

Aplicaciones clínicas de *stem cells* en terapia cardiovascular

Héctor H. Tacchi*

A pesar del enorme progreso en el armamento terapéutico cardiovascular, el tratamiento de la insuficiencia cardíaca (IC) sigue siendo un gran desafío. El trasplante cardíaco ortotópico es considerado el *gold standard* para el tratamiento de pacientes que permanecen refractarios al tratamiento médico óptimo. Sin embargo, esta opción es limitada por varios problemas como el rechazo agudo y, principalmente, la diferencia entre el número de donantes y el número de receptores.

La reducción de los factores de riesgo, el tratamiento farmacológico con beta bloqueantes, inhibidores de la enzima de conversión (IECA) y otras drogas; las intervenciones de revascularización por medio de la hemodinamia intervencionista o la cirugía; la implantación de aparatos de asistencia en el ventrículo izquierdo (AAVI), en general como puente al trasplante; la terapéutica de resincronización, han mejorado la calidad de vida de los pacientes con IC. Muchas de estas opciones terapéuticas han fracasado en su aplicación sobre la causa del problema, caracterizado por una circulación coronaria comprometida al miocardio, debido a la oclusión aterosclerótica junto a la disfunción miocárdica y pérdida irreversible de cardiomiocitos.

El concepto de que el corazón es un órgano postmitótico incapaz de auto renovarse ha cambiado recientemente. Hay pruebas concretas de que algunos cardiomiocitos pueden ser capaces de reentrar en el ciclo celular y provocar una limitada regeneración a través de *stem cells* (SC) residentes y circulantes¹. Aun cuando las células derivadas de los cardiomiocitos residentes o de SC circulantes tengan capacidad regenerativa después de un infarto agudo de miocardio (IAM), su aptitud para detener los efectos deletéreos de la remodelación ventricular es muy limitada. La angiogénesis es usualmente insuficiente para encontrar la gran demanda de oxígeno y nutrientes y prevenir la apoptosis de los cardiomiocitos hipertrofiados y la remodelación ventricular. Por lo tanto, aumentando la perfusión al miocardio infartado para mejorar la liberación de oxígeno y nutrientes a través de la formación de nuevos vasos sanguíneos mejorarían la función del miocardio. Por ese motivo, el paso siguiente lógico es tratar de repoblar el miocardio dañado que presenta necrosis con SC, con el objeto de intentar

regenerar los cardiomiocitos y revertir la remodelación ventricular e impedir la IC.

Conceptualmente, una variedad de poblaciones de células progenitoras y SC podrían ser usadas para el reparo cardíaco o cardiomioplastia celular, definida como el reemplazo o la regeneración de los cardiomiocitos a través del trasplante de células².

La repoblación de cardiomiocitos para regenerar nuevo miocardio puede ser logrado con uno de los siguientes métodos: el miocardio necrótico puede ser reemplazado trasplantando células que se diferencian en cardiomiocitos o promueven la neovascularización. Otro método involucra a las citocinas como el factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF) y los *factores de stem cells* (SCF), los que aumentan la movilización de SC desde la médula ósea, los guía hacia el lugar que las requieren y al injerto en el miocardio infartado³. El proceso de reparo endógeno después de la necrosis miocárdica puede también estar aumentado con factores de crecimiento específicos como factores de crecimiento hepático y similar a la insulina, que estimulan la duplicación de los cardiomiocitos y atraen SC residentes cardíacas^{4,5}.

La capacidad migratoria de las células progenitoras trasplantadas podría depender de factores de crecimiento naturales tal como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor 1 derivado de las células estromales (SDF-1). La expresión de estos factores está aumentada en los tejidos hipóxicos, sustentando la hipótesis de que estos factores pueden representar las señales guías para el alistamiento de células progenitoras circulantes para asistir al mecanismo de reparo endógeno en el tejido infartado⁶⁻⁸.

Donantes celulares

Una amplia variedad de diferentes donantes de células que podrían reemplazar el miocardio necrótico han sido usadas en estudios en animales y en estudios clínicos como terapia de SC (Tabla 1)².

El origen potencial de las células para el reparo de tejidos son células propias *self* (autólogas), de la misma especie (allogénicas), de diferentes especies (xenogénicas), de líneas de células primarias o inmortalizadas, y células donantes derivadas de SC adultas. Actualmente, sólo SC derivadas de donantes de la misma especie o allogénicas han sido usados en la terapia celular en el hombre.

En la actualidad, la potencial transdiferenciación de algunas SC adultas ha sido bien caracterizada, como las SC hemato-

* Jefe Unidad de I.C. Instituto Alexander Fleming.
Ciudad de Buenos Aires. República Argentina.
Correspondencia: Dr. Héctor E. Tacchi.
Moldes 2166, PB "C"
(1428) Ciudad Autónoma de Buenos Aires. República Argentina.
E-mail: hectortacchi@uolsinetis.com.ar
Trabajo recibido: 26/6/2006 Trabajo aprobado: 4/8/2006

poéticas (HSC) o las SC mesenquimales (MSC); en otras muchas SC adultas son controvertidos los datos, en parte como consecuencia de las condiciones de cultivo y las contaminaciones o los eventos de fusión celular. Al margen de estas limitaciones, podemos decir que la investigación de las SC humanas (embrionarias y adultas) pueden ayudar a millones de personas que están afectadas por enfermedades intratables.

Identificación de *stem cells* adultas

Las SC son células indiferenciadas definidas por su habilidad a nivel de una célula simple de auto-renovarse y diferenciarse para producir una progenie de células maduras, incluyendo células efectoras progenitores no renovables y terminalmente diferenciadas. Las SC han sido clasificadas por su potencial para desarrollarse como: *totipotentes*, capaces de dar origen a todos los tipos de células embrionarias y extra-embriónicas; *pluripotentes*, capaces de dar origen a todos los tipos de células del propio embrión; *multipotentes*, capaces de dar origen a un subgrupo de linaje de células; *oligopotentes*, capaces de dar origen a un más restringido subgrupo de estirpe de células que las multi-potentes; y finalmente las *unipotentes*, capaces de contribuir sólo con un tipo de célula madura⁹.

Actualmente, una variedad de células progenitoras adultas están siendo evaluadas clínicamente, todas autólogas, de modo que el rechazo es obviado. Cada tipo de célula tiene su propio perfil de ventajas, limitaciones, y beneficios de practicabilidad en circunstancias clínicas específicas.

Las SC son los verdaderos padres de las células especializadas que imparten la función a tejidos y órganos. A lo largo de la vida post natal, las SC regeneran tejidos que continuamente pierden células a través de la maduración y el envejecimiento. Mientras algunos tejidos, tal como la sangre, piel, intestino, tracto respiratorio y testículo, deben perpetuamente y renovarse, la mayoría de las células y tejidos en los mamíferos adultos exhiben muy bajo recambio en circunstancias normales; algunos de ellos responden pobremente a la presión regenerativa (ej.: corazón), mientras otros responden bien (ej.: hígado).

La primera entidad de la vida, el huevo fertilizado, tiene la habilidad de generar un organismo total. Esta capacidad definida como totipotencia, es retenida por la progenie temprana del cigoto hasta el estado de mórula con 8 células. Subsecuentemente, la diferenciación de las células provoca la formación de un blastocisto compuesto de una capa de células externas o trofoblastos y un grupo de células internas indiferenciadas llamadas *inner cell mass* (ICM). Las células del ICM ya no son totipotentes, pero retienen la capacidad de desarrollarse dentro de todos los tipos de células del embrión apropiado (pluripotentes).

En los tejidos adultos, las SC multipotentes y las células progenitoras existen en tejidos y órganos para reemplazar las células dañadas o perdidas.

A) *Stem cells* para el reparo cardíaco

Para llevar a cabo la terapia celular destinado al reparo miocárdico o cardiomioplastia celular, el tratamiento con SC requiere la liberación de las células en forma sistémica o localmente con técnicas ya establecidas. Las células injer-

tadas luego deben proliferar para proporcionar un nuevo tejido adecuado antes de la diferenciación dentro de los cardiomiocitos funcionales que se acoplen mecánica y eléctricamente con el miocardio receptor.

Podemos identificar tres tipos principales de SC: las embrionarias, las de tejidos específicos, y las de derivados de la médula ósea¹⁰.

1.- *Stem cells* embrionarias

Las SC embrionarias son totipotentes derivados de la masa celular interna de los blastocistos. Son células indiferenciadas que poseen un enorme potencial de desarrollo en su estado temprano. Se pueden diferenciar en las tres capas del germen embriológico. Son las más versátiles de todas las SC y tienen la capacidad de sufrir un número indeterminado de duplicación, y de diferenciarse dentro de tipos de células específicas, incluyendo los cardiomiocitos. Fueron las primeras SC humanas aisladas en 1998¹¹ desde las ICM de embriones donados de parejas quienes habían sido sometidos a reproducción asistida.

En experimentos en ratas, estas células inyectadas directamente en el miocardio, se injertaban exitosamente en el huésped, reducían el tamaño del infarto, y mejoraban la función del ventrículo izquierdo. Los cardiomiocitos derivados de las SC embrionarias humanas, disponen propiedades funcionales de los cardiomiocitos en estado temprano que acoplan eléctricamente con los cardiomiocitos huéspedes cuando son trasplantados en el miocardio normal. Sin embargo, problemas éticos y legales, acerca de la tumorigenicidad de las células y la necesidad de usar células allogénicas para el trasplante, impiden su uso en los estudios clínicos. De modo que las SC embrionarias no están aprobadas para el uso humano. En teoría, infinitos números de cardiomiocitos podrían ser obtenidos de clones de SC embrionarias humanas. Eventualmente, la técnica de transferencia nuclear puede proporcionar un medio para la generación de suministro ilimitado de SC embrionarias histo-compatibles para el tratamiento de las enfermedades cardíacas (terapia clónica).

2.- *Stem cells* derivadas de tejidos específicos

Mioblastos esqueléticos. Llamadas también células satélites, son células progenitoras que están normalmente en estado quiescentes bajo la membrana basal de las fibras musculares maduras. Pueden ser aisladas de biopsias de músculo esquelético y luego trasplantadas dentro del miocardio, obviando la necesidad de la inmunosupresión (autólogas). Poseen un alto grado de duplicación en cultivos. Debido a que los pacientes con enfermedad arterial coronaria con frecuencia tienen áreas de cicatriz con pobre perfusión, su fuerte resistencia a la isquemia permite que los mioblastos esqueléticos sobrevivan y se injerten en el miocardio huésped. Los mioblastos esqueléticos se diferencian en miotúbulos y retienen propiedades del músculo esquelético cuando son trasplantados dentro de la cicatriz de un infarto. Aunque los miotúbulos no se acoplan electromecánicamente con los cardiomiocitos residentes, se observó que los mioblastos trasplantados aumentan la performance sistólica y diastólica en modelos animales con infarto. La mejoría de la

contractilidad miocárdica correlacionaba con la cantidad de mioblastos implantados. Sin embargo, futuras aplicaciones de mioblastos esqueléticos pueden ser limitadas debido a su asociación con taquiarritmias ventriculares. Además, las células del músculo esquelético tienen diferencias biológicas fundamentales cuando se comparan con los cardiomiocitos adultos. Los mioblastos esqueléticos son incapaces de formar *gap junctions*, llevando a la falla del acoplamiento electromecánico exitoso y hacerlos incapaces de contraerse sincrónicamente con el miocardio huésped después del trasplante.

Desde el punto de vista clínico, es un procedimiento que todavía no ha sido efectuado en grupos grandes de pacientes, en estudios randomizados, etc. Es utilizado en pacientes con infarto crónico con presencia de secuela necrótica y se realiza acompañando a la cirugía coronaria. En un trabajo de Menasché y col. publicado en el 2003, en donde concluyen que los datos del mismo muestran que el trasplante de mioblastos esqueléticos autólogos es un procedimiento factible y seguro, pero se requieren trabajos randomizados para caracterizar la relación riesgo/beneficio de esta práctica¹².

Un estudio publicado recientemente por Dib y col. concluye que el trasplante epicárdico de mioblastos esqueléticos autólogos es factible y seguro, no refieren muertes relacionadas directamente al trasplante, ni infecciones. Además fue acompañado de aumento de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI), reducción de los volúmenes ventriculares sistólico y diastólico, e incremento de tejido viable. Sin embargo, los cambios pueden ser atribuidos a los beneficios de la cirugía de revascularización. Por lo que son necesarios estudios más importantes para evaluar este concepto. En este estudio, se reportan como importantes eventos adversos la presencia de taquicardia ventricular no sostenida en 3 de 24 pacientes que requirieron medicación y cardiodesfibrilador¹³.

3.- Stem cells derivadas de la médula ósea (BMSCs)

La médula ósea contiene SC del sistema hematopoyético (HSCs) y otras células que forman el estroma y sostienen el tejido alrededor de los HSCs. Estas células también se llaman mesenquimales y pueden diferenciarse en una variedad de células no hematopoyéticas, incluyendo cardiomiocitos y células endoteliales (ECs). Las BMSCs pueden aislarse desde la circulación; son multipotentes y tienen la capacidad de diferenciarse en diversas progenies de células diferenciadas, incluyendo huesos, células hematopoyéticas, células miocárdicas y células endoteliales.

La documentación que nos reportan sobre las BMSCs adultas, que son capaces de la generación de células maduras más allá de la frontera de su propio tejido ha alentado una inesperada y poderosa nueva forma de terapia celular.

A pesar de que las BMSCs son a quien se le han dedicado la mayor cantidad de escritos en la literatura médica, todavía no hay consenso sobre la plasticidad de las mismas, y a los resultados de los trabajos experimentales de distintos laboratorios. Recientes publicaciones en ratones enfatizaron re-

sultados negativos. Otro reporte sugiere que el injerto de BMSCs en el corazón dañado es transitorio y de naturaleza hematopoyética. Los cardiomiocitos derivados de las BMSCs fueron observados a una baja frecuencia y sólo fuera del miocardio infartado¹⁴.

Estos resultados disímiles se pueden deber a varias causas, entre ellas a la utilización de diferentes protocolos experimentales; diferente metodología en la obtención de las nuevas estructuras formadas; diferencias en la viabilidad en las células inyectadas, etc.

Lo que necesita resolución, es saber si las BMSCs inyectadas directamente en el infarto, en el borde del mismo o sistémicamente, se diferencian en linajes de células cardíacas y contribuyen a la regeneración miocárdica¹⁵.

Desde un punto de vista práctico, se pueden utilizar tres opciones¹⁶:

La primera opción es el trasplante de células de la médula ósea total, no fraccionadas. Esto es clínicamente atractivo debido a su aparente simplicidad en la que ello impone la aspiración de la médula ósea desde la cresta ilíaca y, después de eliminar las células rojas, se realiza la reinyección de lo aspirado dentro de la cicatriz post infarto. La segunda opción es seleccionar una población bien definida de progenitores hematopoyéticos asumiendo que su plasticidad permitiría a ellas transdiferenciarse en respuesta a como se presenta el medio en el órgano elegido, más precisamente, para convertir dentro de células cardíacas o endoteliales o ambas después del injerto en el miocardio. Una tercera opción es el uso de las células mesenquimales de la médula ósea, las que son fáciles de coleccionar y expandir. En estudios experimentales en animales pequeños y grandes de modelos de infarto se ha observado la diferenciación en células cardíacas y vasos sanguíneos.

Además, la médula ósea también contiene células progenitoras endoteliales (EPCs) que tienen la capacidad de iniciar la neovascularización para aliviar la isquemia miocárdica. La fracción mononuclear de la médula ósea consiste en varias sub poblaciones que tienen el potencial de participar en el reparo y regeneración del miocardio enfermo *in vivo* a través de la transdiferenciación en cardiomiocitos e iniciar la neovascularización expresando varias citocinas angiogénicas. Por lo tanto, la fracción mononuclear heterogénea de la médula ósea es la población de SC más promisoría para la cardiomioplastia celular.

4.- Stem cells mesenquimales (MSCs)

Las MSCs representan una rara población de células presentes en el estroma de la médula ósea, son las SC multipotentes no hematopoyéticas de la médula ósea. En el adulto, la médula ósea y la circulación sistémica constituyen el principal origen de las MSCs¹⁷. Son altamente proliferativas, clonogénicas y capaces de formar colonias de diferente tamaño y densidad, compuestas de varios linajes mesenquimales. Las MSCs pueden adquirir múltiples fenotipos incluyendo osteoblastos, condrocitos, adipositos y células símil neuronas. La recolección autóloga y el trasplante de SC mesenquimales elimina el problema del inmunorrechazo y convierte a ellas en candidatos potenciales para la terapia

con SC después del IAM.

La aplicación clínica de las MSCs para la regeneración de cartílago y hueso es un buen ejemplo de seguridad y eficacia de este grupo de SC.

Reportes en animales han mostrado que las MSCs de la médula ósea se alojan en el corazón y promueven la regeneración del miocardio infartado en diferentes especies, posiblemente involucrando un efecto paracrino¹⁸. Si las MSCs serán implementadas en el manejo de la IC isquémica en los humanos es difícil predecir, pero es una probable posibilidad¹⁵.

Las células miogénicas derivadas de las MSCs¹⁹ y las MSCs indiferenciadas autólogas²⁰ han sido empleadas en el reparo cardíaco después del infarto o la injuria de la isquemia-reperfusión en cerdos. En todos los casos, la regeneración miocárdica fue documentada y la reconstitución del miocardio muerto correlacionaba con la mejoría de la función ventricular y la reaparición de la actividad de la pared. La liberación intracoronaria de MSCs después del infarto en perros, lleva a la diferenciación de las MSCs en fibroblastos en la región cicatrizada y a la regeneración de los miocitos en la región sobreviviente, en la porción no afectada de la pared ventricular²¹.

Debido al limitado número de SC que pueden ser cosechadas desde la médula ósea, las medidas para estimular y aumentar su movilización, incluyendo la administración de G-CSF y la expansión en cultivos pueden ser necesarias.

5.- Células progenitoras endoteliales (EPCs)

Las células progenitoras endoteliales circulan en la sangre periférica y contribuyen a la neovascularización. La neovascularización puede salvar el miocardio hibernado, inhibir la apoptosis del cardiomiocito hipertrofiado en la vecindad del infarto, y mejorar la función cardíaca después del IAM. En el IAM, hay elevada movilización de células progenitoras endoteliales desde la médula ósea dentro de la sangre periférica²². La expresión miocárdica del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), está aumentada⁸ y se cree que es el principal contribuyente de la elevada movilización de las células progenitoras en el IAM.

En estudios experimentales, las células progenitoras endoteliales migraban al área del infarto, se transdiferenciaban en células endoteliales, aumentaban la formación capilar en el tejido circundante, y disminuía el número de cardiomiocitos apoptóticos en la región peri infarto²³. Hubo también una reducción en la remodelación ventricular, y mejoría en la función ventricular. Además de su rol en la neovascularización, las células progenitoras endoteliales pueden transdiferenciarse en cardiomiocitos y contribuir a la regeneración miocárdica^{24,25}.

Los pacientes con enfermedad arterial coronaria tratados con estatinas tenían más alto número de células progenitoras endoteliales circulantes²⁶. Las estatinas también modulaban la adhesividad de las células y aceleraban el reparo endotelial en los sitios de injuria arterial²⁷.

6.- Stem cells residentes cardíacas (CSCs)

La presencia de poblaciones de CSCs residentes capaces de

diferenciarse en cardiomiocitos o en linaje vascular sugiere que estas células podrían ser usadas para el reparo cardíaco. La inyección intramiocárdica de ellas después de un infarto en ratones promueve la formación de cardiomiocitos y células vasculares y lleva al aumento de la función sistólica. Si estos hallazgos pueden ser reproducidos, hay esperanza de aplicación clínica.

7.- Cardiomiocitos fetales

Los estudios tempranos con cardiomiocitos fetales han sido fundamentales para establecer la "prueba de concepto" mostrando en modelos de IAM en animales pequeños que estas células injertaban efectivamente en las áreas injuriadas, desarrollando comunicaciones con los cardiomiocitos huéspedes a través de *gap functions* sostenidos por la conexina 43 y mejoraban la función del ventrículo izquierdo (VI)^{28,29}. La estabilidad de estos resultados en el tiempo es sustentado por datos recientes que mostraron que los cardiomiocitos fetales injertados son aun detectados en las áreas del infarto después de 6 meses del trasplante y se asocian con engrosamiento de la pared VI, aumento de la FEVI y reducida diskinesia evaluada por angiografía³⁰.

Sin embargo, desde una perspectiva clínica el trasplante de células cardíacas fetales surgen puntos importantes relacionados a la ética, disponibilidad, y antigenicidad que cuestionan la aplicabilidad en gran escala de estas células.

Estas células trasplantadas sobreviven un corto tiempo debido a que son lentamente eliminadas por el inmuno rechazo. El futuro rol de los cardiomiocitos fetales en los estudios clínicos parece ser limitado, especialmente con el uso de trasplante de células autólogas.

B) Stem cells para el reparo vascular

El principal problema en la IC isquémica es un insuficiente suministro de sangre debido a las obstrucciones arteriales coronarias, y en el caso de que nuevos miocitos puedan ser generados, ellos requieren un sistema vascular íntegro. Actualmente, no se conoce si la terapia celular para regenerar nuevo miocardio iniciará una angiogénesis en el huésped suficiente para dar un adecuado suministro de sangre, o si se requiere un tratamiento adicional para lograr este objetivo.

La formación de vasos totalmente nuevos comienza con la vasculogénesis, la formación de islas de sangre desde los hemangioblastos, los precursores comunes de los SC endoteliales y las células sanguíneas, mientras que la angiogénesis se refiere a la formación de una nueva red vascular como resultado del crecimiento, formación de puentes e intususcepción de vasos existentes. Los nuevos tubos de células endoteliales agrupan células mesenquimales localmente para diferenciarse en pericitos y células de músculo liso vascular (VSMCs), un proceso llamado arteriogénesis. La insuficiente arteriogénesis provoca un permeable y pobre funcionamiento de los tubos de células endoteliales. El desarrollo de un sistema vascular maduro compromete la coordinada expresión de múltiples factores angiogénicos, y el completo repertorio de señales moleculares y factores angiogénicos requeridos para crear un maduro sistema vascular es actualmente desconocido.

Modos de liberación de las células

El objetivo de cualquier estrategia de liberación es trasplantar un número suficiente de células dentro de la región miocárdica de interés y alcanzar la máxima cantidad de células dentro de aquella área. La retención puede ser definida como la fracción de células trasplantadas retenidas en el miocardio por un corto período de tiempo (horas). El medio local es un importante determinante de la retención de las células.

Aplicación transvascular:

- Infusión intraarterial.
- Infusión intravenosa.
- Movilización de SC y células progenitoras.

Inyección directa en la pared ventricular:

- Inyección trans-endocárdica.
- Inyección trans-epicárdica.
- Inyección trans-vena coronaria

A) Aplicación transvascular

La estrategia transvascular es especialmente apropiada para el tratamiento del miocardio recientemente infartado y reperfundido, cuando los quimioattractantes y las moléculas de adhesión son altamente expresadas.

Infusión arterial intracoronaria. Este método libera la máxima concentración de células homogéneamente en un sitio de injuria miocárdica. Las BMCs no seleccionadas, las células progenitoras derivadas de la sangre circulante, y las MSCs han sido usadas por esta ruta en pacientes con IAM. Se utiliza un catéter con balón que se insufla transitoriamente para maximizar el tiempo de contacto de las células con la microcirculación de la arteria relacionada al infarto.

Infusión intravenosa. Con esta estrategia, la anidación (*homing*) de las células a tejidos no cardíacos limita su aplicabilidad clínica.

Movilización de células progenitoras y stem cells. Se ha postulado que durante el IAM se incorporan células progenitoras y SC circulantes al sitio de injuria y la movilización por citocinas puede ofrecer una estrategia no invasiva para la regeneración cardíaca.

B) Inyección directa en la pared ventricular

Es la ruta preferida para la liberación de células en pacientes que se presentan tarde en el proceso de la enfermedad coronaria, cuando la arteria ocluida excluye la liberación de células transvasculares (isquemia crónica) o cuando las señales de anidación de las células son expresadas en niveles bajos en el corazón (escara tisular). La técnica de inyección directa es usada especialmente para la aplicación de células grandes, tal como MSCs o mioblastos, los que pueden causar microembolización después de la liberación intracoronaria.

Inyección trans-endocárdica. Usando una aguja catéter avanzada a través de la válvula aórtica y puesta en contra de la superficie endocárdica, las células pueden directamente inyectarse en la pared del VI. El mapeo electromecánico de la superficie endocárdica puede ser usado para delinear el miocardio viable isquémico, y cicatrizado, antes de la in-

yección de células.

Inyección trans-epicárdica. Ha sido realizada como una técnica adjunta a la cirugía coronaria. Esto permite una visualización directa del miocardio y del blanco para la aplicación de células en áreas cicatrizadas y/o las zonas bordes de la cicatriz del infarto. La eficacia de las células trasplantadas es difícil de evaluar porque no se puede averiguar cuanto depende de la cirugía misma.

Inyección trans-vena coronaria. Se ha utilizado en estudios en pacientes con miocardiopatía isquémica para liberar mioblastos a áreas de miocardio no viable. Al contrario de la vía trans-endocárdica, donde las células son inyectadas perpendicular a la pared ventricular, por esta vía el sistema de liberación de células es paralelo a la pared ventricular y profundo dentro del miocardio injuriado, pero este método no es trivial en todos los casos.

Aplicaciones clínicas de la terapia con *stem cells*

Las siguientes serían las situaciones clínicas donde se halla indicada la terapia celular:

- Infarto agudo de miocardio.
- Enfermedad coronaria crónica sin opción de revascularización.
- Cardiomiopatía isquémica. Insuficiencia cardíaca crónica de cualquier etiología.

A) Infarto agudo de miocardio

Las modernas estrategias de reperfusión y los avances en el manejo farmacológico provocaron un aumento en la proporción de sobrevivientes de un IAM, elevando el riesgo de desarrollar remodelación adversa del VI e IC. La terapia celular pretende ser el tratamiento de las causas de la remodelación (ej.: el daño de los cardiomiocitos y de la vasculatura en el área infartada).

Antecedentes experimentales. Estudios tempranos inyectaron HSCs en el borde de una zona infartada después de la ligadura de la coronaria en ratones, y varios días más tarde, el área infartada fue reemplazada por miocardio recientemente formado con miocitos derivados de HSCs y estructuras vasculares³¹. Hubo transdiferenciación a cardiomiocitos y estructuras vasculares como probable mecanismo. Recientes estudios cuestionaron que las HSCs puedan transdiferenciarse a cardiomiocitos cuando son trasplantados al miocardio de múridos, levantando un encendido debate^{32,33}. No obstante, ambos grupos están de acuerdo en que el trasplante de HSC puede mejorar la función cardíaca después de un IAM. Aunque la formación de miocitos no ocurrió, se observó que las células segregan ligandos angiogénicos, para incorporarse dentro de focos de neovascularización, y mejora la capilarización regional y el flujo de sangre.

Ensayos clínicos. Después de los excitantes datos experimentales, se realizaron tests para evaluar la seguridad y la posibilidad de la terapia celular en pacientes post IAM. Todos los estudios incluían pacientes con IAM quienes habían recibido angioplastia primaria con colocación de *stent* para reabrir la arteria relacionada al infarto y las células fueron in-

fundidas de modo intracoronario usando el catéter balón *stop-flow*. En este aspecto, en los estudios en animales las células fueron inyectadas en el miocardio directamente y la arteria relacionada al infarto no fue abierta. En estos estudios fueron utilizadas BMCs no seleccionadas o poblaciones de células seleccionadas.

Células de médula ósea no seleccionadas

Se ha realizado terapia celular con células de médula ósea no seleccionadas en más de 100 pacientes con liberación intracoronaria de BMCs no seleccionadas (todas células nucleadas o sólo una fracción de células mononucleares), sugiriendo que este método es seguro en el corto y mediano plazo. No hubo complicaciones por sangrado en la extracción de la médula ósea; y la infusión intracoronaria de BMCs no aportó isquemia adicional al miocardio ni promovió una reacción inflamatoria sistémica porque no hubo elevación en el suero de los niveles de troponinas o proteína C reactiva (PCR). No hubo aumento en la tasa de reestenosis intra *stent* después del procedimiento. Tampoco se observó una tendencia a la presentación de arritmias, ni clínicamente, ni por Holter, ni por evaluación electrofisiológica. Tampoco hubo evidencias de calcificación intramiocárdica, ni formación de tumores.

Los datos indican que la transferencia intracoronaria de BMCs no seleccionados mejora el movimiento regional de la pared en el área infartada. Además, esto fue asociado con un aumento global de la FEVI.

En el estudio BOOST³⁴, la mejoría de la FEVI fue, principalmente, debida a la mejoría regional del movimiento de la pared en el borde de la zona infartada. No hubo una significativa reducción en el tamaño del infarto. Hasta ahora, ningún estudio ha demostrado un efecto significativo de la transferencia de BMCs en lo que se refiere al volumen diastólico final del VI, sugiriendo que las BMCs no seleccionadas tienen un limitado impacto sobre la remodelación del VI después del IAM. El seguimiento de los pacientes del BOOST muestran que la mejoría de la FEVI es mantenida después de 18 meses e indica que la transferencia de BMCs previene la progresión de la disfunción diastólica VI después del IAM^{35,36}.

Población de células de médula ósea seleccionadas

El estudio TOPCARE-AMI comparó células mononucleares de BMCs no seleccionadas con células progenitoras circulantes derivadas de la sangre, principalmente EPCs. Ambos tipos de células parecen tener similar seguridad y eficacia^{37,38}.

El trasplante de MSCs después del IAM fue estudiado en un solo trabajo³⁹. No se encontraron arritmias. No se reportó si este método promovió daño isquémico, una complicación que se observó en los perros. Seis meses después del procedimiento, el movimiento de la pared y la FEVI global habían mejorado y el volumen diastólico final del VI estaba disminuido, comparado con el grupo placebo.

En otro estudio clínico^{40,41}, usando población seleccionada de BMC, células CD133+, fueron infundidas dentro de la arteria relacionada al infarto. Después de 4 meses, 6 de 14 pacientes

habían desarrollado reestenosis intra *stent* significativa o reoclusión completa, y 2 habían desarrollado una lesión de *novo* en la arteria relacionada al infarto.

Movilización de células progenitoras y SC

La movilización de SC con factor de *stem cells* (SCF) y/o factor estimulante de colonia de granulocitos (G-CSF) ha sido propuesta para estimular la angiogénesis y la miogénesis en el área infartada y para mejorar la función cardíaca después del IAM, en el ratón^{42,43}. Pero, en contraste, el tratamiento con SCF y G-CSF mejora la vascularización del área infartada, pero no mejora la función cardíaca en los mandriles después del IAM⁴⁴. De interés, el G-CSF puede acelerar la curación del infarto aumentando la infiltración de macrófagos y la activación de la matriz metaloproteínasa (MMP)⁴⁵, suprimiendo la apoptosis de los miocitos por activación del factor de transcripción citoprotectivo STAT3⁴⁶, sugiriendo que un mecanismo independiente de las SC puede contribuir a los efectos del G-CSF pos IAM.

Se han realizado dos estudios clínicos. En el primero⁴⁷, se incorporaron 10 pacientes con infarto de miocardio entre 2 y 270 días después del comienzo de los síntomas, se los trató con G-CSF 10 microgramo/Kg de peso corporal durante 4 días. Luego, se les efectuó PTCA con implantación de *stent* a la arteria relacionada al infarto. En 7 pacientes, el G-CSF movilizó leucocitos recogidos en sangre periférica antes de la intervención e infundidos en la arteria relacionada al infarto después de colocar el *stent*. No hubo muertes, arritmias importantes, agravación de la IC o angina durante el procedimiento, ni 6 meses después. Pero hubo un aumento del nivel de MB-quinasas en el 65%, indicativo de daño miocárdico leve. Además, siete pacientes desarrollaron reestenosis *in-stent* a los 6 meses que determinó la finalización del estudio. Se atribuye esto a que el G-CSF tiene el potencial de activar los neutrófilos estimulando la adhesión de células endoteliales que provocaría su incorporación a los sitios de inflamación e injuria de tejidos. Este efecto sistémico puede haber contribuido al exceso de proliferación neointimal y a la posterior reestenosis.

En el segundo estudio⁴⁸, quince pacientes con IAM fueron tratados con G-CSF a la misma dosis por 6 días, comenzando a 89±35 minutos de la PTCA, con implantación de *stent* en la arteria relacionada al infarto. No hubo aumento de la tasa de reestenosis *in-stent* u otros serios eventos. La recuperación de la FEVI fue mayor que en el grupo control a los 4 meses.

Futuro de las investigaciones clínicas

Han sido reportados beneficios similares después de la liberación de un número muy variable de BMCs mononucleares. A lo largo de esta línea, el número absoluto de células nucleadas trasplantadas, CD34+, y SC formando colonias, no correlacionaban con la mejoría en la FEVI en el TOPCARE-AMI y en el BOOST⁴⁹. Interesantemente, otros estudios indican que menos del 3% de BMCs no seleccionados fueron retenidos en el área del infarto después de la liberación intracoronaria⁵⁰. Aunque esta tasa de retención fue suficiente para mejorar la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) en el BOOST, se necesitan estudios para definir el número óptimo de

células requeridas.

Un análisis *post hoc* del estudio BOOST sugiere que los efectos de la transferencia de BMC son consistentes a través de varios subgrupos definidos de acuerdo al sexo, edad, tamaño y territorio del infarto, tiempo desde el comienzo de los síntomas a la reperfusión, y la FEVI basal³⁴. Además, es necesario especificar subgrupos para ser definidos prospectivamente en futuros estudios, por ejemplo pacientes que se presentan tarde después del comienzo de los síntomas en quienes se puede esperar poco miocardio salvado de la terapia de reperfusión, pacientes con IAM e IC que hayan sido excluidos de estudios previos. Considerando que estos pacientes pueden beneficiarse por la mejoría de la FEVI, futuros estudios deberían evaluar los efectos de la terapia celular en estos subgrupos.

Los G-CSF y otras citocinas con movilización de SC y propiedades cardioprotectoras deberían ser evaluadas como única terapia o en combinación con transferencia de células.

Finalmente, son necesarios grandes estudios con *end point* combinados de mortalidad y morbilidad.

B) Enfermedad coronaria crónica sin opción de revascularización

Esta indicación es para los pacientes que a pesar de recibir una terapia médica óptima, siguen con angina y no tienen opción de revascularización por enfermedad arterial difusa. Además, si consideramos que algunos de ellos tienen asociado un deterioro regional de la función contráctil, la cual es parcialmente reversible cuando la perfusión tisular es restaurada (miocardio hibernado), hay una clara necesidad de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a la liberación de sangre oxigenada para el miocardio de estos pacientes.

Antecedentes experimentales. La inyección trans-endocárdica de BMCs o EPCs mejora el flujo colateral, la densidad capilar y la contractilidad regional en cerdos con isquemia miocárdica crónica^{51,52}. El mecanismo por el cual ocurre esta mejoría se desconoce; pero se ha propuesto que la mejoría de la perfusión tisular se debe a diferenciación dentro de las células endoteliales de sitios de neovascularización^{53,54}. Recientes publicaciones subrayan el potencial de las BMCs para liberar un cóctel natural de citocinas angiogénicas y arteriogénicas al miocardio^{51,55,56}.

Ensayos clínicos. Hay varios pequeños estudios que han utilizado BMCs mononucleares no seleccionados. En el primer estudio⁵⁷, cinco pacientes que fueron sometidos a cirugía, recibieron inyecciones de BMC trans-epicárdica dentro del área isquémica sin vaso revascularizado. Todos los pacientes tuvieron un postoperatorio normal, no presentaron arritmias ni calcificaciones ni tumores después de un año. Sugiriendo que el procedimiento era seguro. La perfusión miocárdica en el área inyectada mejoró en 3 pacientes.

En un estudio reciente⁵⁸, se investigó el efecto del G-CSF sobre los síntomas y la perfusión miocárdica en 16 pacientes con angina intratable. El tratamiento con 10 microgramos/Kg de peso por 5 días promovió un fuerte aumento en el número de EPC circulantes y una mejoría en los síntomas anginosos. Pero no hubo evidencias objetivas de mejoría de la perfusión miocárdica ni del movimiento regional de la pared. Además, dos pacientes tuvieron un IAM, poniendo en duda la seguridad del uso del G-CSF en ellos.

Futuro de las investigaciones clínicas

La inyección intra-miocárdica de BMCs no seleccionados es posible y parece segura en pacientes con isquemia miocárdica crónica. La eficacia de este procedimiento es desconocida porque los pocos estudios publicados no incluyeron grupos randomizados de control.

Aunque no hubo eventos adversos después de la administración de G-CSF a voluntarios normales⁵⁹, este factor puede no ser seguro en pacientes con severa enfermedad coronaria⁵⁸. Por lo tanto, estudios futuros de este tipo de pacientes debería hacerse con dosis crecientes de este régimen. Otras estrategias alternativas para promover la movilización de células progenitoras endoteliales y probablemente angiogénesis en pacientes con isquemia miocárdica deberían ser evaluadas (por ejemplo: uso de estatinas, citocinas, ejercicio, etc.).

C) Miocardiopatía isquémica, IC crónica

Como una de las causas más frecuente de la IC es la enfermedad coronaria, es lógico actuar sobre el miocardio dañado. Conceptualmente, el reemplazo de la cicatriz aquínética por miocardio viable mejoraría la función cardíaca e impediría la remodelación progresiva del VI.

Datos Experimentales. El trasplante de células en esta patología enfrentará un suministro limitado de sangre y puede no encontrar el medio ambiente adecuado para la transdiferenciación en células vasculares o en cardiomiocitos. El trasplante de mioblastos que supuestamente tienen buena tolerancia a la isquemia y son encargados de diferenciarse a lo largo del linaje de miocitos, puede ser una opción en estas circunstancias. La inyección de mioblastos dentro del miocardio infartado se comprobó que mejora la FEVI y disminuye la remodelación adversa del VI en animales grandes y pequeños^{60,61}. Aunque los miotúbulos injertados pueden contraerse en respuesta a la estimulación eléctrica^{62,63}, ellos no expresan la proteína N-caderina del disco intercalado o la conexina 43, indicando que ellos no se acoplan electromecánicamente a sus cardiomiocitos huéspedes⁶⁴. Por lo tanto, la mejoría de la función cardíaca vista en animales después del trasplante con mioblastos no depende de la actividad contráctil sincronizada de las células. También, se observó que este beneficio funcional del trasplante de mioblastos en ratas infartadas es sostenido en el tiempo a pesar de una progresiva pérdida de las células injertadas⁶⁵. Los mioblastos inyectados no parecen estimular la angiogénesis localmente⁶⁶. Se ha hipotetizado que los mioblastos pueden liberar factores paracrinos instruyendo a los cardiomiocitos vecinos a mantener su potencial replicativo o favorecer la diferenciación de CSCs dentro de los cardiomiocitos⁶³. Los mioblastos trasplantados pueden fusionarse con los cardiomiocitos en la interfase injerto-huésped.

Ensayos clínicos

Mioblastos esqueléticos. Varios pequeños estudios iniciales han sido publicados investigando la seguridad y la posibilidad del trasplante de mioblastos en pacientes con miocardiopatía isquémica. Ellos indican que es posible establecer y expandir cultivos de mioblastos desde biopsias de músculo esquelético y obtener un número de mioblastos adecuados dentro de 2 a 3

semanas. Un problema de seguridad mayor ha surgido de estos estudios, y es que los mioblastos injertados pueden representar un substrato arritmogénico⁶⁹. En el primer estudio⁶⁷, diez pacientes recibieron mioblastos trasplantados en tejido cicatrizado durante la cirugía de revascularización, y la arteria que correspondía a ese segmento estaba no permeable y sin posibilidades quirúrgicas, 4 pacientes presentaron taquicardia ventricular sostenida entre los 11 y 22 días postcirugía. Los cuatro fueron tratados con cardiodesfibrilador implantable (CDI). Otros estudios publicados, también tuvieron el mismo problema.

Es probable que la inyección de mioblastos aumente el riesgo de arritmias ventriculares en esta población de paciente⁶⁸. En ausencia de acoplamiento electromecánico, el mecanismo no se conoce. Se ha propuesto que la capacidad de los mioblastos para desatar el fuego del potencial de acción puede inducir extrasístoles deletéreas, aún en ausencia de acoplamiento electromecánico, a través de interacción electrónica^{63, 69}.

Células de la médula ósea. En un estudio se inyectaron CD133+ BMCs transepícardicamente en la zona borde de un infarto en 12 pacientes sometidos a cirugía de revascularización de las áreas no inyectadas^{70,71}. El infarto había ocurrido más recientemente que en los estudios con uso de mioblastos. No hubo complicaciones relacionadas al procedimiento y no se observaron arritmias ventriculares hasta 14 meses después. Luego de los 6-8 meses, la perfusión del área inyectada con células y la FEVI estaban mejoradas.

En un estudio reciente⁷², 86 pacientes con miocardiopatía isquémica recibieron infusión intracoronaria de BMCs mononucleares no seleccionados o de células progenitoras derivadas de sangre circulante por el mecanismo de la técnica con catéter balón *stop-flow*. El procedimiento fue seguro. Después de 3 meses, la FEVI en el grupo con BMC mejoró, pero no cambió significativamente en el grupo con células progenitoras.

Futuro de las investigaciones clínicas

Para evaluar rigurosamente la seguridad y la efectividad de la terapia celular en pacientes con IC isquémica son necesarios estudios randomizados, doble ciego. Puede ser aconsejable restringir el uso de trasplante de mioblastos a pacientes que necesiten el implante de un CDI. Si el implante de un CDI fuera necesario en forma rutinaria en pacientes que reciben inyección de mioblastos, el procedimiento podría ser costoso-efectivo no beneficioso.

Los estudios *post mortem* indican que sólo una pequeña fracción de mioblastos inyectados sobreviven en el miocardio humano cicatrizado^{73,74}. El tratamiento pre-implante antiapoptótico o la inyección simultánea de factor de crecimiento angiogénico pueden aumentar la supervivencia de los mioblastos después del implante⁷⁸.

La inyección intracoronaria de BMCs mononucleares o células progenitoras derivadas de la sangre promueven importante mejoría de la FEVI en pacientes con IAM comparados con pacientes con miocardiopatía isquémica^{37,72}. La alternativa farmacológica o genética para aumentar la retención de células y el injerto debe ser explorada, debido a que la retención de células puede ser limitada después de la liberación intra-corona-

ria dentro del miocardio infartado crónicamente.

No hay experiencia en pacientes con miocardiopatía no isquémica, estudios futuros deberían explorar el rol de la terapia celular en ellos. Hay un estudio alentador en pacientes con miocardiopatía chagásica con terapia celular intracoronaria con BMC⁷⁵.

Temas para ser sometidos en futuros estudios

Hasta ahora, hay muchos pequeños estudios clínicos explorando la seguridad y la posibilidad de la terapia con *stem cells*; ellos han usado varios tipos de células y preparaciones diferentes, en distintos estados de enfermedad. En conjunto, estas evidencias preliminares sugieren que este tipo de terapia es posible. A partir de ahora, se deberían realizar estudios más grandes, doble ciego, randomizados, controlados, para establecer los efectos del tratamiento sobre ciertos marcadores como la FEVI, la perfusión miocárdica o la capacidad al ejercicio. Además, deberían ser dirigidos a conceptos referidos al procedimiento tal como tipo de célula óptima, dosis adecuada de las células y tiempo de la transferencia de las células. Los estudios deberían también buscar *end points* combinados de morbilidad y mortalidad.

Hay preguntas fundamentales que necesitan respuestas: ¿Cuál es el destino de las células inyectadas después del trasplante? ¿Cuántas células sobreviven? ¿Las células se incorporan o es la retención transitoria suficiente para promover efectos funcionales?

Las evidencias actuales sugieren que las *stem cells* trasplantadas pueden interactuar con las células residentes CSCs para aumentar su potencial regenerativo. ¿Cuál es la naturaleza y la relevancia funcional de esta interacción? ¿Pueden las CSCs ser usadas para el reparo cardíaco, o es su potencial similar a las células obtenidas de la médula ósea? ¿Puede la capacidad regenerativa de las *stem cells* trasplantadas ser mejoradas por drogas, citocinas, o terapia génica? ¿Las estrategias genéticas y farmacológicas pueden ayudar a mejorar la retención de las *stem cells*, el injerto y la diferenciación?

Definiciones

Stem cells: células primitivas que tienen la capacidad de auto renovación y habilidad para diferenciarse dentro de múltiples tipos de células.

SC embrionarias: células *pluripotentes* derivadas desde la ICM de los blastocistos; dan lugar a células del total de las tres capas del germen.

Hemangioblastos: células embrionarias primitivas que dan origen a las HSCs y a las células progenitoras endoteliales; ellas pueden también existir en la médula ósea adulta.

SC adultas: presentes en todos los tejidos de renovación; estas células se dividen por auto renovación y se diferencian en múltiples tipos de células progenitoras.

SC hematopoyéticas: raras SC adultas presentes en la sangre y la médula ósea; dan origen a varias y distintas poblaciones de células progenitoras formadoras de sangre.

Células progenitoras: SC intermedias multipotenciales que sirven como los precursores directos de las células maduras

de tejido específico.

Células progenitoras endoteliales: están presentes en la sangre y en la médula ósea; están involucradas en la angiogénesis y en la vasculogénesis post natal.

SC mesenquimales: también referidas como células estromales de la médula; se diferencian *in vitro* a lo largo de múltiples caminos que incluyen la biogénesis cardíaca.

Plasticidad o transdiferenciación: es la capacidad de los SC adultas que residen en un tejido para diferenciarse en células maduras de un tejido no relacionado.

Referencias bibliográficas

- Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, et al. Myocyte death, grow, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res* 2003;92:139-150.
- Lee SL, Lill M, Makkar RR. Stem Cells taransplation in myocardial infarction. *Rev Cardiovasc Med* 2004; 5(2): 82-98).
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:10344-49.
- Welch S, Plank D, Witt S, et al. Cardiac-specific IGF-1 expression attenuates dilated cardiomyopathy in tropomodulin-overexpression transgenic mice. *Circ Res* 2002;90:641-48.
- Semsarian C, Wu MJ, JU YK, et al. Skeletal muscle hypertrophy is mediated by a Ca²⁺ dependent calcineurin signaling pathway. *Nature* 1999;400:576-81.
- Banal S, Shwelki D, Pinson A, et al. Upregulation of vascular endothelial growth factor expression induced by myocardial ischaemia: implications for coronary angiogenesis. *Cardiovas Res* 1994;28:1176-79.
- Brogi F, Schatterman G, Wu T, et al. Hypoxia-induced paracrine regulation of vascular endothelial growth factor receptor expression. *J Clin Invest.* 1996;97:469-476.
- Lee SH, Wolf PL, Escudero R, et al. Early expresión of angiogénesis factors in acute myocardial ischemia and infarction, *N Engl J Med* 2000;342:626-33.
- Wagers AJ and Weissman IL. Plasticity of Adult stem Cells. *Cell* 2004;116: 639-648.
- Weidberg PI and Quasim A. Stem cell therapy for myocardial repair. *Heart* 2005;91:696-702.
- Thomson JA et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282:1145-47.
- Menasché P, Hagege AA, Vilquin J-T, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:1078-83.
- Dip N, Michler RE, Pagani FD, et al. Safety and feasibility of autologous myoblast transplantation in patients with ischemic cardiomyopathy. Four year follow-up. *Circulation* 2005;112:1748-55.
- 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. *Nat Med* 10: 494-501, 2004.
- Leri A, Kajstura J and Anversa P. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. *Physiol Rev* 2005;85:1373-1416.
- Menasché Philippe. Cell transplantation in myocardium. *Ann Thorac Surg* 2003;75:S20-8.
- Roufosse CA, Direkze NC, Otto WR, et al. Circulating mesenchymal stem cells. *Int Biochem Cell Biol* 2004; 36:585-597.
- Gacchi M, He H, Liang OD, et al. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med* 2005;11: 367-368.
- Moscoso I, Centeno A, Lopez E, et al. Differentiation "in vitro" of primary and immortalized porcine mesenchymal stem cells into cardiomyocytes for cells transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37: 481-2.
- Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, et al. Mesenchymal stem cells implantation en a swine myocardial infarcted model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg* 2002; 73: 1919-1925.
- Vulliet PR, Greeley M, Halloran SM, et al. Intra-coronary injection of the mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs. *Lancet* 2004; 363: 783-4.
- Shintani S, Murohara T, Ikeda H, et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2001; 103: 2776-79.
- Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocytes apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 2001;7:430-36.
- Condorelli G, Borello U, DeAngelis I, et al. Cardiomyocytes induce endothelial cells to trans-differentiate into cardiac muscle: implications for myocardium regeneration. *Proc Natl Sci USA* 2001;98:10733-38.
- Badorf C, Brandes RP, Popp R, et al. Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. *Circulation* 2003; 107:1024-1032.
- Vasa M, Fitchlscherer S, Adler K et al. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary arterial disease. *Circulation* 2001; 103:2885-90.
- Eliceiri BP, Cheresh DA. The role of alpha v integrins during angiogenesis: insights into potentials mechanisms of actions and clinical development. *J Clin Invest* 1999; 103:1227-30.
- Leor J, Petterson M, Quiñones MJ, et al. Transplantation of fetal myocardial tissue into the infarcted myocardium of rat. *Circulation* 1996; 94(Suppl 2):332-6.
- Scorsin M, Hagege AA, Marotte F, et al. Does transplantation of cardiomyocyte improve function of infarcted myocardium. *Circulation* 1997; 96(Suppl 2):188-93.
- Müller-Ehmsen J, Peterson KL, Kedes L, et al. Long term survival of transplanted neonatal rat cardiomyocytes after myocardial infarction and effect on cardiac function. *Circulation* 2002; 105:1720-6.
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410: 701-5.
- Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, et al. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 2004; 428: 668-73.
- Murry CE, Soonpaa MH, Remecke H, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in mtocardial infarcts. *Nature* 2004;428: 664-8.
- Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomized controlled clinical trial. *Lancet.* 2004;364:141-48.
- Meyer GP, Woller KC, Lotz J, et al. Bone marrow transfer to enhance ST elevation infarct regeneration : long-term magnetic resonance imaging follow up data from the BOOST-trial. *Circulation* 2004; 110(Suppl III):239.
- Meyer GP, Schaeter A, Woller KC, et al. Can bone marrow transfer in patients after myocardial infarction prevent the development of diastolic dysfunction? Results from the BOOST trial. *Circulation* 2004;110(Suppl III):239.
- 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.
- Schachinger V, Assmus B, Britten MB, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI trial. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44: 1690-99.
- Chen SL, Fang WW, Ye F, et al. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2004;94:92-95.
- Vanderheyden M, Mansour S, Vandekerkhove B, et al. Selected intracoronary CD133+bone marrow cells promote cardiac regeneration after acute myocardial infarction. *Circulation* 2004;110(Suppl III):324-5.
- Mansour S, Vanderheyden M, Wijns W, et al. Intracoronary hematopoietic CD 133+ bone marrow cells and in-stent restenosis and coronary atherosclerosis progression in patients with recent anterior myocardial infarction. *Circulation* 2004;110(Suppl III):743.
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival . *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:10344-49.
- Ohtsuka M, Takano H, Zou Y, et al. Cytokine therapy prevents left ventricular remodeling and dysfunction after myocardial infarction through neovascularization. *FASEB J* 2004;18:851-3.
- Norol F, Merlet P, Isnard R, et al. Influence of mobilized stem cells on myocardial infarct repair in a nonhuman primate model. *Blood* 2003;102:4361-68.
- Minatoguchi S, Takemura, G, Chen XH, et al. Acceleration of the healing process and myocardial regeneration may be important as a mechanism of improvement of cardiac function and remodeling by post-infarction granulocyte colony-stimulating factor treatment. *Circulation* 2004;109:2572-80.
- Harada M, Yingjie Q, Takano H, et al. G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating Jak / STAT in cardiomyocytes.

- yocytes. *Circulation* 2004;110(Suppl III):170.
47. Kang HJ, Kim HS, Zhang SY, et al. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem cells mobilized with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomized clinical trial. *Lancet* 2004;363:751-56.
 48. Ince H, Petzsch M, Kleine HD, et al. Prevention of LV remodeling with G-CSF in acute myocardial infarction : insight from FIRSTLINE-AMI. *Circulation*. 2004;110(Suppl III):352.
 49. Woller KC, Drexler H. Clinical applications of stem cells for the heart. *Circ Res* 2005;96:151-163.
 50. Woller KC, Hofmann M, Meyer GP, et al. Monitoring of bone marrow cell homing to the infarcted human myocardium. *Circulation* 2004;110(Suppl III):436.
 51. 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.
 52. Kawamoto A, Tkebuchava, T, Yamaguchi J. et al. Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circulation* 2003;107:461-8.
 53. Kocher AA, Schuster MD, Szaboles MJ, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblast prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 2001;7:430-6.
 54. Kalka C, masuda H, Takahashi T, et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Sci USA* 2000;97:3422-27.
 55. Kinnaid T, Stabile E, Burnett MS, et al. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res* 2004;94:678-85.
 56. Fuchs S, Satler LF, Kornowski R, et al. Catheter-based autologous bone marrow myocardial injection in no-option patients with advanced coronary artery disease: a feasibility study. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:1721-24.
 57. Hamano K, Nishida M, Hirata K, et al. Local implantation of autologous bone marrow cells for therapeutic angiogenesis in patients with ischemic heart disease: clinical trial and preliminary results. *Jpn Circ J* 2001;65:845-7.
 58. Hill JM, Syed MA, Arai AE, et al. Outcomes of granulocyte colony-stimulating factor administration to patients with severe coronary artery disease. *Circulation* 2004;110(suppl III):352.
 59. Cavallaro AM, Lilleby K, Majolino I, et al. Three to six year follow up of normal donors who received recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Bone Marrow Transplant* 2000;25:85-9.
 60. Ghostine S, Carrion C, Souza LC, et al. Long term efficacy of myoblast implantation on regional structure and function after myocardial infarction. *Circulation* 2002;106:1131-36.
 61. Jain M, DerSimonian H, Brenner DA, et al. Cell therapy attenuates deleterious ventricular remodeling and improves cardiac performance after myocardial infarction. *Circulation* 2001;103:1920-27.
 62. Murry CE, Wiseman RW, Schwartz SM, et al. Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis. *J Clin Invest*. 1996;98:2512-23.
 63. Leobon B Garcia I, Menasche P, et al. Myoblast transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:7808-11.
 64. Reinecke H, Popa V, Murry CE. Skeletal muscle stem cells do not transdifferentiate into cardiomyocytes after cardiac grafting. *J Mol Cell Cardiol* 2002;34:241-49.
 65. Al Attar N, Carrion C, ghostine S, et al. Long-term (1 year) functional and histological results of autologous skeletal muscle cells transplantation in rat. *Cardiovasc Res* 2003;58:142-8.
 66. Agbulut O, Vadervelde S, Al Attar N, et al. Comparison of human skeletal myoblast and bone marrow-derived CD133+ progenitors for the repair of infarcted myocardium. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:458-63.
 67. Menasche P, Hagège AA, Vilquin JT, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:1078-83.
 68. Menasche P. Cellular transplantation: Hurdles remaining before widespread clinical use. *Curr Opin Cardiol* 2004;16:154-61.
 69. Makkar RR, Lill M, Chen PS. Stem cell therapy for myocardial repair: is it arrhythmogenic? *J Am Coll Cardiol* 2003;42:2070-72.
 70. Stamm C, Westphal B, Kleine HD, et al. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003;361:45-6.
 71. Stamm C, Kleine HD, Westphal B, et al. CABG and bone marrow stem cell transplantation after myocardial infarction. *Thorac Cardiovasc Surg* 2004;52:152-58.
 72. Assmus B, Honold J, Lehmann R, et al. Transcoronary transplantation of progenitor cells and recovery of left ventricular function in patients with chronic ischemic heart disease: results of a randomized, controlled trial. *Circulation* 2004;110(suppl III):238.
 73. Pagani FD, DerSimonian H, Zawadzka A, et al. Autologous skeletal myoblast transplanted to ischemia-damaged myocardium in humans: histological analysis of cell survival and differentiation. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:879-88.
 74. Hagège AA, Carrion C, Menasche P, et al. Viability and differentiation of autologous skeletal myoblast grafts in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet* 2003;361:491-92.
 75. Vilas-Boas F, Feitosa GS, Soares MB, et al. Bone marrow cell transplantation to the myocardium is safe and potentially effective in patients with advanced heart failure due to Chagas' cardiomyopathy. *Circulation* 2004;110(suppl III):239.