidt F, et al. 2010. Results of intracoronary stem cell therapy after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 105, pp. 804–812.

Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, et al. 2004. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 364. 2004, pp. 141-148.

Yousef M, Schannwell CM, Köstering M, Zeus T, Brehm M, Strauer BE. 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, pp. 2262-2269.

Yuan X, Zhang H, Wei Y, Hu S. 2007. Embryonic stem cell transplantation for the treatment of myocardial infarction: Immune privilege or rejection. *Transplant Immunology*. 18, pp. 88–93.

Zhang J, Wilson G, Soerens A, Koonce C, Yu J, Palecek S, et al. 2009. Functional Cardiomyocytes Derived From Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Circulation Research* 104, pp. e30-e41.

Zhang S, Sun A, Xu D, Yao K, Huang Z, Jin H, et al. 2009. Impact of timing on efficacy and safety of intracoronary autologous bone marrow stem cells transplantation in acute myocardial infarction: a pooled subgroup analysis of randomized controlled trials. *Clin. Cardiol* 32, pp. 458-466.

Zhou B, Ma Q, Rajagopa SI, Wu SM, Domian I, Rivera-Feliciano J, et al. 2008. Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature* 454, pp. 109-113.

Zhu XY, Zhang XZ., L. Xu, Zhong XY., Ding Q., Chen YX., 2009. Transplantation of adipose-derived stem cells overexpressing hHGF into cardiac tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379, pp. 1084–1090.

Zohlhofer D, Dibra A, Koppara T, Waha A, Ripa R, Kastrup J, et al. 2008. Stem Cell Mobilization by Granulocyte Colony-Stimulating Factor for Myocardial Recovery After Acute Myocardial Infarction A Meta-Analysis. *J Am Coll Cardiol* 51, pp. 1429–1437.

Zuk PA., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell JW., Katz AJ., et al. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies,. *Tissue Eng.* 7, pp. 211–228.