

O Regresso ao Passado: Terapêutica de Regeneração Miocárdica [77]

LINO M. GONÇALVES*

Clínica Universitária de Cardiologia, Faculdade de Medicina de Coimbra, Coimbra, Portugal
Serviço de Cardiologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

Rev Port Cardiol 2008; 27 (9): 1045-1060

RESUMO

A terapêutica de regeneração miocárdica é um tema que tem vindo a ser alvo de investigação intensa nos últimos anos. Várias linhas celulares e vias de administração foram já testadas. Os principais mecanismos de ação desta terapêutica são já conhecidos. Temos hoje à nossa disposição numerosos dados não só da investigação básica, mas também da investigação clínica. Existem, no entanto, algumas dúvidas acerca da segurança e eficácia desta terapêutica, permanecendo pois ainda por responder várias perguntas nestas áreas. As perspectivas futuras desta nova terapêutica são ainda incertas, mas têm seguramente muito potencial. Resta-nos pois aguardar por informação mais definitiva, a qual irá surgir seguramente nos próximos anos.

Palavras-Chave

Células pluripotenciais; Terapêutica de regeneração miocárdica; Doença coronária; Insuficiência cardíaca

ABSTRACT

Return to the Past: Myocardial Regeneration Therapy

In recent years, myocardial regeneration therapy has been the subject of intense research. Several different cell lines and routes of administration have been tested and the main mechanisms of action are known. A substantial amount of data is available not only from the bench, but also from the bedside. However, there are still many unanswered questions about the safety and efficacy of this treatment. The future of this therapy is uncertain at present, but it unquestionably has great potential. We await the results of ongoing clinical trials in order to have a clearer view of this field of research.

Key words

Stem cells; Myocardial regeneration therapy; Coronary artery disease; Heart failure

INTRODUÇÃO

A reparação celular e tecidual é um mecanismo indispensável à sobrevivência dos organismos numa luta constante para preservar a homeostasia. Se nalguns tecidos essa capacidade regenerativa celular é muito eficaz, noutros ela está virtualmente ausente. Esta capacidade regenerativa foi fundamental para a sobrevivência e para a evolução da vida na Terra, num ambiente não raras vezes agressivo.

Em certos organismos tais como no peixe zebra e no tritão, as capacidades de regeneração são excelentes podendo a reparação completa de um membro ou cauda ocorrer após a sua amputação.⁽¹⁾ Mesmo após a excisão de uma parte do coração,

INTRODUCTION

Repair of cells and tissue is essential to the survival of organisms in their constant struggle to preserve homeostasis and for the evolution of life in Earth's often harsh environment. In some tissues this ability to regenerate is extremely effective, while in others it is virtually nonexistent.

Some organisms, such as the zebrafish and newt, have excellent regenerative powers and can completely regrow an amputated limb or tail⁽¹⁾. They can even regenerate part of the heart that has been excised, by producing a mass of undifferentiated cells known as a blastema⁽¹⁾. Unfortunately, under normal conditions mammals

este órgão pode regenerar-se através da produção de uma massa de células indiferenciadas chamada blastema.⁽¹⁾ Infelizmente, em condições normais os mamíferos não apresentam esta extraordinária capacidade regenerativa.⁽²⁾ Esta incapacidade regenerativa do coração que os mamíferos apresentam poderia no entanto ser obviada, pelo menos no plano teórico, através do desenvolvimento de várias estratégias que permitam a ultrapassagem dos pontos no ciclo celular que limitam a proliferação reactiva dos cardiomiócitos.⁽³⁾

Sabe-se hoje que os cardiomiócitos, após um enfarte agudo do miocárdio, são responsáveis pelo aumento da massa muscular do miocárdio, principalmente através do desenvolvimento de hipertrofia, mas também devido à sua proliferação.⁽⁴⁾ No entanto, esta capacidade de auto-regeneração, redução dos efeitos deletérios da remodelação ventricular e contribuição para a melhoria da função ventricular é infelizmente muito limitada. A angiogénese (e a neo-angiogénese) do miocárdio isquémico e necrótico tem um papel importante no desenvolvimento da remodelação ventricular.⁽⁵⁾ Após o enfarte agudo do miocárdio, os vasos recém-formados em condições normais, não conseguem manter uma perfusão miocárdica adequada de forma a permitir o crescimento celular necessário para desenvolver uma compensação contráctil. Para além disso, eles não conseguem acompanhar as elevadas necessidades metabólicas dos cardiomiócitos hipertrofiados sobreviventes, existentes na zona peri-necrose, levando estes a desencadarem o processo da apoptose, com a consequente morte celular. Esta morte celular resulta na expansão do enfarte e no aumento da fibrose miocárdica, com consequências catastróficas para o doente.⁽⁶⁾

Desta forma, a potenciação da angiogénese, no contexto do enfarte agudo do miocárdio, representa um processo extremamente importante através do qual o aumento da perfusão miocárdica para a zona do enfarte pode reduzir a dilatação ventricular e melhorar a função ventricular, através da recuperação do miocárdio hibernante e através da redução da destruição dos miócitos induzida pela apoptose.

Quais os tipos de terapêutica celular que têm sido utilizados?

Até ao momento têm sido utilizados vários

do not possess this extraordinary ability⁽²⁾. However, the inability of mammals to regenerate cardiac tissue can, at least in theory, be circumvented by various techniques for bypassing the steps in the cell cycle that limit the reactive proliferation of cardiomyocytes⁽³⁾.

It is known that following myocardial infarction (MI), cardiomyocytes are responsible for increased myocardial mass, mainly through hypertrophy, but also through proliferation⁽⁴⁾. Unfortunately, this self-regenerating ability, which reduces the harmful effects of ventricular remodeling and improves ventricular function, is very limited. Angiogenesis and neoangiogenesis in ischemic and necrotic myocardium play an important part in ventricular remodeling⁽⁵⁾. After MI, vessels that have formed recently under normal conditions are unable to maintain sufficient myocardial perfusion for the cell growth required to compensate for loss of contractility. Furthermore, they cannot keep pace with the increased metabolic needs of the surviving hypertrophied cardiomyocytes in the peri-infarct zone, and this failure leads to apoptosis. The death of these cells enlarges the infarct and promotes myocardial fibrosis, with disastrous consequences for the patient⁽⁶⁾.

Angiogenesis is thus an extremely important process in the context of MI: increased perfusion to the infarct zone reduces ventricular dilatation and improves ventricular function by recovering hibernating myocardium and reducing apoptotic cell death.

TYPES OF CELL USED IN MYOCARDIAL REGENERATION THERAPY

Several types of stem cell have been used in myocardial regeneration therapy, all of them autologous in order to avoid rejection. The first attempts to replace cardiomyocytes used skeletal muscle myoblasts, which are usually isolated from a muscle biopsy and can then be cultured for days or weeks before being injected into the ventricular wall^(7,8).

Bone marrow is currently the most popular source of stem cells for myocardial repair⁽⁹⁾. Bone marrow contains a variety of stem cells, including hematopoietic stem cells⁽¹⁰⁾, multipotent adult stem cells⁽¹¹⁾, and mesenchymal stem cells⁽¹²⁾. The marrow is aspirated under local or general

tipos de células progenitoras, todas elas autólogas, de forma a evitar fenómenos de rejeição. As primeiras a serem utilizadas em substituição dos cardiomiócitos foram os mioblastos do músculo esquelético, os quais são habitualmente isolados a partir de uma biópsia do músculo esquelético. Estes mioblastos são multiplicados *ex vivo* durante dias ou semanas, e depois injectados na parede ventricular.^(7,8)

A medula óssea é actualmente a fonte mais frequentemente procurada para a obtenção de células estaminais para a reparação miocárdica.⁽⁹⁾ A medula contém uma grande variedade de células progenitoras que vão desde células hematopoiéticas,⁽¹⁰⁾ a células progenitoras adultas multipotenciais⁽¹¹⁾ e células estaminais mesenquimatosas.⁽¹²⁾ A medula óssea é aspirada após anestesia (local ou geral) procedendo-se de seguida ao isolamento das sub-populações desejadas. Após este isolamento realiza-se habitualmente de imediato a sua administração no coração sem necessidade de se executar uma expansão *ex-vivo*. Nalguns casos a expansão poderá ser utilizada, caso algumas pequenas sub-populações de células demonstrem serem mais vantajosas relativamente a outras.⁽¹²⁾

As células progenitoras provenientes da circulação sanguínea periférica podem igualmente ser usadas na reparação miocárdica⁽¹³⁾ ou na terapêutica angiogénica da doença vascular periférica.⁽¹⁴⁾ Estas células podem ser isoladas a partir das células mononucleares sanguíneas e são seleccionadas *ex vivo* num meio de cultura específico para células endoteliais, durante alguns dias, antes da sua injeção no coração.

Para além das células anteriormente referidas, as células estaminais pluripotenciais derivada do tecido adiposo,⁽¹⁵⁾ subpopulações minúsculas de células pluripotenciais da medula óssea e do músculo esquelético,⁽¹⁶⁾ células estaminais somáticas⁽¹⁷⁾ e células progenitoras residentes no coração,⁽¹⁸⁾ poderão vir a constituir alternativas válidas à terapêutica com células pluripotenciais “clássicas”.

MECANISMOS DE ACCÇÃO DA TERAPÊUTICA CELULAR

Mobilização Celular

Vários estudos realizados demonstraram a presença de miócitos em divisão em corações

anesthetic and the desired subpopulations are isolated; they are then usually administered straight into the heart, without the need for *ex vivo* expansion. In some cases they may be expanded, if cell types found only in small populations are considered more effective than others⁽¹²⁾.

Progenitor cells from peripheral blood can also be used for myocardial regeneration and for angiogenesis in peripheral vascular disease⁽¹⁴⁾. These cells can be isolated from mononuclear blood cells and are selected *ex vivo* in a culture medium for endothelial cells for some days before being injected into the heart.

As well as the above cell types, pluripotent stem cells from adipose tissue⁽¹⁵⁾, tiny subpopulations of multipotent progenitor cells from bone marrow or skeletal muscle⁽¹⁶⁾, somatic stem cells⁽¹⁷⁾ and cardiac progenitor cells⁽¹⁸⁾ may be viable alternatives to therapy with classic stem cell types.

MECHANISMS OF CELL THERAPY

Cell mobilization

Various studies have demonstrated the presence of dividing myocytes in healthy hearts and following MI, in rats^(19,20) and in humans^(21,22). Biopsies of transplanted hearts from donors of the opposite sex have revealed endothelial cells, smooth muscle cells and cardiomyocytes from the recipient^(21,22); these newly-formed cardiomyocytes show cardiac differentiation, as revealed by their expression of α -sarcomeric actin, desmin, myosin heavy chain and myoglobin^(21,22). They also appear to be functionally integrated into the myocardium of the transplanted heart, since they develop gap junctions⁽²³⁾. However, it has yet to be proved that such cardiomyocytes develop electromechanical coupling with resident myocytes and thereby improve cardiac function. In transplanted hearts, the number of newly-formed cardiomyocytes appears to increase over time⁽²⁴⁾. Overall, these findings suggest that myocardial regeneration may help to maintain normal cardiac structure^(4,25).

In MI, cell proliferation is greatest at the edge of the infarct zone and is 3 to 4 times more intense in the first week after infarction than in the final stages of ventricular remodeling⁽⁴⁾. However, some studies have shown no increase in myocardial regeneration four weeks post-infarction⁽²³⁾. There

normais e em corações após enfarte agudo do miocárdio. Esta situação foi já demonstrada não só em coração de ratos^(19, 20) como também em corações humanos.^(21, 22) De facto, em algumas biópsias de doentes submetidos a transplante cardíaco, os quais receberam um coração de um dador de outro sexo, foram encontradas no coração transplantado células endoteliais, células musculares lisas e cardiomiócitos provenientes do receptor.^(21, 22) Estes cardiomiócitos recém-formados demonstram possuir uma diferenciação cardíaca como é aliás provado pela expressão de actina sarcomérica- α , desmina, cadeias pesada da miosina, e mioglobina.^(21, 22) Para além disso, estes cardiomiócitos parecem funcionalmente integrados no miocárdio do coração transplantado ao serem capazes de desenvolver *gap junctions*.⁽²³⁾ No entanto, até ao momento, não foi ainda demonstrado que estes cardiomiócitos recém-formados sejam capazes de desenvolver um acoplamento electromecânico com os miócitos residentes do qual resulte uma melhoria da função cardíaca. Nestes corações transplantados o número de cardiomiócitos recém-formados parece aumentar com o tempo.⁽²⁴⁾ Tendo em consideração a globalidade destes achados eles parecem sugerir que a regeneração miocárdica pode contribuir potencialmente para a manutenção de um coração estruturalmente normal.^(4, 25)

No contexto do enfarte do miocárdio, a proliferação celular é mais intensa na zona limite do enfarte, do que nas zonas mais remotas, sendo esta proliferação 300 a 400% mais intensa na primeira semana após o enfarte do que na fase final da remodelagem ventricular.⁽⁴⁾ Outros estudos, no entanto, demonstraram que quatro semanas após o enfarte não existe um aumento da regeneração miocárdica.⁽²³⁾ Existem duas origens possíveis para estes miócitos em replicação. Uma hipótese é que eles derivem de um *pool* de células estaminais residentes no coração que surgem durante o desenvolvimento embrionário do coração e que vão gerando novos miócitos ao longo da vida do indivíduo.⁽²⁶⁾ Estas células seriam capazes de se transformar igualmente noutras linhas celulares cardíacas. A outra hipótese é que estes miócitos em divisão provenham de células pluripotenciais circulantes que se fixam no coração ao serem estimuladas.⁽²⁷⁾ Se fosse possível aumentar a mobilização das células pluripotenciais que já existem no organismo, então seria possível desta forma

are two theories concerning the origin of these replicating cardiomyocytes. One suggests that they derive from a pool of cardiac resident stem cells that are formed during the development of the embryonic heart and that continue to produce new myocytes throughout the life of the individual⁽²⁶⁾. These stem cells would also be able to form other cardiac cell lines. The other theory is that dividing cardiomyocytes arise from circulating stem cells that home to the heart when suitably stimulated⁽²⁷⁾. Hence, if mobilization of stem cells in the organism could be increased, this would improve myocardial regeneration, which would be further enhanced by strengthening natural cytoprotective mechanisms by inhibiting proapoptotic pathways⁽²⁸⁾, promoting angiogenesis through vascular growth factors and angiogenic cells⁽²⁹⁾, or inserting exogenous cells in the myocardium that act as precursors of myocytes (Fig. 1)⁽³⁰⁾.

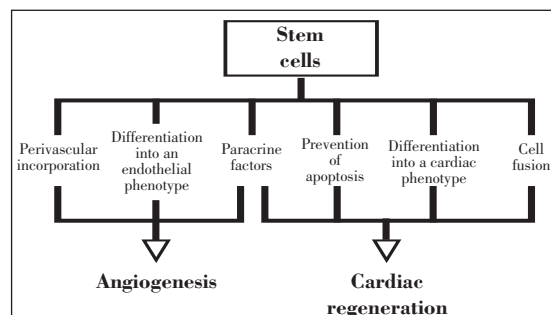


Figure 1. Mechanisms of action of stem cells

It has been demonstrated that certain cytokines, including VEGF, GM-CSF, SDF-1, angiopoietin-1, placental growth factor and erythropoietin⁽³¹⁻³⁵⁾, can mobilize stem cells and increase angiogenesis (Fig. 2). Statins, estrogens and exercise have also been shown to increase the number of circulating stem cells, which could differentiate into cardiomyocytes and thus repair damaged myocardium (Fig. 2)⁽³⁹⁾.

Homing

Homing results from a cascade of events from initial adhesion to activated endothelium or the extracellular matrix, through migration across the endothelium and finally invasion of the damaged myocardium (Fig. 2). This process of migration and invasion is important for the functional integration of these cells, even when they are

melhorar a reparação miocárdica. Para além disso, a regeneração miocárdica pode ser ajudada pela potenciação dos mecanismos de citoprotecção que ocorrem naturalmente, pela inibição das vias pró-apoptóticas,⁽²⁸⁾ pelo favorecimento dos mecanismos angiogénicos (através do uso de factores de crescimento vasculares ou de células angiogénicas),⁽²⁹⁾ e finalmente pelo fornecimento de células exógenas ao miocárdio as quais possam servir de percussores dos miócitos (*Fig. 1*).⁽³⁰⁾

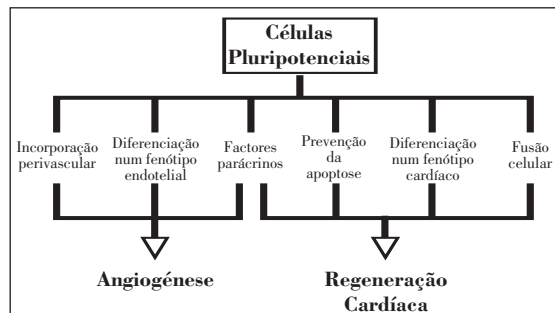


Figura 1. Mecanismos de acção das células pluripotenciais.

Algumas citoquinas, como seja o caso do VEGF, GM-CSF, SDF-1, angiopoietina-1, factor de crescimento da placenta e eritropoietina,⁽³¹⁻³⁵⁾ demonstraram ser capazes de induzir a mobilização das células pluripotenciais e

injected directly into heart muscle.

Adhesion and migration through the endothelium are mediated by integrins, particularly $\beta 2$ integrins⁽⁴⁰⁾.

The homing of hematopoietic cells in bone marrow has been studied in detail⁽⁴¹⁾. However, the mechanisms underlying homing in damaged tissues are still largely unknown.

Angiogenesis

Besides the possibility of transdifferentiation, other mechanisms important to the success of myocardial regeneration therapy are angiogenesis, improved healing of myocardial scar tissue, and cytoprotection. Of these, the most significant is probably angiogenesis, which increases the supply of oxygen and nutrients to ischemic myocardium. The strongest effects of stem cell therapy are seen when they are injected directly into the infarct border zone; the resulting angiogenesis may result from incorporation of the stem cells in new capillaries⁽¹⁹⁾ and perivascular cells⁽⁴²⁾, or from the production of angiogenic growth factors that act on endothelial cells⁽⁴³⁾. It has been shown that genetically modifying cells to express angiogenic factors may increase not only their own longevity but also that of the myocardium⁽⁴⁴⁾.

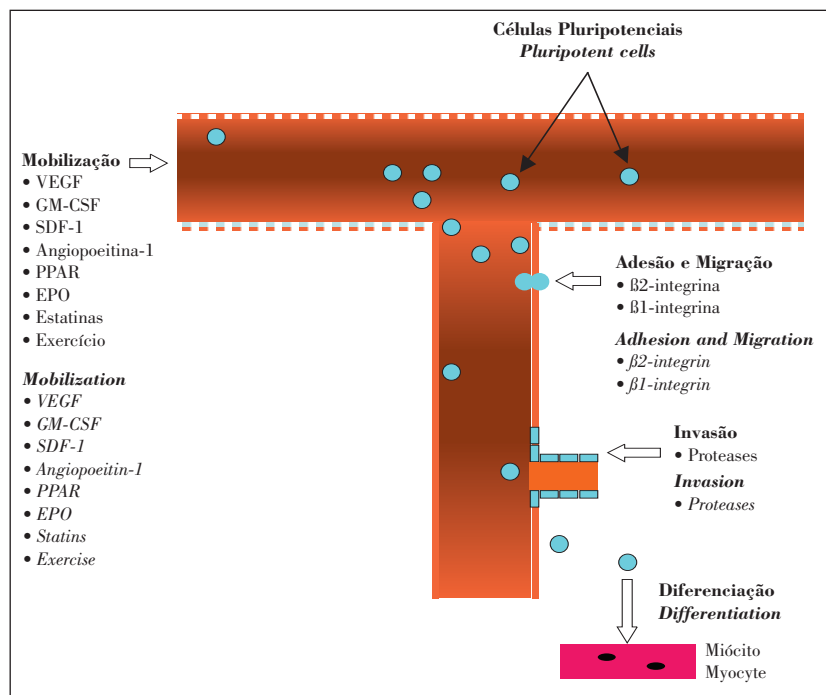


Figura 2. Mobilização, adesão, migração, invasão e fixação celular.

Figure 2. Mobilization, adhesion, migration, invasion and homing.

aumentar a angiogénese (*Fig. 2*). As estatinas, bem como os estrogénios e o exercício físico⁽³⁶⁻³⁸⁾ também demonstraram ser capazes de aumentar o número de células pluripotenciais circulantes. Estas células pluripotenciais circulantes poderiam diferenciar-se em cardiomiócitos e assim regenerar o miocárdio lesado (*Fig. 2*).⁽³⁹⁾

Fixação celular

A fixação celular é um processo que envolve uma cascata de acontecimentos que vão desde a adesão inicial ao endotélio activado ou à matriz extracelular, à migração através do endotélio e finalmente, à migração e invasão do miocárdio lesado (*Fig. 2*). Esta capacidade de migração e invasão pode ser muito importante para a integração funcional destas células mesmo quando elas são injectadas directamente no músculo cardíaco.

A adesão e migração através do endotélio é mediado por integrinas, em particular integrinas $\beta 2$.⁽⁴⁰⁾

O processo de fixação celular das células hematopoiéticas pluripotenciais na medula óssea já foi estudado em detalhe.⁽⁴¹⁾ No entanto, os mecanismos subjacentes à fixação celular das células pluripotenciais em tecidos lesados são ainda desconhecidos na sua larga maioria.

Angiogénese

Para além da hipótese da transdiferenciação, a angiogénese, a melhoria da cicatrização miocárdica e a citoprotecção poderão também constituir importantes mecanismos envolvidos no benefício encontrado nesta nova terapêutica. De entre estes mecanismos, provavelmente o mais relevante é a angiogénese o qual permite aumentar o fornecimento de oxigénio e nutrientes ao miocárdio isquémico. De facto, a terapêutica com células pluripotenciais tem o seu efeito mais marcado quando a injeção ocorre nos limites da zona isquémica em risco. Este efeito angiogénico pode resultar da incorporação das células pluripotenciais nos novos capilares,⁽¹⁹⁾ e nas células perivasculares,⁽⁴²⁾ ou da produção de factores de crescimento angiogénicos os quais actuam sobre as células endoteliais.⁽⁴³⁾ De facto, foi já demonstrado que células que são geneticamente modificadas para exprimir factores angiogénicos podem não só aumentar a sua própria longevidade como também a longevidade do próprio miocárdio.⁽⁴⁴⁾

CAN NECROTIC MYOCARDIUM BE REPAIRED?

Animal experiments

Various mechanisms for the formation of functional cardiomyocytes from rat and human embryonic stem cells have been demonstrated^(45, 46).

The use of autologous adult stem cells overcomes the religious, ethical, and political objections to the use of embryonic stem cells, which can also provoke immune reactions⁽⁴⁷⁾.

Sca-1⁺ (stem cell antigen-1) cells, found in small numbers in adult myocardial tissue, can differentiate into cardiomyocytes. They can be isolated and cultured. When administered intravenously following ischemia-reperfusion injury in mice, Sca-1⁺ cells home to injured myocardium, fuse with native cardiomyocytes and exhibit strong differentiation *in situ*. These cells make up 15% of myocytes in the infarct border zone two weeks after administration⁽¹⁸⁾ and around 5% of the injected cells are still multiplying at this time⁽¹⁸⁾.

Cardiac c-kit⁺ cells have been found, often in groups, in myocardium in a ratio of 1 per 10 000 adult cardiomyocytes. These cells multiply spontaneously, can be cultured, and are multipotent, differentiating into cardiomyocytes, smooth muscle cells and endothelial cells⁽⁴⁸⁾. When injected into the peri-infarct region, they form bands of regenerated myocardium in the necrotic area, contribute to angiogenesis, and improve ventricular function and geometry⁽⁴⁸⁾.

These resident stem cells may come from undifferentiated remnants of the tissue that becomes the heart during embryonic development; alternatively, they could have a hematopoietic origin, or grow from cells of the coronary vasculature.

Human experiments

At least six preliminary studies on myocardial regeneration have been published in the last four years, ranging from case reports to full-scale clinical trials, and using different methods of cell therapy (*Table I*). Most studies on patients with MI have found slight improvement (7-9%) in global ventricular function, together with a significant reduction in left ventricular end-systolic volume and improved myocardial perfusion in the necrotic area, within 6 months of cell therapy.

Table I. Clinical studies of intracoronary administration of stem cells after myocardial infarction

Study	No. of patients	Days post-MI	Cell type	No. of cells (x10 ⁶)	Safety	Myocardial function
Strauer et al. ⁴⁹	10	8	BMCs	28	Yes	+ regional LV function - end-systolic volume + myocardial perfusion
TOPCARE-AMI ¹³	59	4,9	CPCs/BMCs	16/213	Yes	+ global LV function - end-systolic volume + viability + coronary flow reserve
BOOST trial ⁵⁰	30 vs 30	4,8	BMCs	2460	Yes	+ global function
Fernandez-Aviles ⁵¹	20	13,5	BMCs	78	Yes	+ global function - end-systolic volume

MI: myocardial infarction; +: improved; -: reduced; LV: left ventricular; BMCs: bone marrow-derived cells; CPCs: circulating progenitor cells

Table II. Clinical studies of intracoronary administration of stem cells in chronic coronary artery disease

Study	No. of patients	Days post-MI	Cell type	No. of cells (x10 ⁶)	Safety	Myocardial function
Tse et al. ⁵⁴	8	8	BMCs	?	Sim	+ regional LV function + myocardial perfusion
Fuchs et al. ⁵⁵	10	4,9	BMCs	78,3	Sim	- angina - exercise-induced ischemia
Perin et al. ^{9,56}	14	4,8	BMCs	30	Sim	+ exercise capacity - perfusion defects - LV end-systolic volume

+: improved; -: reduced; LV: left ventricular; BMCs: bone marrow-derived cells

É POSSÍVEL REPARAR O MIOCÁRDIO NECRÓTICO?

Experiência animal

A formação de cardiomiócitos funcionais a partir de células pluripotenciais embrionárias de rato e humanas foi já demonstrada por vários mecanismos.^(45, 46)

Apesar de existirem justificadas objeções religiosas, éticas, e políticas para a utilização de células pluripotenciais embrionárias, as quais são também imunogénicas,⁽⁴⁷⁾ a utilização de células pluripotenciais autólogas adultas, obvia a todas estas reservas.

As células Sca-1⁺ (*surface marker stem cell antigen-1*) encontram-se em pequeno número no tecido miocárdico adulto e são capazes de se diferenciar em cardiomiócitos. Estas células podem ser isoladas e multiplicadas em cultura. Quando administradas por via endovenosa após o desenvolvimento de uma lesão de isquemia-reperfusão em ratinhos, as células cardíacas Sca-1⁺ fixam-se selectivamente no miocárdio lesado, estabelecem conexões com os cardiomiócitos nativos e mostram uma forte diferenciação *in situ*. Estas células constituem cerca de 15% dos miócitos na zona limite do enfarte duas semanas após a sua administração.⁽¹⁸⁾ Aproximadamente 5% dos miócitos injectados ainda estão a multiplicar-se por essa altura.⁽¹⁸⁾

Spontaneous regeneration of cardiomyocytes does not appear to increase in the first four weeks post-MI⁽²³⁾; however, the absolute number of newly-formed cardiomyocytes increases 4 weeks after heart transplantation⁽²⁴⁾.

There are considerable differences between the extent of muscle regeneration as reported in different studies, the percentage of newly-formed cardiomyocytes ranging between 0.02% and 18%. This may be due to the different marking methods used to detect the cells^(52, 53).

Even greater differences in results have been found in patients with chronic coronary artery disease and previous MI (*Table II*).

The benefits in improved ventricular function and remodeling in these patients appear to be related to the presence of hibernating myocardium. In a small non-randomized trial in patients with ischemic heart failure, using transendocardial bone marrow cells transplantation into the myocardium guided by electromechanical mapping to identify areas of hibernating tissue, significant improvements were seen in left ventricular ejection fraction, as well as reduced end-systolic volume and increased exercise capacity⁽⁹⁾.

Routes of administration

Besides intracoronary administration, two other methods are used to apply stem cells:

Tabela I. Ensaios Clínicos com Administração Intracoronária de Células Progenitoras no Enfarte Agudo do Miocárdio

Estudo	N =	Dias pós-EAM	Tipo celular	N° células (x10 ⁶)	Segurança	Função Miocárdica
Strauer et al. ⁴⁹	10	8	BMCs	28	Sim	+ função regional VE - volume telessistólico + perfusão miocárdica
TOPCARE-AMI ¹³	59	4,9	CPCs/BMCs	16/213	Sim	+ função global VE - volume telessistólico + viabilidade + reserva coronária
BOOST trial ⁵⁰	30 vs 30	4,8	BMCs	2460	Sim	+ função global
Fernandez-Aviles ⁵¹	20	13,5	BMCs	78	Sim	+ função global - volume telessistólico

+ significa melhoria; - significa redução; VE significa ventrículo esquerdo

Células cardíacas c-Kit⁺ foram encontradas no miocárdio na proporção de cerca de 1 por cada 10000 cardiomiócitos adultos, frequentemente em grupos celulares.⁽⁴⁸⁾ Estas células renovam-se espontaneamente, multiplicam-se em cultura, e são multipotenciais (transformam-se em cardiomiócitos, células musculares lisas e células endoteliais).⁽⁴⁸⁾ Quando estas células c-Kit⁺ são injectadas na zona limite do enfarte agudo do miocárdio elas formam bandas de miocárdio regenerado na zona necrótica, contribuem para a angiogénese e melhoram a função e a geometria ventricular.⁽⁴⁸⁾

Estas células pluripotencias residentes podem resultar de reminiscências indiferenciadas do tecido que dá origem ao coração durante o desenvolvimento embrionário, eventualmente ter uma origem hematopoiética ou provirem de um processo de crescimento a partir de células da vasculatura coronária.

Experiência humana

Nos últimos 4 anos mais de seis estudos clínicos preliminares foram publicados sobre este tema indo desde casos clínicos, a ensaios clínicos formais (Tabela I). Estes estudos utilizaram metodologias distintas para a terapêutica celular, com o mesmo objectivo de melhorar a reparação miocárdica. Em quase todos os ensaios conduzidos em doentes com enfarte do miocárdio, foi encontrada uma melhoria ligeira (7-9%) da função ventricular esquerda global, associada a uma redução significativa do volume telessistólico do ventrículo esquerdo e de uma melhoria da perfusão miocárdica na área necrótica, cerca de 6 meses após a terapêutica celular.

A regeneração espontânea dos cardiomiócitos

percutaneous endocardial (intramyocardial) and surgical (epicardial). The advantage of intracoronary application is that the cells reach the infarct border zone, an environment where they are likely to develop. However, this route means that the cells must migrate through the arterial wall to myocardial tissue, and so ischemic areas will receive fewer cells than non-ischemic areas. In addition, while stem cells derived from bone marrow or blood are able to migrate through the vessel wall, this is not the case with skeletal myoblasts, which can obstruct coronary microcirculation and cause microinfarctions.

Intramyocardial administration has the advantage of applying the cells directly at the desired site without the need for migration and without provoking distal embolization. However, this requires perforation of the myocardium, and cells are less likely to survive in necrotic tissue with limited perfusion, particularly in the first few days post-MI. Most cells injected in these circumstances in fact die⁽⁵⁷⁾.

Another important point is that stem cells mainly home to the spleen when injected into athymic rats⁽⁵⁸⁾. Following treatment with G-CSF associated with SCF, myocardial regeneration was only induced in splenectomized animals⁽³⁹⁾.

Safety

Safety is an essential consideration in any new therapy that is to be introduced into clinical practice. Stem cells have the potential to transform not only into cardiomyocytes but also into fibroblasts, which may worsen myocardial scarring and create a substrate for malignant arrhythmias⁽⁵⁹⁾. This proarrhythmic effect may be strengthened by the incomplete integration of stem cells into myocardial tissue, which could affect electrical conduction and hence the

Tabela II. Ensaio Clínicos com Administração Intracoronária de Células Progenitoras na Doença Coronária Crónica

Estudo	N =	Dias pós-EAM	Tipo celular	Nº células (x10 ⁶)	Segurança	Função Miocárdica
Tse et al. ⁵⁴	8	8	BMCs	?	Sim	+ função regional VE + perfusão miocárdica
Fuchs et al. ⁵⁵	10	4,9	BMCs	78,3	Sim	- angina - isquemia de exercício
Perin et al. ^{9,56}	14	4,8	BMCs	30	Sim	+ capacidade de exercício - defeitos de perfusão - volume telessistólico VE

+ significa melhoria; - significa redução; VE significa ventrículo esquerdo

não parece estar aumentada nas primeiras 4 semanas após o enfarte do miocárdio,⁽²³⁾ no entanto, em doentes transplantados, o número absoluto de cardiomiócitos recém-formados parece aumentar 4 semanas após o transplante.⁽²⁴⁾

Em relação à extensão da regeneração muscular, existe uma grande discrepância entre os vários estudos publicados sobre a percentagem de cardiomiócitos recém-formados presentes no coração, a qual varia entre os 0,02% e os 18%. Uma causa provável para esta discrepância pode ser a diferente metodologia de marcação e detecção usada nestes trabalhos.^(52, 53)

Resultados mais heterogéneos desta terapêutica foram encontrados em doentes com doença coronária crónica, após enfarte agudo do miocárdio antigo, (Tabela II).

Os benefícios observados, em termos de melhoria da função ventricular e da remodelagem, neste grupo de doentes crónicos tratados, parece estar associado à presença prévia de miocárdio hibernante. De facto, a administração de células estaminais derivadas da medula óssea, num pequeno ensaio não aleatorizado, no qual doentes com insuficiência cardíaca de causa isquémica foram submetidos a injeções intra miocárdicas por via endocárdica (guiada por mapeamento electromecânico) de forma a localizar as áreas de hibernação, resultaram em melhorias significativas da fracção de ejeção do ventrículo esquerdo, numa redução dos volumes telessistólicos e num aumento da capacidade para realizar exercício.⁽⁹⁾

Vias de Administração

Para além da via intracoronária, existem ainda duas outras vias de administração das células pluripotenciais. São elas a intramiocárdica por via endocárdica percutânea e a epicárdica por via cirúrgica. A vantagem da administração intracoronária é a de administrar as células em

synchronicity of myocardial contraction. This effect of stem cell therapy had not been seen in animal studies before its use in humans^(61, 62); however, enthusiasm for injecting skeletal myoblasts into myocardial scar, with the aim of repairing the damaged tissue, has waned after patients receiving the treatment began to suffer from malignant arrhythmias⁽⁶³⁾. These may be caused by the failure of skeletal myoblasts to produce connexin-43, preventing electrical coupling with the surrounding myocardium⁽⁶⁴⁾. Intracellular monitoring of skeletal myoblasts transplanted into infarcted myocardium in rats showed that the myoblasts' contractile activity was independent of neighboring cardiomyocytes⁽⁶⁵⁾. This could trigger fatal arrhythmias. As a consequence, intramyocardial administration of skeletal myoblasts must be accompanied by implantation of a cardioverter-defibrillator⁽⁶³⁾.

Teratomas can also form as a result of stem cell therapy. The application of unselected cell populations from bone marrow, containing stem cells that are specific to various organs, can result in the development of non-cardiac tissues⁽⁹⁾. Furthermore, four weeks after intramyocardial administration of unselected bone marrow cells in rats, myocardial calcification was found in 30% of the animals⁽⁶⁶⁾.

Mesenchymal stem cells injected into the coronary arteries of dogs caused cardiac microinfarction⁽⁶⁷⁾.

The use of cytokines such as G-CSF to treat myocardial infarction is also the subject of debate, since it is associated with a high rate of stent restenosis and elevation of white blood cell counts to leukemic levels⁽⁶⁸⁾. The adverse effects of this strongly proinflammatory cytokine have been observed in patients with intractable angina who were not eligible for revascularization and even in individuals without heart disease⁽⁶⁹⁾.

zonas de miocárdio na zona limite do enfarte onde elas poderão encontrar um ambiente propício ao seu desenvolvimento. No entanto, a administração intracoronária implica que as células migrem através da parede arterial para o tecido miocárdico. Desta forma, zonas isquémicas receberão menos células do que zonas não-isquémicas. Por outro lado, as células pluripotenciais provenientes da medula óssea e do sangue são capazes de migrar através da parede vascular, o que não se verifica com os mioblastos esqueléticos, os quais obstruem a microcirculação coronária podendo provocar micro-enfartes.

A administração intramiocárdica apresenta a vantagem de colocar as células pluripotenciais directamente no local desejado sem que elas tenham necessidade de migrar ou de provocar a embolização vascular distal. No entanto, a sua administração no tecido necrótico levanta o problema da perfuração miocárdica e a incerteza da sobrevivência das células num tecido com limitada perfusão tecidual, particularmente nos primeiros dias após o enfarte. De facto, a maioria das células injectadas nestas circunstâncias acabam por morrer.⁽⁵⁷⁾

Outra questão importante resulta do facto das células pluripotenciais serem predominantemente capturadas no baço quando injectadas em ratos atímicos.⁽⁵⁸⁾ Apenas em animais esplenectomizados foi possível induzir a regeneração miocárdica após tratamento com G-SCF associado a SCF.⁽³⁹⁾

Segurança

A segurança é um aspecto fundamental de qualquer terapêutica nova que se pretende implantar na prática clínica. As células estaminais têm o potencial de se transformar não apenas em cardiomiócitos como também em fibroblastos, o que pode levar a um aumento da cicatriz miocárdica criando um substrato para o aparecimento de arritmias malignas.⁽⁵⁹⁾ Este potencial efeito pró-arritmico poderá ainda ser potenciado pela integração incompleta das células estaminais no tecido miocárdico, levando a alterações da condução eléctrica e do sincronismo da contractilidade miocárdica.⁽⁶⁰⁾ O efeito pró-arritmico desta terapêutica nunca se detectou no animal antes da sua utilização no humano.^(51, 62) No entanto, o entusiasmo da injeção de mioblastos esqueléticos na cicatriz miocárdica com o objectivo de reparar o tecido

Outstanding questions

Many questions currently remain unanswered, including the ideal number of cells to administer. There is obviously a minimum number needed to produce sufficient muscle tissue to have an impact on ventricular function, but stem cells are few in number in any given patient and hence are difficult to isolate and purify; they must then be cultured before being administered. This process requires the use of various cytokines and growth factors to ensure the success of *in vivo* incorporation⁽⁷⁰⁾.

It is as yet not known whether the benefit of cell transplantation is greater during the acute inflammatory phase, the remodeling phase, or the later development of ischemic cardiomyopathy. There are indications that stem cell therapy is less successful in the first days following MI⁽⁷¹⁾, when the inflammatory process is at its height, or after scar formation in the necrotic area. Transplantation is thus recommended between 7 and 14 days post-MI⁽⁷²⁾.

The ideal route of administration (intra-myocardial, intracoronary or systemic) to apply stem cells has yet to be determined, nor is it known how best to ensure their long-term viability and function.

Administering a “cell cocktail” of various functional cell lines (such as those that become myocytes and others that become vascular cells to supply the muscle thus formed) makes theoretical sense, but such an approach has yet to be proven in practice.

There are further questions concerning the mechanisms involved in cell-mediated myocardial regeneration. It is not known why injecting fibroblasts in rabbits brings similar improvements in diastolic function to the administration of myoblasts⁽⁷³⁾, or why skeletal myoblasts and bone marrow-derived stem cells lead to similar improvements in ventricular systolic function⁽⁷⁴⁾. Recent studies have even cast doubt on whether bone marrow-derived stem cells are capable of differentiating into cardiomyocytes^(75, 76). These findings raise the possibility that the beneficial effects of cell therapy are due not to actual myocardial regeneration but merely to the therapy’s indirect effects, such as promotion of angiogenesis. Future studies will examine the specific contributions of myocardial repair and angiogenesis to the functional improvements observed, since clinical

miocárdico tem sido esfriado devido ao facto dos doentes que receberam este tratamento sofrerem de arritmias malignas.⁽⁶³⁾ Esta situação pode ser devida à não produção de conexina 43 por parte dos mioblastos esqueléticos impedindo assim o acoplamento eléctrico com o miocárdio envolvente.⁽⁶⁴⁾ De facto, registos intracelulares de mioblastos esqueléticos transplantados no tecido necrótico de um enfarte do miocárdio no rato mostram uma actividade contráctil do mioblasto que é independente dos cardiomiócitos vizinhos.⁽⁶⁵⁾ Este fenómeno pode de facto desencadear arritmias potencialmente fatais. Por este motivo, a administração intramiocárdica de mioblastos esqueléticos obriga actualmente à implantação de um cardioversor-desfibrilhador.⁽⁶³⁾

A formação de teratomas a partir de células estaminais embrionárias é também possível. A administração de populações não seleccionadas provenientes da medula óssea, contendo células estaminais específicas de vários órgãos, pode levar ao desenvolvimento de tecidos não cardíacos.⁽⁹⁾ A administração intramiocárdica de células não seleccionadas da medula óssea em ratos levou, quatro semanas após a sua administração, à calcificação miocárdica em cerca de 30% dos animais.⁽⁶⁶⁾

A administração intracoronária de células estaminais mesenquimatosas num modelo canino provocou micro-enfartes cardíacos.⁽⁶⁷⁾

Para além disso, a utilização de citoquinas como o G-CSF no tratamento do enfarte agudo do miocárdio foi já colocado em questão, uma vez que se associou a uma elevada percentagem de restenose intra *stent* e a uma elevação para níveis leucémicos do número de leucócitos no sangue.⁽⁶⁸⁾ Efeitos adversos desta citoquina, fortemente pró-inflamatória, foram já demonstrados em doentes com angina intratável que não eram passíveis de revascularização e mesmo em doentes sem doença cardíaca.⁽⁶⁹⁾

Questões por Responder

Muitas questões permanecem ainda por responder neste momento. O número ideal de células a serem administradas ainda não está definido. É natural que exista um número mínimo que seja necessário administrar de forma a produzir uma quantidade de músculo que tenha impacto na função ventricular.

As células estaminais são, infelizmente, em pequeno número em cada doente e por esse

trials have never provided direct and unequivocal proof of the involvement of stem cells in the production of cardiomyocytes or blood vessels.

Bearing in mind that most currently available evidence comes from experimental studies and that studies on humans are still preliminary, there is a need for large-scale double-blind randomized trials to investigate the true potential of stem cell therapy for regenerating myocardium damaged by infarction and thus preventing progression to heart failure. Such studies are in fact under way and their results are eagerly awaited. What they must show is whether the new cell therapies aimed at myocardial regeneration reduce morbidity and/or mortality as well as improving cardiac function.

Stem cells also undergo senescence, associated with age-related apoptosis and telomere shortening in humans⁽⁷⁷⁾. This may result in diminished regeneration of ventricular myocytes, the accumulation of senescent parenchymal cells and the development of heart failure. It is thus likely that heart failure in the elderly is a form of stem cell disease, resulting from cell depletion over time and existing pathologies. This suggests that myocardial regeneration may have its limits; therapies using stem cells or growth factors may be beneficial in the treatment of myocardial infarction, but probably not in heart failure, when stem cells may already be senescent. One possible way to overcome this would be to produce stem cells with greater longevity and ability to divide⁽⁷⁸⁾. Stem cells could be rejuvenated by genetic modification targeting the telomerase system. The feasibility of this concept has recently been demonstrated in a study on telomerase-deficient transgenic mice, in which restoration of telomerase activity reversed chromosomal instability and premature ageing⁽⁷⁷⁾.

The future outlook

The fact that pluripotent cells are found in adult myocardium and can effectively repair damaged myocardial tissue raises a number of issues for the future.

Firstly, what is the best way to administer cells to ensure their viability in an environment as aggressive as ischemic tissue? Stem cells can resist stress, but they die without oxygen⁽⁷⁹⁾. This could be overcome by injecting them into the infarct border zone, where coronary flow is greater, or by the use of angiogenic factors⁽⁴⁴⁾ or antiapoptotic genes⁽⁸⁰⁾.

motivo são difíceis de isolar e purificar. Assim sendo, elas têm de ser isoladas e expandidas em cultura antes de serem administradas. Para que este processo tenha sucesso torna-se necessária a utilização de várias citocinas e factores de crescimento de forma a que a sua incorporação *in vivo* seja bem sucedida.⁽⁷⁰⁾

Desconhece-se actualmente se o benefício da transplantação celular é maior durante a fase aguda inflamatória, durante a fase tardia de remodelação, ou na fase mais tardia de desenvolvimento da miocardiopatia isquémica. Existem indícios que sugerem que a transplantação de células estaminais não é bem sucedida quando se realiza nos primeiros dias após o enfarte do miocárdio,⁽⁷¹⁾ quando o processo inflamatório é mais intenso, bem como após a formação da cicatriz na zona da necrose. Por esse motivo, a transplantação é recomendada entre os 7 e os 14 dias após o enfarte.⁽⁷²⁾

A estratégia ideal de entrega das células estaminais (intra-miocárdica, intracoronária ou sistémica), bem como a sua viabilidade e a função a longo prazo após a sua aplicação ainda não estão definidas neste momento.

A administração simultânea de um “cocktail celular” com várias linhas funcionais de células (por exemplo células que se transformam em miócitos e formam músculo e células que se transformam em células vasculares e originam vasos que alimentam o músculo), faz sentido do ponto de vista teórico ao ser sinérgico, mas a sua aplicação na prática ainda permanece por estabelecer.

Muitas questões permanecem ainda em aberto. Os mecanismos envolvidos na reparação miocárdica mediada por células não são ainda completamente compreendidos. Não se sabe porque motivo a injeção de fibroblastos no coelho pode melhorar a função diastólica de uma forma semelhante à que ocorre com mioblastos.⁽⁷³⁾ Também permanece por explicar porque motivo a injeção de mioblastos esqueléticos ou de células pluripotenciais derivadas da medula óssea induz uma melhoria semelhante da função sistólica ventricular.⁽⁷⁴⁾ Finalmente, estudos recentes puseram em questão a capacidade das células pluripotenciais derivadas da medula óssea em se diferenciarem em miócitos cardíacos.^(75, 76) Estes achados levantam a hipótese dos efeitos benéficos observados não serem devidos a uma verdadeira regeneração miocárdica, mas tão somente a efeitos

Emerging technologies will help to increase our knowledge of stem cells and of the regulatory mechanisms that govern their transformation into cardiomyocytes.

Further studies will be required to fully understand the mechanisms involved in the regeneration of resident populations of pluripotent cells in the myocardium, as well as the safety and efficacy of therapies using these cells in the treatment of heart disease. With autologous cells, there is no need for immunosuppressants or compatible donors.

Recent studies have shown that stem cells can be obtained from tissue fragments from myocardial biopsies⁽⁸¹⁾, although it is not yet known whether this method can provide sufficient numbers of cells to be therapeutically useful. If techniques can be developed to activate these resident cells and stimulate them to migrate to areas of damaged tissue and proliferate locally, this would be ideal, since such a method would avoid problems of rejection and invasive procedures. Growth factors such as G-CSF, HGF and IGF-1 could be used, but they must be administered in high doses to trigger cell mobilization and can also lead to development of neoplasms. Furthermore, their effect may also attract other cell types such as inflammatory cells to the infarct zone, promoting vascular thrombosis, worsening tissue destruction and enlarging the area of necrosis.

CONCLUSION

Myocardial regeneration therapy is still in its infancy. It has enormous potential to treat conditions in which cardiomyocytes have been destroyed, but much has to be learned before this therapy can become part of the therapeutic arsenal. Further knowledge of the physiological mechanisms involved in myocardial regeneration is required before its potential can be realized, and larger clinical trials are essential to evaluate its real value and safety.

There are currently more questions than answers regarding myocardial regeneration therapy, and so we must patiently await the results of clinical and basic research in the coming years.

indirectos desta terapêutica, tais como a promoção da angiogénese. Estudos futuros irão examinar o contributo específico da regeneração miocárdica e da angiogénese na melhoria funcional observada, uma vez que uma prova directa do envolvimento das células pluripotenciais na produção de cardiomiócitos ou vasos sanguíneos nunca foi inequivocamente demonstrado em ensaios clínicos.

Tendo em consideração que a maior parte dos dados actualmente disponíveis são baseados em estudos experimentais, e que os dados provenientes do Homem ainda são preliminares, torna-se necessário investigar o potencial da terapêutica com células estaminais na substituição do miocárdio destruído pelo enfarte, prevenindo assim o desenvolvimento de insuficiência cardíaca em ensaios clínicos aleatorizados duplamente cegos envolvendo um elevado número de doentes. Ensaios deste tipo estão actualmente a decorrer e os seus resultados são esperados com muita expectativa. No final, o que se pretende é provar, ou não, que esta nova terapêutica celular criada com o objectivo de regenerar o miocárdio, não só melhora a função, como ainda reduz a morbidade, a mortalidade, ou ambos.

As células estaminais podem também sofrer um processo de envelhecimento o qual se pode associar a um aumento da apoptose celular com a idade e a um encurtamento dos telómeros em humanos.⁽⁷⁷⁾ Esta situação pode resultar numa redução da regeneração dos miócitos ventriculares, na acumulação de células parenquimatosas idosas e no desenvolvimento de insuficiência cardíaca no idoso. É pois provável que a própria insuficiência cardíaca do idoso possa constituir uma forma de doença das células estaminais devido à sua exaustão em função do tempo e das condições patológicas existentes. Estas descobertas demonstram que a regeneração miocárdica pode ter limites. Assim sendo, a terapêutica usando células ou factores de crescimento podem ser úteis no tratamento do enfarte do miocárdio, mas provavelmente não serão úteis no tratamento da insuficiência cardíaca, onde as células estaminais podem estar já envelhecidas. Uma hipótese para ultrapassar esta situação seria a produção de células estaminais com uma maior longevidade e capacidade de divisão.⁽⁷⁸⁾ Uma maneira de produzir um rejuvenescimento das células

estaminais poderá ser a terapia genética dirigida para o sistema da telomerase. Uma prova de que este conceito é exequível foi recentemente demonstrada num rato transgénico deficiente em telomerase, no qual a restauração da actividade da telomerase foi capaz de prevenir a instabilidade cromossómica e o envelhecimento precoce.⁽⁷⁷⁾

Perspectivas Futuras

A observação de que as células pluripotenciais permanecem no tecido miocárdico adulto e são capazes de reparar de uma forma eficaz o tecido miocárdico lesado, levantam uma série de questões para o futuro que irão precisar de uma resposta adequada.

Em primeiro lugar, como poderemos administrar células de forma a permitir a sua viabilidade mais prolongada num ambiente tão agressivo como o tecido isquémico? De facto, as células pluripotenciais têm a capacidade de resistir ao stress, mas elas também morrem na ausência de oxigénio.⁽⁷⁹⁾ Esta situação poderá ser melhorada através da injeção destas células na zona limite do enfarte onde o fluxo de coronário é maior, através da utilização de factores angiogénicos,⁽⁴⁴⁾ ou de genes antiapoptóticos.⁽⁸⁰⁾

A aplicação de tecnologias emergentes irá no futuro permitir aumentar o nosso conhecimento sobre estas células pluripotenciais e sobre os mecanismos regulatórios que controlam a transformação destas células em cardiomiócitos.

Estudos futuros irão ser necessários para a compreensão dos mecanismos envolvidos na regeneração das populações residentes de células pluripotenciais no miocárdio, bem como a segurança e eficácia da terapêutica baseada em células pluripotenciais no tratamento de algumas doenças cardíacas. A utilização de células autólogas irá permitir eliminar a necessidade de utilização de agentes imunossuppressores, ou a necessidade de encontrar dadores compatíveis.

Alguns estudos recentes demonstraram que é possível obter células estaminais a partir de fragmentos de tecido obtidos em biópsias miocárdicas.⁽⁸¹⁾ No entanto, ainda permanece por esclarecer se este método será capaz de gerar um número suficientemente elevado de células para ser útil em termos terapêuticos. Esta população de células residentes seria a ideal para ser estimulada a proliferar localmente, e migrar para as zonas lesadas caso se desenvolvam no futuro os métodos de as activar selectivamente e estimular

a migrar. Esta metodologia teria a vantagem de não estar associada a fenómenos de rejeição e de não necessitar de procedimentos invasivos. Este efeito poderia ser obtido através da administração de alguns factores de crescimento tais como o G-CSF, HGF ou o IGF-1. No entanto, estes factores de crescimento apresentam a desvantagem de serem precisas doses elevadas para desencadear a mobilização celular. Eles apresentam também o potencial de facilitar o desenvolvimento de neoplasias. Para além disso, devido ao seu efeito, outras linhas celulares tais como células inflamatórias podem igualmente ser atraídos para a zona do enfarte promovendo a trombose vascular e o aumento da destruição tecidual e da área da necrose.

CONCLUSÃO

A terapêutica de regeneração miocárdica está a dar apenas os seus primeiros passos. Apesar de encerrar em si um enorme potencial futuro no tratamento de situações que se associam a uma destruição dos cardiomiócitos, ainda muito há para aprender até que esta terapêutica se possa afirmar eventualmente como fazendo parte do

nosso armamento terapêutico. Um melhor conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na regeneração miocárdica é necessário para se aproveitar ao máximo o seu potencial. Para além disso, ensaios clínicos de maior dimensão são fundamentais para se avaliar o real valor desta nova forma terapêutica, bem como o seu perfil de segurança.

As dúvidas são actualmente mais que as certezas no que concerne à terapêutica de regeneração miocárdica. Resta-nos pois aguardar calmamente pelos resultados que irão surgir da investigação clínica e básica nos próximos anos.

Pedidos de separatas para:

Address for reprints:

LINO M. GONÇALVES

Serviço de Cardiologia

Hospitais da Universidade

3000-075 Coimbra

E-mail: lgoncal@ci.uc.pt

BIBLIOGRAFIA / REFERENCES

1. Poss KD, Wilson LG, Keating MT. Heart regeneration in zebrafish. *Science* 2002;298:2188-90.
2. Bettencourt-Dias M, Mitnacht S, Brookes JP. Heterogenous proliferative potential in regenerative adult newt cardiomyocytes. *J Cell Sci* 2003;116:4001-9.
3. Pasumarthi KB, Nakajima H, Nakajima HO, Soonpaa MH, Field LJ. Targeted expression of cyclin D2 results in cardiomyocyte DNA synthesis and infarct regression in transgenic mice. *Circ Res* 2005;96:110-8.
4. Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *New Engl J Med* 2001;334:1750-7.
5. Nelissen-Vrancken HJ, Debets JJ, Snoeckx LH, Daemen MJ, Smits JF. Time-related normalization of maximal coronary flow in isolated perfused hearts of rats with myocardial infarction. *Circulation* 1996;93:349-55.
6. Kocher AA. Bone-marrow-derived stem cells for ischemic hearts. *Wien Klin Wochenschr* 2003;115:77-9.
7. Menasché P, Hagege AA, Scorsin M, et al. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 2001;357:279-80.
8. Hagege AA, Carrion C, Menasché P, et al. Viability and differentiation of autologous skeletal myoblast grafts in ischemic cardiomyopathy. *Lancet* 2003;361:491-92.
9. Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation* 2003;107:2294-302.
10. Matsuzaki Y, Kinjo K, Mulligan RC, Okano H. Unexpectedly efficient homing capacity of purified murine hematopoietic stem cells. *Immunity* 2004;20:87-93.
11. Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res* 2004;95:9-20.
12. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002;418:41-9.
13. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002;106:3009-17.
14. Losordo DW, Dimmeler S. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease: part II: cell-based therapy. *Circulation* 2004;109:2692-7.
15. Planat-Benard V, Menard C, Andre M, et al. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circ Res* 2004;94:223-9.
16. Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from

- postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol* 2002;30:896-904.
17. Kogler G, Sensken S, Airey JA, et al. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 2004;200:123-35.
18. Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:12313-18.
19. Jackson KA, Majka SM, Wang H, et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2001;107:1395-1402.
20. Orlic D, Kajstura, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001;410:701-5.
21. Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, et al. Chimerism of the transplanted heart. *New Engl J Med* 2002;346:5-15.
22. Muller P, Pfeifer P, Koglin J, et al. Cardiomyocytes of noncardiac origin in myocardial biopsies of human transplanted hearts. *Circulation* 2002;106:106:31-5.
23. Höcht-Zeisberg E, Kahnert H, Guan K, et al. Cellular repopulation of myocardial infarction in patients with sex-mismatched heart transplantation. *Eur Heart J* 2004;25:749-58.
24. Pfeiffer P, Müller P, Seeland U, Schäfers HJ, Böhm M. Time-dependent cardiac chimerism. *Eur J Heart Fail Suppl* 2003;2:136-7.
25. Kajstura J. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:8801-5.
26. Anversa P, Nadal-Ginard B. Myocyte renewal and ventricular remodeling. *Nature* 2002;415:240-3.
27. Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P. Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res* 2003;92:139-50.
28. Oh H, Prahlah A, Sano M, et al. Telomere attrition and Chk2 activation in human heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:5378-83.
29. Losordo DW, Dimmeler S. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease: part I: angiogenic cytokines. *Circulation* 2004;109:2487-91.
30. Olson EN, Schneider MD. Sizing up the heart: development redux in disease. *Genes Dev* 2003;17:1937-56.
31. Asahara T, Takahashi T, Masuda H, et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone-marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J* 1999;18:3964-72.
32. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, et al. Ischemia and cytokine-induced mobilization of bone-marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 1999;5:434-438.
33. Hattori K, Heissig B, Tashiro K, et al. Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood* 2001;97:3354-60.
34. Hattori K, Heissig B, Wu Y, et al. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone marrow microenvironment. *Nat Med* 2002;8:841-49.
35. Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, et al. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood* 2003;102:1340-46.
36. Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, et al. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via a PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest* 2001;108:391-97.
37. Laufs U, Werner N, Link A, et al. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation* 2004;109:220-26.
38. Iwakura A, Luedemann C, Shastry S, et al. Estrogen-mediated endothelial nitric oxide synthase-dependent mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells contributes to reendothelization after arterial injury. *Circulation* 2003;108:3115-21.
39. Orlic D, Kajstura, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001;410:701-5. [71]
40. Chavakis E, Aicher A, Heeschen C, et al. Role of b2-integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells. *J Exp Med* 2005;201:63-72.
41. Papayannopoulou T. Bone marrow homing: the players, the playfield, and their evolving roles. *Curr Opin Hematol* 2003;10:214-9.
42. De Palma M, Venneri MA, Roca C, Naldini L. Targeting exogenous genes to tumor angiogenesis by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. *Nat Med* 2003;9:789-95.
43. Fuchs S, Baffour R, Zhou YF, et al. Transendocardial delivery of autologous bone marrow enhances collateral perfusion and regional function in pigs with chronic experimental myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:1726-32.
44. Askari A, Unzek S, Goldman CK, et al. Cellular, but not direct, adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor results in improved left ventricular function and neovascularization in dilated ischemic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:1908-14.
45. Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, et al. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* 2001;108:407-14.
46. Xu C, Police S, Rao N, Carpenter MK. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Circ Res* 2002;91:501-8.
47. Fairchild PJ, Cartland S, Nolan KF, Waldmann H. Embryonic stem cells and the challenge of transplantation tolerance. *Trends Immunol* 2004;25:465-70.
48. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *2003;114:763-76.*
49. Strauer B, Brehm M, Zeus T, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002;106:1913-18.
50. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 2004;364:141-8.
51. Fernandez-Aviles F, San Roman JA, Garcia-Frade J, et al. Experimental and clinical regenerative capability of human bone marrow cells after myocardial infarction. *Circ Res* 2004; 95:742-8.

52. Müller P, Böhm M. Chimerism as a mechanism of self-repair. *Circulation* 2003;107:e69.
53. Anversa P, Nadal-Ginard B. Cardiac chimerism: methods matter. *Circulation* 2002;106:e121-e131.
54. Tse HF, Kwong YL, Chan JK, Lo G, Ho CL, Lau CP. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet* 2003;361:47-49.
55. Fuchs S, Staler LF, Kornowski R et al. Catheter-based autologous bone marrow myocardial injection in no-option patients with advanced coronary artery disease: a feasibility study. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:1721-4.
56. Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, et al. Improved exercise capacity and ischemia 6 and 12 months after transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 2004;110:II213-8.
57. Beauchamp JR, Morgan JE, Pagel CN, Partridge TA. Dynamics of myoblast transplantation reveal a discrete minority of precursors with stem cell-like properties as the myogenic source. *J Cell Biol* 1999;144:626-33.
58. Aicher A, Brenner W, Zuharyra M, et al. Assessment of the tissue distribution of transplanted human endothelial progenitor cells by radioactive labeling. *Circulation* 2003;107:2134-9.
59. Zhang YM, Hartzell C, Narlow M, Dudley SC Jr. Stem cell-derived cardiomyocytes demonstrate arrhythmic potential. *Circulation* 2002;106:1294-9.
60. Dengler TJ, Katus HA. Stem cell therapy for the infarcted heart. *Hertz* 2002;27:598-610.
61. Koh GY, Klug MG, Soonpaa MH, Field LJ. Differentiation and long-term survival of c2c12 myoblast grafts in heart. *J Clin Invest* 1993;92:1548-1554.
62. Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P et al. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med* 1998;4:929-33.
63. Menasché P, Hagege AA, Vilquin JT, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003 ;41:1078-83.
64. Reinecke H, Poppa V, Murry CE. Skeletal muscle stem cells do not transdifferentiate into cardiomyocytes after cardiac grafting. *J Mol Cell Cardiol* 2002;34:241-9.
65. Leobon B, Garcin I, Menasche P, Vilquin JT, Audinat E, Chapak S. Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:7808-11.
66. Yoon YS, Park JS, Tkebuchava T, Luedeman C, Losordo DW. Unexpected severe calcification after transplantation of bone-marrow cells in acute myocardial infarction. *Circulation* 2004;109:3154-7.
67. Vulliet PR, Greeley M, Halloran SM, MacDonald KA, Kinleson MD. Intra-coronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs. *Lancet* 2004;363:783-4.
68. Kang HJ, Kim HS, Zhang SY, et al. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilized with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet* 2004;363:751-6.
69. Matsubara H. Risk to the coronary arteries of intracoronary stem cell infusion and G-CSF cytokine therapy. 2004;363:746-7.
70. Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 2003;9:702-12.
71. Frangogiannis NG, Smith CW, Entman MI. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2002;53:31-47.
72. Lee MS, Makkar RR. Stem-cell transplantation in myocardial infarction: a status report. *Ann Intern Med* 2004;140:729-37.
73. Hutcheson KA, Atkins BZ, Hueman MT, Hopkins MB, Glower DD, Taylor DA. Comparison of benefits on myocardial performance of cellular cardiomyoplasty with skeletal myoblasts and fibroblasts. *Cell Transplant* 2000;9:359-68.
74. Thompson RB, Emani SM, Davis BH, et al. Comparison of intracardiac cell transplantation: autologous skeletal myoblasts versus bone marrow cells. *Circulation* 2003;108:II264-71.
75. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 2004;428:664-8.
76. Nygren JM, Jovinge S, Breitbach M et al. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nature* 2004;10:494-501.
77. Samper E, Flores JM, Blasco MA. Restoration of telomerase activity rescues chromosomal instability and premature aging in *Terc*^{-/-} mice with short telomeres. *EMBO Rep* 2001;2:800-7.
78. Mangi AA, Noiseux N, Kong D, et al. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat Med* 2003;9:604-13.
79. Ramalho-Santos M, Yoon SJ, Matsuzaki Y, Mulligan RC, Melton DA. "Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. *Science* 2002;298:597-600.
80. Mangi AA, Noiseux N, Kong D, et al. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat Med* 2003;9:1195-1201.
81. Messina E, De Angelis L, Frati G, et al. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res* 2004;95:911-21.