

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLOS PRÉ-CLÍNICOS DE TERAPIA
CELULAR EM ROEDORES PARA O TRATAMENTO DA CARDIOPATIA
ISQUÊMICA**

Luisa Maria Gomes de Macedo Braga

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Nance Beyer Nardi

Co-orientadora: Profa. Dra. Beatriz D'Agord Schaan

Porto Alegre, abril de 2007

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunogenética do Departamento de Genética, Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e na Divisão Experimental do InCor/USP, com o auxílio financeiro do CNPq, FAPERGS e PADCT-FEPPS (01/05).

Embora ninguém possa voltar atrás e fazer
um novo recomeço, qualquer um pode recomeçar
e fazer um novo fim.... (Chico Xavier)

Para Camila, Joana e Rafaela.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer, do fundo do meu coração a todos que fazem ou fizeram parte da minha vida e em especial:

A Deus, por me proteger e abençoar, por ter me dado o dom da persistência e por ter colocado na minha vida as pessoas certas, nas horas certas.

À Profa. Dra. Maria Lucia Rosa Rossetti, minha amiga, minha chefe, que me estimulou e me apoiou para que eu entrasse no doutorado e por ter me indicado a minha orientadora.

À Profa. Dra. Nance Beyer Nardi, por ter me aceito como orientada e ter depositado em mim uma enorme confiança; por ter me dado o prazer de conviver com ela estes anos e receber uma lição de vida; por ter me ensinado a fazer ciência de maneira séria, ética e responsável.

À Profa. Dra. Beatriz Schaam, por ser esta pessoa ágil, organizada e prestativa, por ter me ajudado e me acalmado, tantas vezes.

Ao Laboratório de Imunogenética da UFRGS em geral. Em especial ao Prof. Dr José Artur Chies, chefe do Laboratório, as professoras Kátia e Marion, a Déa Vargas, ao Daniel Garcia, a Paula, a Déia W., a Larissa, ao Bruno e ao Gustavo. Ao “filhos” da Nance, Daniel O, Renata, Tiago e Gustavo Reolon. Ao Lindolfo, pela paciência em me ensinar. A Flavinha pela convivência, pela amizade e pelo apoio. Ao Murilo e a Dona Dilma, pelo apoio no biotério e no laboratório. Ao Elmo e a Helen por todo o apoio na secretária do PPGBM.

À Mel e ao Pedro, meus amigos, meus parceiros de todas as horas, incansáveis, que me entenderam e dividiram comigo bons e maus momentos, muitas e poucas horas, sempre me fazendo acreditar que um dia tudo ia dar certo!

À Ana Ayala, Linfócito, minha amiga “paraguaia falsificada”, pelo carinho, amizade e convivência.

À Divisão Experimental do InCor/USP, por terem todos me recebido como amiga e terem sido incansáveis em todas as horas em que lá estive. Agradeço especialmente ao Edson, Vera, ao Leandro, Patrícia, Maria Augusta, Karin, Geórgia, Raquel, André e ao Cristiano. Ao pessoal que realizou os experimentos comigo Silvia Lacchini, Bruno, Kaleizu, Patrícia Fiorino, Christiane, Silvia Beatriz, Mariana e Lucinar, por estarem sempre prontos a ajudar, por terem dividido comigo as quase 12 horas de trabalhos diários, por terem cuidado de tudo quando eu não estava por lá, meu especial carinho e meu muitíssimo obrigada! À Profa. Dra. Maria Claudia Irigoyen, chefe da Divisão, e à Profa. Dra. Kátia De Angelis, hoje minhas amigas, que mesmo sem me conhecer, me receberam e me “adotaram”, obrigada pelo carinho, apoio e compreensão.

À FEPPS, pelo apoio e incentivo.

Aos meus funcionários da Coordenação de Produção e Experimentação Animal/FEPPS, que souberam compreender as minhas ausências, que foram amigos e parceiros e que torceram muito para que eu chegasse até aqui, agradeço a todos e a cada um em especial. Obrigada Carlos, Celso, Sutil, Valdomiro, Lídia, Sônia, Meirenisse, Ione, Lucinara, aos meus estagiários de hoje e de antes e em especial as minhas duas últimas, mas nem por isso menores aquisições, Carla e Isabel.

À minha grande amiga, parceira e colega, Patrícia Sesterheim (Patíca), a quem admiro e adoro, por ser aquele ombro amigo e a aquela pessoa certa, na hora certa.

Ao Dr. Renato Kalil, Instituto de Cardiologia, por ter acreditado e apoiado este projeto e ao Dr. Andrés, do Laboratório de Córdio-Molecular, pela ajuda na execução dos testes moleculares e em tantas discussões e também pelo carinho.

À Belinha e Chivas, minhas amigas do coração, pelas tantas vezes que ouviram minhas lamurias, vibraram com as minhas vitórias e estiveram por perto mesmo de longe.

À Dra. Silvia Orgler, que me acompanhou em bons e maus momentos, sempre me escutando pacientemente, pelo ajuda e pelo carinho.

Ao Nando, meu amigo, pela ajuda, carinho e incentivo.

À minha família: meu pai, que me olha lá de cima. Meus irmãos, Olavo, Mário, Emilio e Camilo, pela ajuda nos momentos difíceis e pelo carinho em todas as horas. Minha avó, Coca, pelo afeto de sempre, e por ter gastado todas as velas e orações!!! À minha mãe, meu esteio, minha paz, sempre presente em todas as horas da minha vida, acreditando e apoiando, sem dúvida sem ela eu não estaria aqui agora, escrevendo esta parte da minha história.

Às minhas filhas, minha vida, meu orgulho. Que nunca me deixaram esmorecer, que souberam, com paciência, entender a falta de tempo, as ausências, sempre me ajudando a superar as dificuldades, por terem se transformado, ao longo destes quatro anos, em três mulheres fortes, guerreiras e maravilhosas, agradeço a Deus pela parte que me toca nestas vidas e ofereço a elas, essa tese.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	9
Resumo	10
Abstract	12
Introdução	14
1 Doença arterial coronariana	14
1.1 Hipertensão arterial sistêmica	15
1.2 Infarto agudo do miocárdio	16
2 Regeneração tecidual	18
3 Terapia celular e células-tronco	19
3.1 Célula-tronco embionária	23
3.2 Célula-tronco do adulto	23
3.2.1 Células-tronco derivadas da medula óssea (BMC)	25
3.2.2 A célula-tronco mesenquimal (MSC)	29
4 Vias usadas em terapia celular cardíaca	31
4.1 Mobilização das células-tronco	31
4.2 Via transvascular	32
4.3 Via intramiocárdica	33
5 Mecanismos envolvidos na terapia celular	34
5.1 Fusão	34
5.2 Transdiferenciação	35
5.3 Fatores parácrinos	36
6 Modelos animais de doença cardíaca	37
6.1 Oclusão da artéria coronária descendente anterior	39

6.2 Ratos espontaneamente hipertensos (SHR)	40
6.3 Camundongos nocaute para receptores adrenérgicos α 2a e α 2c	42
Objetivos	45
Systemic delivery of adult stem cells improves cardiac function in spontaneously hypertensive rats	47
In situ delivery of adult stem cells improves cardiovascular function in hypertensive rats submitted to coronary occlusion	84
Intramyocardial transplantation of mesenchymal stem cells reduces mortality by improving cardiac function in a murine model of heart failure. . .	126
Discussão	151
Referências	158

Lista de abreviaturas

BMC – células-tronco derivadas da medula óssea (*bone marrow cells*)

CPC – células progenitoras cardíacas

DCV – doenças cardiovasculares

FACS – citometria de fluxo (*flow-activated cell cytometry*)

FGF – fator de crescimento fibroblástico (*fibroblastic growth factor*)

G-CSF – *granulocyte-colony stimulating factor*

GFP – proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*)

HSP – proteínas de choque térmico (*heat shock protein*)

IAM – infarto agudo do miocárdio

MN – células mononucleares

MSC – célula-tronco mesenquimal (*mesenchymal stem cell*)

Sca-1 – antígeno de células-tronco (*stem cell antigen 1*)

SCF – *stem cell factor*

SHR - ratos espontaneamente hipertensos (*spontaneously hypertensive rats*)

VEGF – fator de crescimento vascular endotelial (*vascular endothelial growth factor*)

Resumo

As doenças coronarianas, entre elas o infarto agudo do miocárdio, possuem alta incidência, morbidade e mortalidade e são um sério problema de saúde pública. A hipertensão arterial é considerada uma das principais causas de doença isquêmica do coração. A isquemia que provoca o infarto leva ao adverso remodelamento do músculo cardíaco e a depressão da função cardíaca. As células que sobrevivem à isquemia primária respondem com hipertrofia ao invés de proliferação, devido à capacidade mitótica limitada do cardiomiócito adulto. A terapia celular surge como uma alternativa de regeneração para o tecido cardíaco.

Este trabalho teve como objetivo analisar os tipos de células e vias de administração mais apropriadas para regeneração cardíaca em modelos animais. Em dois de nossos estudos, utilizamos fêmeas de uma linhagem de ratos espontaneamente hipertensos (SHR, *spontaneously hypertensive rats*), nos quais já existe um comprometimento orgânico prévio ao infarto. Os animais foram submetidos à oclusão da artéria coronária descendente para indução do infarto. O efeito de células totais da medula óssea foi comparado com o de sua subpopulação de células-tronco mesenquimais, em duas vias de administração (sistêmica e intramiocárdica). As células foram coletadas de machos singenéticos. No terceiro estudo, usamos uma linhagem de camundongos geneticamente modificada para indução de insuficiência cardíaca (linhagem nocaute para receptores adrenérgicos $\alpha 2a$ e $\alpha 2c$), a fim de verificar a ação das células-tronco mesenquimais ao longo do tempo (12 meses).

No primeiro estudo comparamos os dois tipos celulares pela via endovenosa e verificamos que células totais da medula produziram uma significativa melhora na regeneração da função cardíaca. Esta mesma ação foi mostrada pela célula-tronco mesenquimal quando administrada de forma intracardíaca. Como em nossos experimentos não foram observadas células masculinas no coração das fêmeas receptoras dos transplantes, mesmo com a realização de PCR e *nested* PCR, a secreção de fatores parácrinos parece ter sido o mecanismo responsável pela melhora funcional e tecidual produzida pelas células. No terceiro estudo houve uma melhora significativa na função cardíaca e na mortalidade dos camundongos tratados vs seus controles.

Como conclusão destes estudos, acreditamos que os experimentos aqui desenvolvidos, representando modelos animais mais fiéis à doença cardíaca humana, permitiram a comparação de diferentes preparações de células e vias de administração e podem assim contribuir de maneira bastante importante para a padronização de protocolos pré-clínicos para regeneração cardíaca.

Abstract

Coronary diseases, including acute myocardial infarction, have high frequency, morbidity and mortality, representing a major health problem. Arterial hypertension is one of the main causes of myocardial infarction. The ischemia which is responsible for the infarction results in remodeling of the cardiac muscle and depression of heart function. The cells surviving to the primary ischemic process have limited mitotic capacity and mostly undergo hypertrophy. Cell therapy represents an interesting alternative for the regeneration of the cardiac muscle.

This work aimed to analyze different types of cell preparations and routes of administration, to determine more efficient models of heart regeneration in animal models. In two of the studies, SHR (spontaneously hypertensive rat) were used. The animals, that present a previous organic deficiency, were submitted to occlusion of the descending coronary artery to induce a myocardial infarction. The effect of total bone marrow cells was compared to that of mesenchymal stem cells, after systemic or intramyocardial delivery. The cells were obtained from syngeneic males. In the third study, a murine strain genetically modified for the induction of heart failure (knockout for $\alpha 2a$ and $\alpha 2c$ adrenergic receptors) was used, to evaluate the long-term therapeutic potential of mesenchymal stem cells.

In the first study, the two cell populations were systemically administered, and the results showed that total bone marrow cells result in improved recovery of cardiac function as compared to mesenchymal stem cells. On the other hand, this cell type was superior in recovering cardiac function after intramyocardial delivery. Since transplanted male cells were not detected in the heart of recipient females

by PCR or nested PCR, the mechanism of repair more probably involve the secretion of paracrine factors. In the third study, we observed a significant improvement of cardiac function in the mice transplanted with mesenchymal stem cells, as compared to control animals.

In conclusion, we believe that the experiments performed in this work, representing models more faithful to heart failure in humans, allowed the adequate comparison of different types of cells and routes of administration, and may thus give important contribution to the standardization of pre-clinical protocols of heart regeneration.

Introdução

1 Doença arterial coronariana

Entre os diversos tipos de doenças cardiovasculares (DCV), as doenças coronarianas possuem a mais alta incidência e são provocadas por alterações nos vasos que irrigam o músculo cardíaco e que provocam o infarto do miocárdio. Estas alterações são responsáveis por 7,2 milhões de mortes por ano (Atlas de Doenças Cardíacas e Derrames, WHO 2002) e, segundo estimativas, este problema deve crescer nos próximos anos devido ao envelhecimento da população e aumento das taxas de sobrevivência pós-infarto (Hunt *et al.*, 2001; II Diretrizes para o Diagnóstico e Tratamento da Insuficiência Cardíaca).

O Brasil é 9º colocado entre os países cuja população morre mais, em números absolutos, devido a doenças cardíacas (Atlas de Doenças Cardíacas e Derrames, WHO 2002). O potencial problema de saúde pública é que a faixa etária mais atingida por doenças cardiovasculares (35-55 anos) é também a faixa etária economicamente mais produtiva (Portal da Saúde 2004). O índice de mortalidade por infarto agudo do miocárdio figura em segundo lugar (48,46%) entre as dez maiores causas de morte no Brasil, sendo o Rio Grande do Sul o Estado com a maior taxa de doença arterial coronariana (71, 74%) (Portal da Saúde 2004).

A doença arterial coronariana tem como principais fatores de risco a hipertensão arterial sistêmica, colesterol elevado, fumo, inatividade física, diabetes, idade avançada e predisposição hereditária. Entre estes, a relação entre a hipertensão arterial e o risco cardiovascular é contínuo, consistente e

independente de qualquer outro fator de risco. Dados de um estudo observacional em mais de um milhão de pessoas mostrou que a taxa de mortalidade por doenças cardíacas isquêmicas e por acidente vascular encefálico cresce de forma progressiva e linear à medida que a pressão arterial aumenta (Chobanian *et al.*, 2003).

1.1 Hipertensão arterial sistêmica

A pressão arterial é determinada pelo débito cardíaco e pela resistência vascular periférica. Uma série de reflexos fisiológicos, que respondem tanto a mudanças crônicas quanto agudas da pressão sanguínea, a mantêm dentro de limites estreitos. Os dois sistemas regulatórios mais importantes são o do sistema nervoso simpático e o sistema renina-angiotensina-aldosterona (Irigoyen *et al.*, 2003). A pressão arterial, assim, depende de fatores físicos como o volume sanguíneo e a capacitância da circulação, sendo resultante da combinação instantânea entre o volume minuto cardíaco (ou débito cardíaco = frequência cardíaca x volume sistólico), e a resistência vascular periférica.

A hipertensão arterial é uma doença poligênica que resulta de anormalidades dos mecanismos de controle da pressão arterial (Irigoyen *et al.*, 2003). Em suas fases iniciais, o débito cardíaco elevado pode ser o principal determinante da elevação da pressão arterial. No entanto, na hipertensão já estabelecida é o aumento da resistência periférica o mecanismo preponderante.

O diagnóstico de hipertensão arterial foi predominantemente forjado em estudos de coorte, a partir da observação de que indivíduos com valores elevados de pressão arterial estavam sob risco aumentado de apresentar eventos decorrentes de doença isquêmica do coração, cérebro e circulação periférica.

Retrospectivamente, por se observar que muitos pacientes com doença renal terminal também tinham pressão arterial elevada, se atribuiu também essa condição a valores elevados de pressão arterial (Gus e Fuchs, 2006).

1.2 Infarto agudo do miocárdio

A falta de irrigação sangüínea no músculo cardíaco provoca sua necrose, o infarto agudo do miocárdio (IAM). Com isso ocorre uma lesão tecidual, com necrose das miofibrilas e simultânea desintegração do colágeno interfibrilar. A perda de colágeno, que é um tecido de sustentação, torna esta região mais suscetível a deformações. Assim, pode ocorrer deslizamento de áreas musculares necróticas, com realinhamento dos miócitos na parede infartada. Há uma dilatação ventricular aguda ou expansão da área de infarto, caracterizada por adelgaçamento e distensão da parede infartada. Esta expansão provoca aumento da tensão (estresse) da parede ventricular. Dependendo da extensão do IAM, pode ocorrer queda da fração de ejeção e do volume sistólico. No entanto, com a dilatação, o coração recebe maior volume e assim, apesar da queda funcional, pode manter o volume sistólico, pelo menos por algum tempo. Além disso, a dilatação ventricular aguda, resultante da expansão, aumenta a tensão diastólica (pré-carga) e, desse modo, pode restaurar a função cardíaca, sem aumento da pressão de enchimento ventricular (Anderson, 2004).

A lesão tecidual do IAM provoca a perda de cardiomiócitos funcionais seguida de uma fibrose que se estabelece de forma irreversível e progressiva. A soma destes dois fatores leva cronicamente, além do prejuízo sintomático, a alterações na geometria ventricular ou remodelamento, definido como uma série de variações moleculares, celulares e intersticiais cardíacas, que vão se

manifestar clinicamente por alterações no tamanho, na massa, na geometria e na função do coração, com perda progressiva da função ventricular e desenvolvimento de insuficiência cardíaca.

A patofisiologia do remodelamento após infarto do miocárdio pode ser dividida em quatro fases:

- morte dos cardiomiócitos por apoptose e necrose;
- inflamação caracterizada pelo influxo de células inflamatórias (primariamente macrófagos, neutrófilos) e degradação da matriz extra-celular;
- formação de um tecido de granulação compreendido por neovasculaturas, macrófagos e miofibroblastos;
- formação da cicatriz.

Na fase inflamatória e na fase de formação do granuloma, há um marcante aumento na produção de citocinas e fatores de crescimento (Vandervelde *et al.*, 2005).

Existem pelo menos duas limitações claras nos tratamentos farmacológicos, percutâneos e cirúrgicos atuais da miocardiopatia isquêmica. Primeiro, eles são incapazes de impedir a perda de cardiomiócitos e a fibrose que se estabelece (Menasché, 2003). Segundo, quando a doença isquêmica é muito avançada e difusa, os métodos atualmente disponíveis não são efetivos; esta condição afeta até 12% dos pacientes com cardiopatia isquêmica (Mukherjee *et al.* 2002). Ainda deve ser considerado que parte dos pacientes não são passíveis de revascularização total, seja por cateter ou cirurgia. Para estes casos, a única alternativa passa a ser o transplante cardíaco que possui, além dos elevados riscos de complicações pós-cirúrgicas e do custo elevado, a dependência de

encontrar um doador compatível em um universo bastante restrito (Allan *et al.*, 2007). A terapia ideal, portanto, deverá minimizar a perda de cardiomiócitos, promover o retorno da função de miocárdio hibernante para um nível normal, estimular a revascularização de zonas isquêmicas pela angiogênese e criar novos cardiomiócitos, para repor aqueles perdidos após a lesão inicial (Menasché, 2003).

Tradicionalmente o coração vinha sendo considerado um órgão pós-mitótico, sem capacidade de regeneração frente a um episódio de lesão. Isso explicaria, ao menos parcialmente do ponto de vista fisiopatológico, a grande prevalência de insuficiência cardíaca, já que o coração não seria capaz de reparar ou regenerar cardiomiócitos em processo de morte celular. Apesar de estudos recentes sugerirem a revisão deste conceito (Anversa *et al.*, 2007), existem pesquisadores que continuam acreditando neste dogma (Rubart e Field, 2006).

2 Regeneração tecidual

Segundo Menasché (2003), a regeneração do miocárdio consiste em repovoar o músculo cardíaco danificado com novas células contráteis para restaurar a função nas áreas necróticas, melhorando assim a função global do coração. Estas células viriam da reserva de células da área peri-infartada. Até recentemente, acreditava-se que os cardiomiócitos de mamíferos adultos eram células totalmente diferenciadas e, portanto, não seriam passíveis de divisão. Recentemente este dogma foi revisto após estudos de patologia efetuados em pacientes que sofriam de miocardiopatias isquêmica e dilatada, onde pode ser

observado que algumas células entram novamente no ciclo mitótico (Beltrami e *al.* 2001). No entanto, a magnitude deste mecanismo de reparo próprio é muito pequena para compensar a perda expressiva de cardiomiócitos da área infartada. Torna-se, então, necessário repovoar a área de injúria com células exógenas.

Idealmente, as células exógenas deverão satisfazer os seguintes critérios:

- facilidade de coleta e expansão;
- capacidade de formar enxertos intramiocárdicos estáveis;
- habilidade eletromecânica de se unir aos cardiomiócitos do hospedeiro e assim poder contrair-se em sincronia com os mesmos;
- não associação com efeitos arrítmicos e oncogênicos (Menasché, 2003).

É importante salientar que esta célula “ideal” ainda não está disponível para uso clínico. Durante o reparo cardíaco, após o IAM, diferentes tipos celulares (macrófagos/monócitos, neutrófilos, fibroblastos e células endoteliais) são recrutados para o local da injúria por vias específicas envolvendo citocinas, alterações de matriz extracelular e moléculas de adesão. O melhor conhecimento de todos estes elementos e suas complexas interações possibilitou o surgimento dessa nova estratégia terapêutica que é a terapia celular visando combater ou reverter a perda celular e o declínio funcional que o acompanha.

3 Terapia celular e células-tronco

O termo terapia celular refere-se a um conjunto, de limites pouco precisos, de métodos e abordagens tecnológicas fundamentadas no conhecimento de

várias ciências, que visam a utilização de células para o tratamento de doenças. Um dos principais tópicos de atenção atual da terapia celular é a medicina regenerativa, que visa a substituição de células, tecidos ou órgãos lesados ou destruídos, através do emprego de células-tronco embrionárias ou células-tronco de adulto.

A medicina cardiovascular é uma das áreas onde a terapia celular tem grande probabilidade de implementação em curto prazo, conceito este reforçado por resultados promissores alcançados tanto experimentalmente quanto em ensaios clínicos. A aplicabilidade da terapia celular em cardiologia pode ser entendida ao serem considerados vários fatores (Gowdar *et al.*, 2006):

- A recuperação funcional a ser alcançada depende essencialmente do retorno da capacidade contrátil do miocárdio (função mecânica), consoante com dois elementos: contratilidade (sincronizada ao tecido nativo) e vascularização (atenuação da isquemia tecidual).
- Há conhecimento básico sobre remodelamento tecidual e angiogênese em extensão tal que a exploração terapêutica tornou-se factível em modelos animais de doença cardiovascular.
- Os modelos animais de doença isquêmica do coração exibem, com alguma fidelidade, as condições de isquemia/fibrose encontradas na doença humana e podem ser reproduzidos facilmente, permitindo que a terapia celular possa ser testada em vários cenários.
- Há possibilidade de implante das células terapêuticas no coração por via percutânea ou cirúrgica.

- Métodos de imagem não invasivos permitem o monitoramento de pacientes após a terapia celular e a identificação precisa de efeitos benéficos e complicações.
- A elevada prevalência de pacientes portadores de DCV em seguimento em centros de referência em cardiologia espalhados pelo mundo permite que procedimentos de alta complexidade possam ser oferecidos em ensaios clínicos com número de pacientes suficientemente grande, implicando poder estatístico adequado.

As células atualmente consideradas mais promissoras para aplicação em terapia celular são as células-tronco. Estas células são definidas como aquelas capazes tanto de auto-renovação como de originar um ou mais tipos de células diferenciadas (Prockop, 1997; Morrison *et al.* 1997). Watt e Hogan (2000) demonstraram que as células-tronco apresentam divisão assimétrica, de modo que após a mitose uma célula se mantém como tronco enquanto a outra inicia o processo de diferenciação. Chambers *et al.* (2003), estudando a programação genética que mantém as células-tronco como tais e as vias que induzem o processo de diferenciação, descreveram a expressão de genes envolvidos com a regulação da transcrição, como *Nanog*, *Oct4* e *Stat3*, que têm sido associados com a manutenção do estágio mais primitivo destas células.

Estas células podem ser isoladas e expandidas em cultivo *in vitro*, sendo mantidas como células-tronco ao longo de muitas gerações e mantendo também a capacidade de se diferenciar quando submetidas aos estímulos apropriados, que envolvem seu cultivo em presença de fatores de crescimento e diferenciação específicos, avaliando-se a eficiência do processo através de critérios

morfológicos, imunofenotípicos e funcionais. Estudos mais recentes demonstram que células-tronco podem gerar células de diferenciação terminal além de seu limite tecidual, por processos de transdiferenciação ou fusão (revisado por Raff 2003). O grande progresso observado mais recentemente no isolamento e caracterização de diferentes tipos de células-tronco de adulto tem permitido sua aplicação em protocolos pré-clínicos e clínicos de terapia para uma variedade de doenças (Korbling e Estrov, 2003).

As células-tronco podem ser classificadas como embrionária ou de adulto, sendo que entre estas últimas, vários tipos têm sido investigados quanto a sua habilidade de promover reparo cardíaco em modelos animais e no homem (Tabela 1).

Tabela 1 Origem de alguns tipos de células-tronco investigadas para a terapia de doenças cardíacas (modificado de van Laake *et al.*, 2006).

Tipo Celular	Origem
Célula derivada da medula óssea	Medula óssea
Mioblasto esquelético	Músculo esquelético adulto
Célula progenitora de cardiomiócito	Coração adulto ou fetal
Célula-tronco cardíaca	Medula óssea/ sangue periférico
Célula progenitora endotelial /célula precursora	Medula óssea/ sangue periférico
Célula-tronco embrionária	Embrião na fase blastocisto

3.1 Célula-tronco embrionária

Originada da massa celular de embriões no estágio de blastocisto, essa célula é caracterizada pelo potencial de diferenciação em todos os tipos celulares, inclusive cardiomiócitos. As perspectivas do uso destas células em protocolos clínicos esbarram em sérios problemas éticos relacionados à destruição do embrião para sua obtenção, ao fato de serem células alogênicas e necessitarem supressão imunológica, a questões de segurança relacionadas à possibilidade de que formem tumores *in vivo* e à ocorrência de instabilidade cromossômica vinculada ao seu cultivo. Os primeiros experimentos de terapia celular cardíaca foram realizados com cardiomiócitos de origem fetal e neonatal e tiveram resultados animadores. Estas células mostraram capacidade de formar enxertos estáveis no miocárdio infartado, expressar proteínas de junção (permitindo a união com os cardiomiócitos hospedeiros), sobreviver por longos períodos de tempo e melhorar a função do ventrículo esquerdo (Leor *et al.* 1996). Recentes avanços na compreensão da biologia das células-tronco de adulto e sua plasticidade transformaram esta célula em uma fonte promissora e não polêmica de tecidos autólogos para transplantes.

3.2 Célula-tronco do adulto

As células-tronco do adulto têm sido isoladas de uma ampla variedade de tecidos, e seu potencial de diferenciação ou plasticidade reflete o microambiente em que se encontram. Estas células não apresentam características tecido-específicas, mas sob influência de um conjunto de sinais podem diferenciar-se em células especializadas. É possível que as células-tronco órgão-específicas constituam-se em reservatórios de células para o reparo de tecidos lesados,

prontas a mobilizarem-se e diferenciarem-se em resposta a sinais de lesão ou condições patológicas (Nardi, 2005).

Apesar de alguma controvérsia ainda existente com relação à plasticidade exibida por diferentes tipos de células-tronco do adulto, e principalmente quanto aos mecanismos responsáveis pelo fenômeno conforme observado *in vitro*, considera-se que sua capacidade de diferenciação permite seu pleno aproveitamento nos processos de terapia celular. A Figura 1 ilustra a plasticidade das células-tronco hematopoiéticas, que durante o cultivo *in vitro* podem originar uma grande variedade de tipos celulares além das linhagens hematopoiéticas. Estudos mais aprofundados são necessários para determinar se esta plasticidade reflete uma situação real ou se, ao menos parcialmente, é devida a artefatos metodológicos (Raff, 2003).

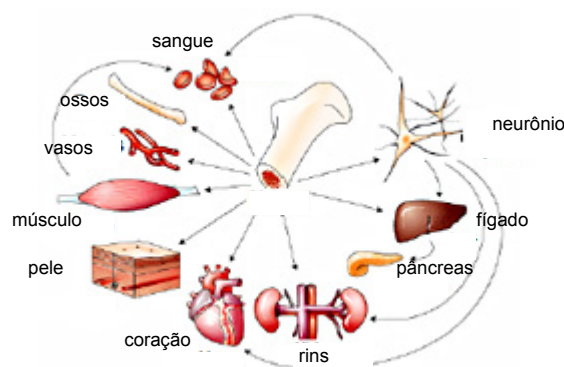


Figura 1 Plasticidade da célula-tronco hematopoiética.

Os estudos experimentais, pré-clínicos e clínicos de terapia celular para doenças cardíacas têm empregado mais frequentemente duas populações: células totais ou a fração mononuclear da medula óssea; e células-tronco mesenquimais.

3.2.1 Células-tronco derivadas da medula óssea (BMC, bone marrow cells)

Diferentes tipos de células-tronco podem ser isolados da medula óssea, incluindo a célula-tronco hematopoiética, a célula-tronco ou precursora endotelial e a célula-tronco mesenquimal. O uso da medula não fracionada, que contém além de uma população de células não diferenciadas, todos os tipos de células-tronco referidas acima, também é uma escolha bastante usada em experimentos (Wollert e Drexler, 2006). Estudos comparando a capacidade regenerativa de cada tipo de célula são escassos.

Foi em grande parte a partir dos estudos pioneiros de Orlic *et al.* (2001) que o conceito de se utilizar células-tronco para regeneração miocárdica teve impulso. Nestes estudos, os investigadores avaliaram a distribuição e o fenótipo de células mononucleares derivadas da medula óssea de camundongos machos expressando a proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*, GFP) após a injeção em corações de camundongas fêmeas que haviam sido submetidas a um infarto agudo de miocárdio. Nove dias após o infarto, aproximadamente 50% dos cardiomiócitos, células endoteliais e de músculo liso desenvolvidos dentro da área de infarto derivavam do doador, conforme evidenciado pela expressão de GFP e pela detecção de cromossomo Y localizado nas mesmas células com marcadores de cardiomiócitos.

No entanto, dois grupos de pesquisadores, Balsam *et al.* (2004) e Murry *et al.* (2004), trabalhando em um modelo semelhante ao de Orlic *et al.* (2001) relataram resultados diferentes. Estes autores, utilizando genes repórteres como marcadores para avaliar a transdiferenciação celular, não observaram células-tronco hematopoiéticas capazes de assumir a forma de cardiomiócitos *in vivo*.

Estas observações sugerem que talvez outros tipos de células-tronco, também presentes na medula óssea, sejam responsáveis pelos resultados observados.

Já em 2001, alguns trabalhos mostravam resultados clínicos promissores, como os de Strauer *et al.* (2001). Neste estudo, os pesquisadores investigaram os efeitos do transplante autólogo de células da medula óssea sobre o infarto agudo do miocárdio em dez pacientes que, após terapia convencional, receberam transplante de células mononucleares (MN) da medula óssea por via intracoronariana através de angioplastia coronariana percutânea. O grupo controle era composto por outros dez pacientes que receberam apenas a terapia convencional. A análise feita por ventriculografia após 3 meses mostrou que a região de infarto havia diminuído significativamente no grupo que recebeu células MN e também foi significativamente menor quando comparada com o grupo controle. O grupo tratado com células MN demonstrou melhora significativa da função e perfusão cardíaca sob diversos parâmetros, quando submetido a exames cardíacos posteriores (ecocardiograma de stress com dobutamina, ventriculografia com radionucleotídeos).

Esta experiência foi seguida por Britten *et al.* (2003) no estudo TOPCARE-AMI, onde vinte e oito pacientes com IAM receberam células MN da medula óssea ou células progenitoras circulantes na artéria infartada após o IAM. Ressonância magnética com contraste foi realizada inicialmente e 4 meses após. Foi verificada uma diminuição significativa da área de infarto e os autores concluíram que a infusão intracoronariana de células progenitoras afeta benéficamente o remodelamento ventricular pós-infarto.

Já Perin *et al.* (2003), verificando os efeitos da injeção transendocárdica de células MN em pacientes com doença cardíaca isquêmica terminal, concluíram

que o transplante autólogo de células mononucleares é seguro e tem potencial para melhorar a perfusão miocárdica, com melhora funcional e regional na função ventricular e do desempenho cardíaco. Participaram deste estudo vinte e um pacientes, sendo que quatorze foram tratados e os outros sete constituíram um grupo controle. No grupo tratado, foram injetadas as células divididas em 15 pontos selecionados do miocárdio com o sistema NOGA, que permite mapear áreas viáveis do miocárdio. O grupo controle foi apenas acompanhado de forma não invasiva. Após quatro meses de tratamento, foi demonstrada uma redução significativa no defeito reversível e melhora na função ventricular esquerda no grupo tratado em relação ao controle, vista por tomografia emissora de pósitrons (SPECT) e ecocardiografia. Parâmetros clínicos também demonstraram melhora significativa.

Em um trabalho experimental, Zhang *et al.* (2004) provocaram IAM em ratos e sete dias após transplantaram células MN. Verificaram que associado ao transplante, ocorria um aumento da expressão de citocinas angiogênicas como o fator de crescimento vascular endotelial (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) e citoprotetoras como HSP (proteínas de choque térmico, *heat shock protein*), em relação a um grupo controle, explicando a melhora funcional observada.

Kucia *et al.* (2004) sugeriram que a medula óssea pós-natal contém um pool móvel de células que expressa uma linhagem de marcadores cardíacos iniciais (Nkx2.5/Csx, GATA-4 e MEF2C). Células mononucleares foram isoladas de camundongos BALB/c (de quatro a seis semanas de idade) e de quatro cadáveres (52 a 65 anos) e analisadas por citometria de fluxo (FACS, *flow-activated cell cytometry*), provas hematológicas, real-time e imunohistoquímica.

Os trabalhos *in vivo* foram realizados em dois grupos de 24 camundongos. No grupo experimental foi realizada a ligadura da coronária descendente por 30 minutos, seguida de reperfusão. O grupo controle permaneceu com a cavidade aberta por 1 hora. Os animais foram eutanasiados 6, 24, 48 e 96 horas após a reperfusão e deles foram colhidas amostras de sangue e do miocárdio, tanto da parte isquêmica quanto da não isquêmica. Segundo os pesquisadores, este pool de células está presente em quantidade significativa na medula de animais mais jovens, mas ocorre um decréscimo com a idade; em adição a este fato, a capacidade de resposta destas células a gradientes de fatores como SDF-1, HGF e LIF muda com a idade. As análises realizadas por FACS, combinadas com a análise de marcadores cardíacos iniciais ao nível de mRNA e proteínas, revelaram que células que expressam estes marcadores residem na fração mononuclear não-aderente, não-hematopoiética, CXCR4⁺/Sca-1⁺/lin⁻/CD45⁻ de camundongos, e na fração CXCR4⁺/CD34⁺ AC133⁺/CD45⁻ de humanos. Após o infarto, estas células são mobilizadas no sangue periférico e fazem uma quimiotaxia para miocárdio infartado. Segundo os autores, esta foi a primeira vez que ficou demonstrado que a medula óssea abriga uma população não hematopoiética de células que expressam marcadores para diferenciação cardíaca.

A capacidade da célula-tronco hematopoiética de induzir ou contribuir para o reparo do músculo cardíaco após o infarto foi também analisada por Deten *et al.* (2005). Os autores analisaram o efeito da mobilização periférica de BMC através da utilização de dois fatores de mobilização celular, o *stem cell factor* (SCF) e o *granulocyte-colony stimulating factor* (G-CSF) ou da injeção endovenosa de BMC, na modificação dos parâmetros morfológicos e hemodinâmicos no coração

de camundongos que haviam sido previamente infartados. Os resultados mostraram que nem a mobilização, nem a injeção endovenosa das BMC tiveram qualquer efeito mensurável na regeneração cardíaca.

3.2.2 A célula-tronco mesenquimal (MSC, mesenchymal stem cell)

A medula óssea de mamíferos contém uma outra população de células-tronco de tecido não hematopoiético, denominada célula-tronco mesenquimal (MSC). Esta célula é fácil de isolar, cultivar e manipular em culturas *ex vivo*. Apresenta uma enorme plasticidade e grande potencial terapêutico (Beyer Nardi e da Silva Meirelles, 2006). As células-tronco mesenquimais estão presentes na medula óssea em uma fração muito pequena, mas que pode ser facilmente expandida por métodos de cultura *in vitro* (Meirelles e Nardi, 2003). Além da medula, esta célula está presente em diversos outros tecidos (da Silva Meirelles *et al.*, 2006). Vários pesquisadores demonstraram que estas células têm a capacidade de assumir o fenótipo de cardiomiócitos (Shake *et al.*, 2002; Tomita *et al.*, 2002), ainda que pequena quantidade de células (ao redor de 0,5%) seja mantida no local injetado (Anversa *et al.*, 2004).

As MSCs têm a capacidade de produzir citocinas e fatores de crescimento que regulam a hematopoiese (Haynesworth *et al.* 1996). Seu transplante em ratos IAM, uma semana após o infarto, leva por exemplo a um aumento da expressão de VEGF, que persiste após 2 meses (Tang *et al.*, 2004).

Kinnaird *et al.* (2004) caracterizaram o espectro dos genes de citocinas expressos por células-tronco mesenquimais após hipóxia, utilizando *microarray* para 12.000 genes de camundongos. Entre os genes que tiveram sua expressão aumentada pela hipóxia estavam o fator de crescimento fibroblástico (*fibroblastic*

growth factor, FGF), o VEGF e interleucinas (1 e 6). Estes achados sugerem que, quando transplantadas para regiões de injúria miocárdica, as células-tronco mesenquimais têm um papel semelhante ao que exercem na medula óssea, criando um microambiente (sob a forma de interações intercelulares e secreção de citocinas) que influencia o comportamento de células residentes. Com o conhecimento crescente do papel destas e outras citocinas no surgimento e manutenção da insuficiência cardíaca, o transplante de células-tronco poderá ter um papel adicional no manejo das doenças cardíacas.

Uma limitação inerente do transplante de MSCs no miocárdio infartado é a baixa viabilidade das células transplantadas (Song *et al.*, 2007). A adesão da célula no local é o pré-requisito e fator chave para sua diferenciação. Noiseux *et al.*, 2006 transduziram MSCs de camundongos com o gene *Akt1* (antiapoptótico) para verificar o papel da fusão celular no reparo cardíaco. Camundongos machos e fêmeas da linhagem R26R foram infartados por oclusão da artéria coronária descendente anterior, e 1 hora após o infarto foram injetadas 5×10^5 MSCs expressando *Cre* (MSC-*Cre*/GFP ou MSC-*Akt*/*Cre*/GFP) em um volume de 10 μ l, em dois sítios na borda da área infartada. Nos dias 3, 7, 14 e 28, os animais foram analisados por ecocardiografia, e aos 30 dias foram eutanasiados. Foi observado que o infarto provoca uma importante necrose e uma rápida resposta inflamatória. Aos 14 e 28 dias, as células necróticas e inflamatórias são substituídas por fibrose e colágeno, observando-se que a MSC-*Akt* favorece o processo de cicatrização, diminui a necrose (mais miócitos viáveis), a infiltração inflamatória e a deposição de colágeno. A MSC-*Akt*/*Cre*/GFP foi detectada de forma abundante e significativamente maior que MSC-*Cre*/GFP nos dias 3 e 7, diminuindo bastante no dia 14. No dia 28, em ambos os grupos, havia uma

quantidade mínima de células. Eventos de fusão celular e diferenciação em cardiomiócitos não foram notados com freqüência em nem um dos dias observados e também não foram influenciados pela super expressão de Akt. No entanto, houve uma significativa redução no tamanho da área infartada e no restauro da função cardíaca no grupo MSC-Akt. MSCs foram encontradas dentro do tecido isquêmico, sugerindo a sua migração para a área infartada. Os autores concluíram que, embora o enxerto das MSCs tenha sido transiente e os níveis de fusão e diferenciação tenham sido muito baixos, houve realmente uma melhora expressiva no tamanho do infarto e na função cardíaca e que estes ganhos foram mediados por mecanismos parácrinos. Eles levantaram a hipótese de que a MCS-Akt expressa e secreta citocinas, fatores de crescimento ou outros fatores parácrinos e pode produzir um ambiente de proteção e uma retenção transiente que pode ser suficiente para promover estes efeitos funcionais.

4 Vias usadas em terapia celular cardíaca

4.1 Mobilização das células-tronco

Estudos recentes demonstram que, após um episódio de injúria, o miocárdio fica repleto de citocinas e fatores de crescimento que recrutam células-tronco do meio extra-cardíaco para atuarem no mecanismo de reparo do tecido injuriado. Estas células sofrem a transformação necessária para promover o reparo estrutural e funcional do músculo afetado (Wang *et al.*, 2006). A mobilização espontânea das células-tronco CD34⁺ de medula após um episódio de infarto agudo do miocárdio, no entanto, parece não ser suficiente para que

ocorra a melhora do remodelamento cardíaco (Massa *et al.*, 2005; Leone *et al.*, 2005).

Em teoria, a mobilização terapêutica de células-tronco progenitoras da medula após o IAM poderá amplificar a resposta regenerativa (Perin e López, 2006). No entanto, estes autores chamam a atenção para fatores de segurança quanto ao uso desta droga, já que efeitos adversos foram notados em diferentes populações de pacientes e também existem evidências sobre o papel do G-CSF no desenvolvimento de tumores.

O G-CSF, utilizado como recrutador de BMC CD34+ autólogas em dois ensaios clínicos feitos com pacientes após o infarto do miocárdio (FIRSTLINE-AMI e REVIVAL-2), mostrou ter um efeito cardioprotetor sugerido como estratégia mais interessante do que aspirar as BMCs da medula (Ince e Nienaber, 2007). Dúvidas quanto à segurança do G-CSF surgiram no estudo *Mid-Atlantic Group of Interventional Cardiology* (MAGIC) devido à alta taxa de re-estenose notada, com o emprego de BMCs associada a esta droga ou ao emprego apenas, após IAM. Este fato poderia estar relacionado à disponibilidade aumentada de células inflamatórias presentes na artéria coronária recentemente agredida (Perin e López, 2006).

Orlic *et al.* (2001) utilizaram SCF associado a G-CSF e verificaram uma significativa mobilização de células-tronco e uma acentuada melhora na regeneração cardíaca em camundongos previamente infartados.

4.2 Via transvascular

A infusão endovenosa é uma forma conveniente, segura e menos invasiva de entrega das células-tronco em geral. Diversos estudos comprovam a eficácia

desta via em modelos animais (Boomsma *et al.*, 2006; Barbash *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2006; Iso *et al.*, 2007). É necessário que a lesão cardíaca seja recente para que os sinais de injúria cardíaca estejam presentes e haja o *homing* fisiológico das células, como por exemplo, no infarto agudo do miocárdio (Perin e López, 2006). O uso rotineiro desta via muitas vezes é prejudicado pelo fato das células chegarem em menor número na área afetada (Gao *et al.*, 2001).

A célula-tronco mesenquimal é uma célula de maior tamanho que os capilares (20-24 μm vs. 10-15 μm), o que pode ser um impeditivo para que ela chegue ao local afetado, ficando depositada nos pulmões (Beyer Nardi e da Silva Meirelles, 2006). Mesmo assim, Nagaya *et al.* (2004), administrando por via endovenosa 5×10^6 MSCs, após três horas de oclusão da artéria coronária de ratos, notaram que houve melhora da função cardíaca após o infarto agudo do miocárdio por aumento da angiogênese. As análises mostraram presença de estruturas vasculares e células positivas para o fator von Willebrand, bem como para os marcadores cardíacos desmina, troponina T cardíaca e conexina 43 indicativos de miogênese. Principalmente em humanos e animais de médio porte, a infusão das células no sinus coronário (Thompson *et al.*, 2003) e a infusão intracoronariana são bastante usadas (Wollert e Drexler, 2004).

4.3 Via intramiocárdica

Fortes evidências sugerem que a injeção intramiocárdica de células-tronco tem impacto favorável na perfusão tecidual, na cicatrização e na contratilidade do coração infartado (Wollert e Drexler, 2005). O sucesso do transplante de células-tronco para o coração depende da via de entrega da células, para que uma concentração maior dessas chegue a área afetada, sugerindo que a

administração local das células transplantadas é preferível à administração sistêmica (Davani *et al.*, 2005). Embora seja uma das vias mais utilizadas em experimentos clínicos e pré-clínicos, esta rota possui o risco de provocar arritmias (Menasche *et al.*, 2003; Fukushima *et al.*, 2007).

Esta é a via preferencial para doenças cardíacas com oclusão arterial crônica, que apresentam poucos sinais de injúria para que as células façam o *homing* fisiológico, bem como para terapias que utilizam células de maior tamanho, como as mesenquimais e os mioblastos, que podem obstruir os capilares (Perin e López, 2006).

5 Mecanismos envolvidos na terapia celular

Embora a melhora da função cardíaca com o transplante celular seja uma prova irrefutável da ação das células-tronco, os mecanismos envolvidos nessa melhora continuam sendo alvos de incessantes estudos. Três mecanismos são propostos para explicar o papel terapêutico das células-tronco.

5.1 Fusão

Conforme este mecanismo, a célula transplantada forma uma quimera com a célula residente. Estudos de Noiseux *et al.* (2006), conforme descrito anteriormente, comprovaram que MSCs super-expressando o gene *Akt*, injetadas no coração de ratos modelos de IAM, apresentaram um enxerto transiente e fusão com as células residentes, que ocorria em maior intensidade nos primeiros dias do experimento (dias 3 e 7). Oh *et al.* (2003), injetando por via endovenosa

células marcadas com o antígeno de células-tronco 1 (*stem cell antigen 1*, Sca-1), observaram que estas células participam da regeneração cardíaca através de mecanismos combinados de fusão e diferenciação. Mazhari e Hare (2007) baseados no estudo de Kajstura *et al.* (2004), comentam que os resultados da quantificação do conteúdo de DNA em áreas do tecido regenerado também argumentam contra a fusão como uma principal contribuição à recuperação de tecido depois da terapia celular.

5.2 Transdiferenciação

Diversos estudos comprovaram diferenciação de células-tronco enxertadas, após um episódio de infarto agudo do miocárdio, em cardiomiócitos e/ou células endoteliais (Orlic *et al.*, 2001; Kudo *et al.*, 2003; Kajstura *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2006). Na grande maioria dos estudos pré-clínicos a cirurgia de IAM é feita em fêmeas e as células-tronco utilizadas na terapia são retiradas de machos singenéticos. Dessa forma, verificando a presença cromossomo Y em células do tecido regenerado do miocárdio das receptoras, os pesquisadores comprovam a diferenciação das células transplantadas. Outro marcador bastante usado é a GFP, muitas vezes usada como co-marcação junto com o cromossomo Y (Orlic *et al.*, 2001). Outra maneira usada para detectar as células é o fato dos novos cardiomiócitos serem menores que os miócitos adultos (Orlic *et al.*, 2001; Kajstura *et al.*, 2004). Como não existe um marcador de eleição definitivo para células-tronco, em humanos, verificar a presença da célula injetada é um problema a ser solucionado.

5.3 Fatores parácrinos

Diversos estudos comprovam a capacidade das células-tronco de expressarem fatores parácrinos capazes de estimular a regeneração do tecido cardíaco (Kinnaird *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2006; Iso *et al.*, 2007). Vandervelde *et al.* (2005), revisando estes fatores de sinalização, comentaram que maior reservatório autólogo de células-tronco de adulto, distal do coração, é a medula óssea. A adequada regulação da sinalização entre a medula óssea, a circulação e o coração infartado é muito importante para que haja uma orquestração perfeita entre os processos de mobilização, *homing*, incorporação, sobrevivência, proliferação e diferenciação das células-tronco que irão regenerar o miocárdio. Os fatores de sinalização envolvidos neste processo incluem citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento. Entre estes, estão aqueles reconhecidos pela habilidade de mobilização e quimiotaxia (SDF-1, G-CSF, SCF, IL-8, IL-10, VEGF), fatores expressos após o infarto do miocárdio (TNF α , IL-8, IL-10, HIF-1 α , VEGF, G-CSF) e os sinais envolvidos na cardiomiogênese e neo-angiogênese (VEGF, EPO, TGF β , HGF, HIF-1 α , IL-8). É preciso que se conheça a potência intrínseca destes fatores, sua localização e o tempo de combinação entre eles para estimular as células-tronco em seu nicho e regenerar o tecido lesado (Vandervelde *et al.*, 2005).

O dogma que o coração era um órgão terminalmente diferenciado foi revisto após estudos pioneiros de Beltrami *et al.* (2001) que observaram cardiomiócitos em fase mitótica inicial. Os autores mostraram, em corações de pacientes que haviam morrido entre 4-12 dias de infarto do miocárdio, proliferação de cardiomiócitos, sendo que a proporção de células em mitose era maior na área peri-infarto do que nas áreas adjacentes. Segundo Anversa *et al.* (2007), existe

uma certa resistência por parte de alguns pesquisadores em aceitar a quebra deste paradigma. No entanto, outros estudos (Kajstura *et al.*, 2001; Beltrami *et al.*, 2003; Urbanek *et al.*, 2003) têm mostrado que estas células podem se diferenciar em todos os constituintes de células do coração, pressupondo, teoricamente, que elas seriam capazes de regenerar a injúria cardíaca. Lyngbaek *et al.* (2007), revisando o assunto, comentam que em estudos pré-clínicos as células progenitoras cardíacas (CPCs), cultivadas e expandidas *in vitro*, melhoraram substancialmente a performance cardíaca, mas *in natura* as CPCs não possuem a capacidade de regenerar grandes áreas infartadas. Antes de que estas células possam ser usadas em estudos clínicos, é preciso que se estabeleçam métodos para isolá-las a partir de biopsias, métodos de cultivo e multiplicação, investigando-se a melhor via de administração e procurando entender como controlar o seu crescimento e maturação.

6 Modelos animais de doença cardíaca

Uma série de fatores genéticos e ambientais interage na gênese e desenvolvimento das doenças cardiovasculares, especialmente na doença arterial coronariana e cardiopatia hipertensiva. Dieta, exercício, outras modificações de estilo de vida e fatores hereditários estão comumente associados a doenças cardíacas. Essa interação de fatores dificulta ainda mais o seu tratamento (Madamanchi *et al.*, 2004).

Como em qualquer outra área de estudos da saúde humana, o estabelecimento de modelos animais de doenças cardíacas fornece ferramentas

fundamentais para a exploração de alternativas terapêuticas e seus mecanismos. Os roedores possuem, entre outras, as seguintes vantagens como modelos animais para estes estudos:

- variedade de linhagens isogênicas existentes;
- condições ambientais e genética standardizadas;
- anatomia, fisiologia e genoma amplamente conhecidos;
- pequeno porte, o que proporciona economia de espaço;
- facilidade de reprodução, o que permite um grande número de gerações em um curto período de tempo;
- grande número de linhagens geneticamente modificadas ou selecionadas para determinadas mutações que mimetizam grande variedade de doenças, entre elas vários aspectos das doenças cardiovasculares;
- baixo custo, o que viabiliza um grande número de estudos.

Todas estas vantagens fizeram com que os roedores surgissem, nas últimas décadas, como os mais prevalentes modelos experimentais para a pesquisa de várias doenças, entre elas as cardíacas. Eles são utilizados não só para elucidar mecanismos moleculares dessas doenças, mas também para testar técnicas experimentais e novas terapêuticas (Madamanchi *et al.*, 2004).

Neste estudo, nós utilizamos uma linhagem de ratos espontaneamente hipertensos (SHR, *spontaneously hypertensive rats*), que foram submetidos a oclusão da artéria coronária descendente. Tendo-se em vista a importante participação da hipertensão arterial como fator causador das doenças cardíacas, o infarto do miocárdio nestes animais representa um modelo mais semelhante à doença em humanos. Utilizamos também uma linhagem de camundongos geneticamente modificada (nocautes para receptores adrenérgicos $\alpha 2a$ e $\alpha 2c$), na

qual a modificação genética induzida determina hiperatividade do sistema simpático no tecido cardíaco causando redução da capacidade funcional, hipertensão arterial leve e subseqüentemente alterações ultra-estruturais nos cardiomiócitos com conseqüente insuficiência cardíaca.

6.1 Oclusão da artéria coronária descendente anterior

Para mimetizar o infarto agudo do miocárdio é feita a ligadura cirúrgica da artéria coronária descendente. Logo após a oclusão, modificações são visíveis no músculo cardíaco. O miocárdio torna-se cianótico e ocorre uma dilatação e paralisia da área ventricular afetada. Arritmias ou fibrilações ventriculares não são freqüentes. Subseqüentemente ocorre remodelamento ventricular que evolui, com o passar da do tempo, para falência cardíaca crônica.

A Figura 2 ilustra o local onde é efetuada a oclusão da artéria coronária descendente.

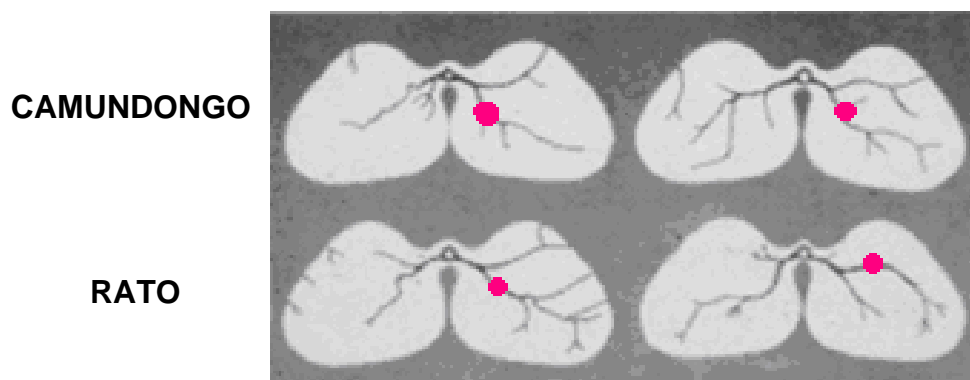


Figura 2 Oclusão da artéria coronária descendente em roedores para o estabelecimento de modelos de infarto do miocárdio. Modificada de Johns e Olson (1954).

Segundo estudos pioneiros de Pfeffer datados de 1979, infartos que afetam 20% da área ventricular não provocam modificações e sinais externos compatíveis com infarto ou falência cardíaca, tais como edema pulmonar, ascite ou alterações respiratórias. No entanto, quando a área infartada é maior (40-50%), a pressão nos dois ventrículos aumenta e ocorre diminuição do débito cardíaco, indicando que estes animais vão entrar em falência cardíaca. Nestes infartos ocorre hipertrofia do septo, sem aumento do peso do ventrículo esquerdo devido à perda de tecido viável do miocárdio. Tanto a necrose tecidual quanto a apoptose estão associadas com a oclusão da artéria coronária (Doggrell e Brown, 1998). Apenas 1 hora após a oclusão da artéria, o infarto do miocárdio começa a se desenvolver e a cicatrização estará completa aproximadamente 6 a 8 semanas após (Zdrojewski *et al.*, 2002).

6.2 Ratos espontaneamente hipertensos (SHR)

A linhagem SHR foi originada em Okamoto, no ano de 1963, a partir de linhagens Wistar Kyoto. Foram realizados cruzamentos de um rato macho com pressão arterial limítrofe com uma fêmea da mesma linhagem, mas com elevação da pressão arterial. Estes animais foram acasalados no sistema isogênico por mais de 20 gerações consecutivas, sendo sempre selecionados para hipertensão (Okamoto, 1969; Okamoto *et al.*, 1978). Esta seleção considerava como hipertenso aquele animal que possuía uma pressão sistólica maior que 150 mm Hg de forma persistente por mais de um mês (Doggrell e Brown, 1998). A partir daí toda a linhagem desenvolve hipertensão espontânea em torno de 7 a 15 semanas (160-170 g) de idade. Inicialmente, estes animais possuem o débito cardíaco aumentado e a resistência vascular periférica normal. Com o aumento

da pressão arterial que ocorre com a idade, inverte-se este quadro (Doggrell e Brown, 1998). Os SHR já hipertensos mostram um aumento funcional na resistência vascular periférica, que na maior parte depende de mecanismos neurogênicos provavelmente originados em desequilíbrio na regulação central da pressão arterial (Yamori, 1984). A pressão sangüínea *per se* e o tônus neurogênico aumentado aceleram a síntese de proteínas musculares e induzem modificações vasculares estruturais que contribuem para a manutenção da hipertensão arterial. Os estudos feitos em culturas de músculo vascular liso sugeriram uma predisposição genética dessas células ao crescimento hiperplásico e a sua estimulação por mecanismos β -adrenérgicos.

Santalova *et al.* (2006), estudando a estrutura do miocárdio de animais SHR, mostraram que ocorre um decréscimo significativo no número de capilares que suplementam o músculo cardíaco nestes animais, quando comparados com animais normotensos. Ocorre também uma hiperplasia de fibras musculares (10%), primariamente às custas do volume aumentado do sarcoplasma e elementos de tecido conectivo, bem como um aumento no volume de miofibrilas. É sugerido que o desenvolvimento do *status* hipertensivo é acompanhado por certo rearranjo compensatório no miocárdio (aumento na área relativa de fibras musculares e microfilamentos), enquanto que a estrutura mitocondrial permanece intacta. Ao mesmo tempo ocorrem diminuição da vascularização, aumento do tecido conectivo e uma orientação não-longitudinal das miofibrilas.

O infarto do miocárdio em SHR não exacerba a dilatação ventricular, embora a pós-carga possa expandir o infarto e a dilatação do ventrículo (Zdrojewski *et al.*, 2002). A existência prévia de hipertrofia em SHR talvez previna a dilatação esperada e mantenha a função sistólica aumentada. A rigidez da

câmara ventricular esquerda é outro fator que pode afetar a resposta do ventrículo esquerdo ao infarto em SHR. Essa falta de redução da rigidez da câmara, apesar de um aumento no volume intermediário e da alta pressão, sugere um aumento na espessura da parede do miocárdio (hipertrofia) em resposta ao infarto.

6.3 Camundongos nocaute para receptores adrenérgicos α_2a e α_2c

O desenvolvimento do estágio final da falência cardíaca decorrente de qualquer insulto ao coração na maioria das vezes envolve uma agressão inicial ao miocárdio, que reduz o débito cardíaco. Subseqüentemente, ocorre hiperatividade do sistema nervoso simpático (SNS) como tentativa de compensação da função miocárdica reduzida. Uma série de evidências mostram que, embora inicialmente benéfica, a exposição crônica do coração a elevados níveis de catecolaminas liberadas pelo SNS e pela glândula adrenal induz mudanças patológicas no coração, que resultam em elevação continuada do SNS e progressiva deterioração da função cardíaca (Altman *et al.*, 1999).

Para melhor entender estes mecanismos, diversos modelos de animais geneticamente modificados têm sido criados. Com o objetivo de estudar o papel do sistema nervoso simpático na fisiopatologia da insuficiência cardíaca, foi desenvolvido um modelo experimental de camundongos que bloqueia os receptores α_2 -adrenérgicos (α_2 -ARKO) (Ruffolo *et al.*, 1991). A ativação destes receptores no tronco cerebral leva à redução do tônus simpático, com resultante queda da frequência cardíaca e pressão arterial (Altman *et al.*, 1999). Estudos anteriores demonstraram que a ausência de duas isoformas dos receptores α_2 -adrenérgicos, α_{2A} e α_{2C} , conduz ao aumento crônico do tônus simpático. O receptor α_{2A} é responsável pela regulação da atividade simpática no tronco

cerebral e, juntamente com o α_{2C} , atua como auto-receptor pré-sináptico que regula a liberação de catecolaminas no átrio.

Camundongos nocaute para os receptores α_{2A} e α_{2C} (α_{2A}/α_{2C} -ARKO) foram obtidos pelo cruzamento entre animais homozigotos C57Bl6/J α_{2A} -ARKO e C57Bl6/J α_{2C} -ARKO. Os heterozigotos foram endocruzados para seleção dos animais com deleção total dos receptores α_{2A} e α_{2C} (Brum *et al.*, 2002) gerando os camundongos que serão utilizados nesse estudo (α_{2A}/α_{2C} ARKO).

Os camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO têm sua função cardíaca alterada aos 4 meses de idade, apresentando capacidade funcional reduzida, como contratilidade cardíaca, além de evidências histológicas de dano aos cardiomiócitos, quando comparados com camundongos selvagens. Alterações em parâmetros hemodinâmicos basais, como aumento da pressão arterial sistólica e da frequência cardíaca, também são demonstrados. No entanto, a hipertensão que se desenvolve nestes animais é moderada e a ausência de hipertrofia cardíaca indica que a hipertensão não é o fator etiológico da insuficiência cardíaca observada neste modelo experimental. Aos 6 meses de idade, há aumento da mortalidade dos animais α_{2A}/α_{2C} ARKO com queda significativa na fração de encurtamento do ventrículo esquerdo e aumento nas suas dimensões sistólica e diastólica. À microscopia eletrônica, evidenciam-se alterações ultra-estruturais nos cardiomiócitos aos 4 e 6 meses de idade, caracterizadas pelo desarranjo miofibrilar, vacuolização do tecido cardíaco e degeneração mitocondrial. Diante destas alterações, este modelo representa importante ferramenta no estudo das alterações funcionais e estruturais no coração decorrentes da hiperatividade simpática crônica. Neste modelo, em contraste com a maioria de modelos murinos existentes, a função cardíaca está alterada por

elevação prolongada da atividade do sistema simpático ao invés de por modificações genéticas que alteram diretamente a expressão de proteínas estruturais ou funcionais do coração (Brum *et al.*, 2002).

Resultados promissores têm demonstrado que as células-tronco da medula óssea melhoram a função cardíaca sob parâmetros clinicamente relevantes, com redução da área de infarto. O fundamental, no momento atual, é que sejam realizados estudos experimentais em modelos animais que mimetizem de forma fidedigna e fisiológica o episódio de infarto agudo de miocárdio, permitindo o estabelecimento do tipo celular mais indicado para este fim e da melhor via para a terapia celular.

Objetivos

O objetivo principal deste trabalho foi o de desenvolver protocolos pré-clínicos seguros e eficientes em roedores, que possam contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no processo de regeneração do músculo cardíaco isquêmico, através da terapia celular, com conseqüente recuperação da função cardíaca.

Objetivos Específicos

- 1- Estabelecer o cultivo das células-tronco mesenquimais (MSCs) da linhagem de ratos SHR no Laboratório de Imunogenética da UFRGS.
- 2- Estabelecer o modelo experimental de infarto agudo do miocárdio (IAM) em ratos hipertensos.
- 3- Avaliar a eficiência das células-tronco mesenquimais na restauração da função cardíaca de ratos hipertensos, modelos IAM, comparando com a fração total da medula óssea (BMC).
- 4- Avaliar a eficiência das vias de entrega endovenosa e intracardíaca, em relação as MSC e BMC, após o infarto agudo de miocárdio.

5- Avaliar a eficiência das MSCs na regeneração da função cardíaca em camundongos portadores de insuficiência cardíaca crônica causada por hiperatividade simpática, ao longo do tempo.

**Systemic delivery of adult stem cells improves cardiac function in
spontaneously hypertensive rats**

Artigo submetido ao periódico *Clinical and Experimental Pharmacology and
Physiology*

**In situ delivery of adult stem cells improves cardiovascular function in
hypertensive rats submitted to Acute myocardial infarction**

Artigo submetido ao periódico *Basic Research in Cardiology*

Intramyocardial transplantation of mesenchymal stem cells reduces mortality by improving cardiac function in a murine model of heart failure

Discussão

Diversos estudos já comprovaram, em diferentes patologias e em diferentes órgãos (Miletic *et al.*, 2007; Semedo *et al.*, 2007; Folkins *et al.*, 2007), que as células-tronco são capazes de regenerar tecidos (Orlic *et al.*, 2001) e promover ganhos funcionais (Iso *et al.*, 2007). Desde os estudos pioneiros de Orlic *et al.* (2001), inúmeros estudos pré-clínicos vêm sendo realizados em roedores com a intenção de compreender o papel das células-tronco na recuperação da função cardíaca após o infarto agudo de miocárdio. Entretanto, nenhum grupo trabalhou, até o presente momento, com um modelo que mimetizasse de forma tão fiel a doença coronariana que leva, pelo menos na maioria das vezes, ao infarto de miocárdio. No modelo SHR que usamos neste trabalho, já existe um comprometimento orgânico prévio ao infarto, provocado pela hipertensão espontânea dos ratos.

As células-tronco têm sido exaustivamente estudadas, e sabemos que sua capacidade regenerativa está na dependência de uma série de fatores inerentes ao organismo onde estão atuando, idade e fase da doença (Ballard e Edelberg, 2007) e sexo (Imanishi *et al.*, 2005). Mais recentemente, Suzuki *et al.* (2007) mostraram que a sobrecarga hemodinâmica interfere na auto-regeneração do músculo cardíaco infartado. Neste estudo, foi induzido um infarto em um grupo de camundongos e, 60 minutos depois, um transplante heterotópico destes corações para camundongos sãos. Os resultados mostraram que, não havendo a sobrecarga hemodinâmica provocada pelo infarto, havia um aumento significativo na auto-regeneração cardíaca, com inibição da apoptose, aumento da proliferação celular e recrutamento de células-tronco. Este tipo de observações

justifica a importância dos modelos usados neste trabalho e reflete a importância da contribuição dos mesmos para melhor entendimento da capacidade regenerativa, tanto das MSCs quanto do *pool* de células-tronco da medula óssea, permitindo a identificação das vias pelas quais cada um desses tipos de célula funciona de maneira mais eficiente.

Um dos principais mecanismos pelos quais células-tronco atuam na regeneração envolve a secreção de fatores parácrinos. Muitos dos fatores produzidos por estas células, e seu papel cardiomiogênico e angiogênico, são conhecidos (Kinnaird *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2006). Alguns estudos (Kucia *et al.*, 2004; Ratajczak *et al.*, 2004) têm sugerido que a utilização da medula óssea total, ou sua fração mononuclear, permite que diferentes tipos de células-tronco e precursores celulares sejam aproveitados, ao invés de apenas a porção tronco-mesenquimal.

Como em nossos experimentos não foram observadas células masculinas no coração das fêmeas receptoras dos transplantes, mesmo com a realização de PCR e *nested* PCR, a secreção de fatores parácrinos parece ter sido o mecanismo responsável pela melhora funcional e tecidual produzida pelas MSCs. Outros estudos têm mostrado resultados semelhantes. Noiseux *et al.* (2006) observaram, em experimentos semelhantes, um alto número de células enxertadas três dias após o transplante, mas uma diminuição ao longo do tempo de modo que muito poucas destas células eram observadas ao final do experimento (28 dias). O mesmo tipo de observação resultou do trabalho de Iso *et al.* (2007) que, utilizando células mesenquimais humanas em camundongos imunodeficientes, fizeram injeções seriadas endovenosas 1, 8, e 15 dias após o infarto. Três semanas após a terapia, foi avaliada a presença destas células

através de imunohistoquímica e PCR quantitativo, quando não foram encontradas células enxertadas. Este resultado é significativo, já que a alta sensibilidade do PCR quantitativo para as seqüências do gene humano *Alu* utilizado como marcador permitiria a detecção de uma célula humana entre 600.000 células do coração do camundongo. As células-tronco mesenquimais são capazes de secretar vários tipos de fatores angiogênicos, antiapoptóticos e mitogênicos, incluindo VEGF e fator de crescimento de hepatócitos (HGF, *hepatocyte growth factor*) entre outros (Nagaya *et al.*, 2005). Estes dois fatores estão envolvidos na mobilização das células-tronco (Laguens *et al.*, 2002; Fujii *et al.*, 2004), mas enquanto VEGF é um forte promotor de angiogênese, HGF possui ação antiapoptótica e está envolvido na ancoragem das células-tronco em seu microambiente. Estudos posteriores seriam necessários para avaliar quais destes fatores estariam mais envolvidos com os resultados do presente trabalho.

Em nosso estudo, comparamos o uso de dois tipos de preparados de células-tronco, nos dois tipos de vias de administração. Foram estudados os efeitos de células totais da medula óssea *versus* sua sub-população de células-tronco mesenquimais, e comparadas as vias de administração sistêmica *versus* intramiocárdica. Este conjunto de fatores é importante, pois além da definição do melhor tipo de célula para cada tipo de doença, também a via preferencial de administração deve ser definida. Em poucos estudos este conjunto de fatores é analisado em conjunto.

Nossos resultados indicaram que cada um destes tipos de preparado celular apresenta melhor resultado terapêutico quando administrado por uma via preferencial. No primeiro trabalho, onde utilizamos a via endovenosa, verificamos que células totais da medula óssea (BMC) induziram uma melhora

significativamente maior da função cardíaca dos ratos infartados quando comparadas com MSCs. Estes resultados sugerem que a capacidade de enxertia de BMCs na medula óssea foi maior do que a das MSCs. A medula óssea é o maior reservatório de células-tronco, que frente aos estímulos adequados podem ser ativadas e subseqüentemente mobilizadas no sangue periférico (Vandervelde *et al.*, 2005). Tem ainda sido sugerido (Kucia *et al.*, 2005) que a medula óssea contém células precursoras de diversos órgãos (músculo, fígado, cérebro e coração, que durante situações de estresse ou injúria (como no infarto) são mobilizadas para o sangue periférico. A administração complementar endovenosa de BMCs no presente estudo pode ainda ter contribuído para a mobilização de células residentes e liberação de fatores parácrinos, que atuaram na recuperação da capacidade funcional dos SHRs infartados. Esses resultados corroboram outros estudos (Amado *et al.*, 2005; Iso *et al.*, 2007).

No segundo conjunto de experimentos, mostramos que as células MSCs, por sua vez, quando injetadas via intramiocárdica, resultam em melhora da capacidade funcional cardíaca bastante superior à induzida por BMCs. Nesta via de administração, uma quantidade maior de células foi enxertada na região peri-infartada e proporcionou uma significativa e importante melhora tanto na recuperação funcional, diminuindo a área de infarto e aumentando a fração de ejeção, quanto na regeneração tecidual, mostrada pelo aumento de capilaridade e diminuição da área de fibrose. Dados da literatura corroboram estes achados (Fukushima, 2007; Iso *et al.*, 2007). A ausência desta ação quando as MSCs foram administradas por via endovenosa talvez possa ser explicada pela pequena quantidade de células que tenham chegado ao coração, devido ao tamanho da

célula, que dificulta sua circulação e resulta em sua retenção nos pulmões (Beyer Nardi e da Silva Meirelles, 2006).

Quando utilizamos BMCs via intracardíaca, essas células não mostraram a mesma eficiência na melhora funcional, mas tiveram importante participação na regeneração do músculo cardíaco, provavelmente devido à variedade de células-tronco ali presentes capazes de agir principalmente na angiogênese. Um dos fatos que explicariam a pequena atuação das BMCs na capacidade funcional, quando administradas por injeção intramiocárdica, poderia ser relacionado ao período em que esta célula foi injetada. Vinte e quatro horas após o infarto, ainda é grande o número de macrófagos presentes no tecido lesado, e um número maior de células injetadas poderia ter efeito mais visível (Iso *et al.*, 2007). Possivelmente a célula-tronco mesenquimal, que possui um componente imunoprotetor, sobreviva mais facilmente neste microambiente (Beyth *et al.*, 2005).

A administração a um grupo de animais de meio de cultivo, adicionado de soro fetal bovino, teve a intenção de comparar se apenas os fatores de crescimento presentes neste soro seriam capazes de atuar de forma independente estimulando o efeito parácrino de regeneração tecidual. Esta hipótese não foi confirmada, visto que não houve diferença entre este grupo e o controle infartado em relação à regeneração tecidual, bem como em relação à maioria das variáveis que avaliaram a capacidade funcional. Neste grupo, foi observada apenas uma melhora da função diastólica, semelhante ao grupo que recebeu células mesenquimais. Não foram encontrados estudos na literatura que possamos comparar com este resultado. O nicho responsável pela quiescência das células-tronco (Fuchs *et al.*, 2004) é composto por diversas populações de

células e componentes da matriz extracelular, como a fibronectina, colágeno e proteoglicanos, mas os fatores que promovem a liberação e mobilização das células ali presentes ainda estão sendo estudados. Um deles é a hipóxia (Okazaki e Maltepe, 2006), que também está presente em situações de dano cardíaco. Talvez a explicação para melhora, mesmo que pequena, no grupo de animais que recebeu o meio de cultivo apenas, possa estar relacionada com este fator.

No terceiro conjunto de experimentos, ainda visando à escolha de um modelo que mimetizasse a disfunção cardíaca, trabalhamos com um camundongo onde a hiperatividade simpática produzida pela ausência dos receptores adrenérgicos α_{2A} e α_{2C} leva a uma consistente insuficiência cardíaca congestiva, com redução importante da fração de ejeção e alta mortalidade (maior que 50% a partir do 5º mês de vida). Esta situação representa um bom modelo para estudo dos efeitos da terapia celular no curso natural desse tipo de insuficiência cardíaca. Os mecanismos pelos quais a hiperatividade simpática contribui com a disfunção cardíaca não são completamente compreendidos, mas acredita-se que regulação defeituosa do ciclo do Ca^{2+} na insuficiência cardíaca é o maior determinante da progressão da disfunção cardíaca e arritmias fatais. A modificação dos parâmetros cardíacos funcionais pelo tratamento com MSCs, neste estudo, parece estar relacionado ao aumento de vascularização e mudanças na regulação intracelular de cálcio. O tempo longo de acompanhamento destes animais é um fato que desperta interesse, pois mesmo depois de 12 meses, a ação terapêutica foi mantida. Este modelo não havia antes sido usado em estudos de terapia celular de doença cardíaca. A falência cardíaca crônica, provocada pela insuficiência cardíaca congestiva, tem respondido de maneira menos favorável à terapia celular (Brehm e Strauer, 2006), mas neste caso, falência

causada por hiperatividade simpática provou manter o microambiente cardíaco mais propício à ação das células.

A padronização de modelos, vias, tipos celulares e protocolos pré-clínicos vem sendo proposta com a finalidade de se estabelecerem condições comparativamente semelhantes entre as pesquisas. Como conclusão destes estudos, acreditamos que os modelos aqui desenvolvidos e testados, a comparação de vias e células, podem contribuir de maneira bastante importante para a padronização de protocolos pré-clínicos para regeneração cardíaca.

Referências

- Allan R, Kass M, Glover C and Haddad H (2007) Cellular transplantation: future therapeutic options. *Curr Opin Cardiol* 22:104-110.
- Altman JD, Trendelenburg AU, MacMillan L, Bernstein D, Limbird L, Starke K, Kobilka BK and Hein L (1999) Abnormal regulation of the sympathetic nervous system in alpha 2 α -adrenergic receptor knockout mice. *Mol Pharmacol* 56:154-161.
- Amado LC, Saliaris AP, Schuleri KH, St John M, Xie JS, Cattaneo S, Durand DJ, Fitton T, Kuang JQ, Stewart G, Lehrke S, Baumgartner WW, Martin BJ, Heldman AW, Hare JM (2005) Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 11474-11479.
- Anderson, JST (2004) In: Goldmann L; Ausiello, ed: Dennis Elevation acute myocardial infarction and complications of myocardial infarction. *CECIL: textbook of medicine*. 22nd ed Philadelphia: Elsevier, P.410-424.
- Anversa P, Kajstura and Leri A (2004) Circulating progenitor cells: search for an identity. *Circulation* 110(20):3158-3160.
- Anversa P, Leri A, Rota M, Hosoda T, Bearzi C, Urbanek K, Kajstura J and Bolli R (2007) Concise review: stem cells, myocardial regeneration, and methodological artifacts. *Stem Cells* 25:589-601.
- Atlas de Doenças Cardíacas e Derrames, da Organização Mundial da Saúde WHO 2002, http://www.who.int/cardiovascular_diseases/resources/atlas/en/ (Maio 01, 2007).
- Ballard VL and Edelberg JM (2007) Stem cells and the regeneration of the aging cardiovascular system. *Circ Res* 100:1116-1127.

- Balsam LB, Wagers A J, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL and Robbins RC (2004) Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 428:668–673.
- Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, Feinberg MS, Etzion S, Tessone A, Miller L, Guetta E, Zipori D, Kedes LH, Kloner RA and Leor J (2003) Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation* 108:863-8.
- Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B and Anversa P (2003) Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 114:763-776.
- Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Shao-Min Y, Finato N, Bussani R, Nadal-Ginard B, Silvestri F, Leri A, Beltrami CA and Anversa P (2001) Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* 344:1750-1757.
- Beyer Nardi N and da Silva Meirelles L (2006) Mesenchymal stem cells: isolation, *in vitro* expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol* (174):249-82.
- Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, Galun E and Rachmilewitz J (2005) Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood* 105:2214-2219.
- Boomsma RA, Swaminathan PD and Geenen DL (2006) Intravenously injected mesenchymal stem cells home to viable myocardium after coronary occlusion and preserve systolic function without altering infarct size. *Int J Cardiol* Dec 20; [Epub ahead of print].
- Brehm M and Strauer BE (2006) Stem cell therapy in postinfarction chronic coronary heart disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med Suppl* 1:S101-104.

- Britten MB, Abolmaali ND, Assmus B, Lehmann R, Honold J, Schmitt J, Vogl TJ, Martin H, Schachinger V, Dimmeler S and Zeiher AM (2003) Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation* 108:2212-2218.
- Brum PC, Kosek J, Patterson A, Bernstein D, Kobilka B (2002) Abnormal cardiac function associated with sympathetic nervous system hyperactivity in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283:H1838-845.
- Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S and Smith A (2003) Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113(5): 643-655
- Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT Jr and Roccella EJ (2003) Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. National Heart, Lung, and Blood Institute; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hipertension* 42:1206-1252.
- da Silva Meirelles L, Chagastelles PC and Nardi NB (2006) Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 119:2204-2213.
- DATASUS 2003,
[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/painel_%20indicadores do SUS.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/painel_%20indicadores_do_SUS.pdf),
(Abril 27, 2007).
- Davani S, Deschaseaux F, Chalmers D, Tiberghien P and Kantelip JP (2005) Can stem cells mend a broken heart? *Cardiovasc Res* 65:305-316.

- Deten A, Volz HC, Clamors S, Leiblein S, Briest W, Marx G and Zimmer HG (2005) Hematopoietic stem cells do not repair the infarcted mouse heart. *Cardiovasc Res* 65:52-63.
- Doggrell SA and Brown L (1998) Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res* 39:89-105.
- Folkins C, Man S, Xu P, Shaked Y, Hicklin DJ and Kerbel RS (2007) Anticancer therapies combining antiangiogenic and tumor cell cytotoxic effects reduce the tumor stem-like cell fraction in glioma xenograft tumors. *Cancer Res* 67:3560-3564.
- Fuchs E, Tumber T and Guasch G (2004) Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* 116: 769-778
- Fujii T, Yamazaki T, Akiyama T, Sano S and Mori H (2004) Extraneuronal enzymatic degradation of myocardial interstitial norepinephrine in the ischemic region. *Cardiovasc Res* 64:125-131.
- Fukushima S, Varela-Carver A, Coppens SR, Yamahara K, Felkin LE, Lee J, Barton PJ, Terracciano CM, Yacoub MH and Suzuki K (2007) Direct Intramyocardial But Not Intracoronary Injection of Bone Marrow Cells Induces Ventricular Arrhythmias in a Rat Chronic Ischemic Heart Failure Model. *Circulation* 2007 Apr 16; [Epub ahead of print].
- Gao J, Dennis JE, Muzic RF, Lundberg M and Caplan AI (2001) The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs* 169:12-20.
- Gowdar LHW, Schetter IT and Krieguer JE (2006) In: Zago MA, ed: Zago MA and Covas DT, *Célula-tronco, a nova fronteira da medicina*. Atheneu, Cap 10; p 131-145.

- Gus M and Fuchs F (2006) Avaliação e tratamento da hipertensão arterial no paciente com diabetes melito. Rev Soc Cardiol Rio Grande do Sul Ano XV nº 08 Mai/Jun/Jul/Ago:1-5.
- Haynesworth SE, Baber MA and Caplan AI (1996) Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells *in vitro*: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. J Cell Physiol 166:585-592.
- Hunt SA (2005) American College of Cardiology; American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure). ACC/AHA 2005 guideline update for the diagnosis and management of chronic heart failure in the adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure). J Am Coll Cardiol 46:e1-82.
- II Diretrizes SBC (2002). Revisão das II Diretrizes para o diagnóstico e tratamento da Insuficiência Cardíaca. <http://publicacoes.cardiol.br/consenso/2002/7905>, (Abril 28, 2007).
- Imanishi T, Kobayashi K, Hano T and Nishio I (2005) Effect of estrogen on differentiation and senescence in endothelial progenitor cells derived from bone marrow in spontaneously hypertensive rats. Hypertens Res 28:763-772.
- Ince H and Nienaber CA (2007) Future investigations in stem cell activation with granulocyte-colony-stimulating factor after myocardial infarction. Nat Clin Pract Cardiovasc Med 4 Suppl 1:S119-122.
- Irigoyen M, LaRussa P, Findley SE, Chen S, Caesar A and Tesler P (2003) Impact of the Advisory Committee on Immunization Practices' 4-day grace period in a low-income community. Am J Prev Med 25:245-250.

- Iso Y, Spees JL, Serrano C, Bakondi B, Pochampally R, Song YH, Sobel BE, Delafontaine P and Prockop DJ (2007) Multipotent human stromal cells improve cardiac function after myocardial infarction in mice without long-term engraftment. *Biochem Biophys Res Commun* 354:700-706.
- Jiang CL, Gu TX and Wang C (2006) Surgical treatment of posttraumatic foreign bodies in the heart or great vessels. *Chin Med J (Engl)* 119:2018-2020.
- Johns TN and Olson BJ (1954) Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals. *Ann Surg* 140:675-682.
- Kajstura J, Fiordaliso F, Andreoli AM, Li B, Chimenti S, Medow MS, Limana F, Nadal-Ginard B, Leri A and Anversa P (2001) IGF-1 overexpression inhibits the development of diabetic cardiomyopathy and angiotensin II-mediated oxidative stress. *Diabetes* 50:1414-1424.
- Kajstura J, Leri A, Castaldo C, Nadal-Ginard B and Anversa P (2004) Myocyte growth in the failing heart. *Surg Clin North Am* 84:161-77.
- Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, Fuchs S and Epstein SE (2004) Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation* 109:1543-1549.
- Korbling M and Estrov Z (2003) Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *N Engl J Med* 349:570-582.
- Kucia M, Ratajczak J and Ratajczak MZ (2005) Are bone marrow stem cells plastic or heterogenous--that is the question. *Exp Hematol* 33:613-623.
- Kucia M, Ratajczak J, Reza R, Janowska-Wieczorek A and Ratajczak MZ (2004) Tissue-specific muscle, neural and liver stem/progenitor cells reside in the bone marrow, respond to an SDF-1 gradient and are mobilized into peripheral blood during stress and tissue injury. *Blood Cells Mol Dis* 32:52-57.

- Kudo M, Wang Y, Wani MA, Xu M, Ayub A and Ashaf M (2003) Impalntation of BM stem cells reduces the infarction and fribrosis in ischemic mouse heart. *J Mol Cell Cardiol* 35: 1113-1119.
- Laguens R, Cabeza Meckert P, Vera Janavel G, Del Valle H, Lascano E, Negroni J, Werba P, Cuniberti L, Martinez V, Melo C, Papouchado M, Ojeda R, Criscuolo M and Crottogini A (2002) Entrance in mitosis of adult cardiomyocytes in ischemic pig hearts after plasmid-mediated rhVEGF165 gene transfer. *Gene Ther* 9:1676-1681.
- Leone AM, Rutella S, Bonanno G, Abbate A, Rebuzzi AG, Giovannini S, Lombardi M, Galiuto L, Liuzzo G, Andreotti F, Lanza GA, Contemi AM, Leone G and Crea F(2005) Mobilization of bone marrow-derived stem cells after myocardial infarction and left ventricular function. *Eur Heart J* 26:1196-204.
- Leor J, Patterson M, Quinones MJ, Kedes LH and Kloner RA (1996) Transplantation of fetal myocardial tissue into the infarcted myocardium of rat. *Circulation* 94 (suppl II):II332-II336.
- Lyngbaek S, Schneider M, Hansen JL and Sheikh SP (2007) Cardiac regeneration by resident stem and progenitor cells in the adult heart. *Basic Res Cardiol* 102:101-114.
- Madamanchi N, Niu XL and Runge MS (2004) A new slice of pie? Estrogen regulation of plasminogen activator inhibitor-1. *Circ Res* 95:228-9.
- Massa M, Rosti V, Ferrario M, Campanelli R, Ramajoli I, Rosso R, De Ferrari GM, Ferlini M, Goffredo L, Bertolotti A, Klersy C, Pecci A, Moratti R and Tavazzi L (2005) Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction. *Blood* 105:199-206.

- Mazhari R and Hare JM (2007) Mechanisms of action of mesenchymal stem cells in cardiac repair: potential influences on the cardiac stem cell niche. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med Suppl* 1:S21-S26.
- Meirelles LS and Nardi NB (2003). Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, *in vitro* expansion, and characterization. *Br J Haematol* 123:702-711.
- Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, Desnos M, Abergel E, Pouzet B, Bel A, Sarateanu S, Scorsin M, Schwartz K, Bruneval P, Benbunan M, Marolleau JP, Duboc D. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 2003 Apr 2;41(7):1078-83.
- Menasche, P (2003) Stem Cell: where we stand. *Dial Cardiovasc Med* 3: 123-133.
- Miletic H, Fischer Y, Litwak S, Giroglou T, Waerzeggers Y, Winkeler A, Li H, Himmelreich U, Lange C, Stenzel W, Deckert M, Neumann H, Jacobs AH and von Laer D (2007) Bystander killing of malignant glioma by bone marrow-derived tumor-infiltrating progenitor cells expressing a suicide gene. *Mol Ther* 2007 Apr 24; [Epub ahead of print].
- Morrison SJ, Wandycz AM, Hemmati HD, Wright DE and Weissman IL (1997) Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Development* 124(10):1929-1939.
- Mukherjee D, Lingam P and Chetcuti S (2002) Missed opportunities to treat atherosclerosis in patients undergoing peripheral vascular interventions. *Circulation* 106: 1909-1912.
- Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, Pasumarthi KB, Virag JI, Bartelmez SH, Poppa V, Bradford G, Dowell JD, Williams DA and Field LJ (2004) Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 428: 664-668.

- Nagaya N, Fujii T, Iwase T, Ohgushi H, Itoh T, Uematsu M, Yamagishi M, Mori H, Kangawa K, Kitamura (2004) Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 287:H2670-H2676.
- Nagaya N, Kangawa K, Itoh T, Iwase T, Murakami S, Miyahara Y, Fujii T, Uematsu M, Ohgushi H, Yamagishi M, Tokudome T, Mori H and Miyatake K, Kitamura S (2005) Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation* 112:1128-1135.
- Nardi NB (2005) All the adult stem cells, where do they all come from? An external source for organ-specific stem cell pools. *Med Hypotheses* 64:811-817.
- Noiseux N, Gnecci M, Lopez-Illasaca M, Zhang L, Solomon SD, Deb A, Dzau VJ and Pratt RE (2006) Mesenchymal stem cells overexpressing Akt dramatically repair infarcted myocardium and improve cardiac function despite infrequent cellular fusion or differentiation. *Mol Ther* 14:840-850.
- Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussin V, Mishina Y, Pocius J, Michael LH, Behringer RR, Garry DJ, Entman ML and Schneider MD (2003) Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:12313-12318.
- Okamoto K, Iizuka Y, Murakami T, Miyake H and Suzuki T (1978) Effects of chlorella alkali extract on blood pressure in SHR. *Jpn Heart J* 19:622-623.
- Okamoto K (1969) Spontaneous hypertension in rats. *Int Rev Exp Pathol* 7:227-270.
- Okazaki K and Maltepe E (2006) Oxygen, epigenetics and stem cell fate. *Regen Med* 1:71-83

- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A and Anversa P (2001) Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410:701-705.
- Perin EC, Dohmann FR, Borojevic R, Silva SA, Sousa ALS, Mesquita CT, Rossi MID, Carvalho AC, Dutra SH, Dohmann HJF, Silva GV, Belém L; Vivacqua R, Rangel FOD, Esporcatte R, Geng YJ, Vaughn WK, Assad JAR, Mesquita ET and Willerson JT (2003) Transendocardial, Autologous Bone Marrow Cell Transplantation for Severe, Chronic Ischemic Heart Failure. *Circulation* 107:2294-2302.
- Perin EC and Lopez J (2006) Methods of stem cell delivery in cardiac diseases. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 3 Suppl 1:S110-113.
- Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA and Braunwald E (1979) Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res* 44:503-512.
- Portal da Saúde 2004, http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/painel_%20indicadores_do_SUS.pdf (Abril 30, 2007).
- Prockop DJ (1997) Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276:71-74.
- Raff M (2003) Adult stem cell plasticity: fact or artifact? *Annu Rev Cell Dev Biol* 19:1-22.
- Ratajczak MZ, Kucia M, Majka M, Reza R and Ratajczak J (2004) Heterogeneous populations of bone marrow stem cells--are we spotting on the same cells from the different angles? *Folia Histochem Cytobiol* 42:139-146.
- Rubart M and Field LJ (2006) Cell-based approaches for cardiac repair. *Ann N Y Acad Sci* 1080:34-48.

- Ruffolo RR Jr, Nichols AJ, Stadel JM and Hieble JP (1991) Structure and function of alpha-adrenoceptors. *Pharmacol Rev* 43:475-505.
- Santalova IM, Chernyshova MS, Murashov AN, Khramov RN and Chailakhyan LM (2006) Therapeutic photobiomodulation of myocardium structure in the hypertensive SHR strain. *Dokl Biol Sci* 408:261-264.
- Semedo P, Wang PM, Andreucci TH, Cenedeze MA, Teixeira VP, Reis MA, Pacheco-Silva A and Camara NO (2007) Mesenchymal stem cells ameliorate tissue damages triggered by renal ischemia and reperfusion injury. *Transplant Proc* 39:421-423.
- Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, Senechal G, Meyers J, Redmond JM, Pittenger MF and Martin BJ (2002) Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg* 73:1919-1925.
- Song YH, Gehmert S, Sadat S, Pinkernell K, Bai X and Matthias N (2007) VEGF is critical for spontaneous differentiation of stem cells into cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 354:999-1003.
- Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Gattermann N, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G and Wernet P (2001) Intracoronary, human autologous stem cell transplantation for myocardial regeneration following myocardial infarction. *Dtsch Med Wochenschr* 126:932-938.
- Suzuki R, Li TS, Mikamo A, Takahashi M, Ohshima M, Kubo M, Ito H and Hamano K (2007) The reduction of hemodynamic loading assists self-regeneration of the injured heart by increasing cell proliferation, inhibiting cell apoptosis, and inducing stem-cell recruitment. *J Thorac Cardiovasc Surg* 133:1051-1058.

- Tang YL, Zhao Q, Zhang YC, Cheng L, Liu M, Shi J, Yang YZ, Pan C, Ge J and Phillips MI (2004) Autologous mesenchymal stem cell transplantation induce VEGF and neovascularization in ischemic myocardium. *Regul Pept* 117:3-10.
- Thompson RB, Emani SM, Davis BH, van den Bos EJ, Morimoto Y, Craig D, Glower D and Taylor DA (2003) Comparison of intracardiac cell transplantation: autologous skeletal myoblasts versus bone marrow cells. *Circulation* 108 Suppl 1:II264-271.
- Tomita M, Adachi Y, Yamada H, Takahashi K, Kiuchi K, Oyaizu H, Ikebukuro K, Kaneda H, Matsumura M and Ikehara S (2002) Bone marrow-derived stem cells can differentiate into retinal cells in injured rat retina. *Stem Cells* 20:279-283.
- Urbanek K, Quaini F, Tasca G, Torella D, Castaldo C, Nadal-Ginard B, Leri A, Kajstura J, Quaini E and Anversa P (2003) Intense myocyte formation from cardiac stem cells in human cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:10440-10445.
- van Laake LW, Hassink R, Doevendans PA and Mummery C (2006) Heart repair and stem cells. *J Physiol* 577:467-478.
- Vandervelde S, van Luyn MJ, Tio RA and Harmsen MC (2005) Signaling factors in stem cell-mediated repair of infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 39:363-376.
- Wang Y, Haider HKh, Ahmad N, Zhang D and Ashraf M (2006) Evidence for ischemia induced host-derived bone marrow cell mobilization into cardiac allografts. *J Mol Cell Cardiol* 41:478-487.
- Watt FM and Hogan BL (2000) Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* 287:1427-1430.
- Wollert KC and Drexler H (2004) Cell therapy for acute myocardial infarction: where are we heading? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 1:61.
- Wollert KC and Drexler H (2005) Mesenchymal stem cells for myocardial infarction: promises and pitfalls. *Circulation* 112:151-153.

- Wollert KC and Drexler H (2006) Cell-based therapy for heart failure. *Curr Opin Cardiol* 21:234-239.
- Xu M, Uemura R, Dai Y, Wang Y, Pasha Z and Ashraf M (2007) *In vitro* and *in vivo* effects of bone marrow stem cells on cardiac structure and function. *J Mol Cell Cardiol* 42:441-448.
- Yamori Y, Horie R, Tanase H, Fujiwara K, Nara Y and Lovenberg W (1984) Possible role of nutritional factors in the incidence of cerebral lesions in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 6:49-53.
- Zdrojewski T, Gaudron P, Whittaker P, Poelzl S, Schiemann J, Hu K and Ertl G (2002) Ventricular remodeling after myocardial infarction and effects of ACE inhibition on hemodynamics and scar formation in SHR. *Cardiovasc Pathol* 11:88-93.
- Zhang S, Wang D, Estrov Z, Raj S, Willerson JT and Yeh ET (2004) Both cell fusion and transdifferentiation account for the transformation of human peripheral blood CD34-positive cells into cardiomyocytes *in vivo*. *Circulation* 110:3803-3807.