

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Isabella Mariana de Assis

Injeção transendocárdica de células mononucleares
autólogas de medula óssea em isquemia cardíaca:
relato anatomopatológico e imunohistoquímico *post-*
mortem

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título
de Mestre em Biologia Celular e
Estrutural na área de Biologia
Celular

Orientador: **Prof. Dr. Radovan Borojevic**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

As76i

Assis, Isabella Mariana de
Injeção transendocárdica de células mononucleares
autólogas de medula óssea em isquemia cardíaca: relato
anatomopatológico e imunohistoquímico *post-mortem* /
Isabella Mariana de Assis. -- Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: Radovan Borojevic.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Células-tronco. 2. Neovascularização. 3.
Isquemia. I. Borojevic, Radovan. II. Universidade
Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Transendocardial autologous bone marrow mononuclear cell injection in
ischemic heart failure: *Postmortem* anatomicopathologic and immunohistochemical findings.

Palavras-chave em inglês: Stem cells; Neovascularization; Ischemia.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Radovan Borojevic, Mario Mariano, Edson Rosa Pimentel.

Data da defesa: 04/11/2005.

Campinas, 04 de novembro de 2005

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Radovan Borojevic (Orientador)

Assinatura

Prof. Dr. Mário Mariano

Assinatura

Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel

Assinatura

Profa. Dra. Laurecir Gomes

Assinatura

Profa. Dra. Maria Angélica Miglino

Assinatura

“Para mim só existe um caminho, o caminho do coração. E nele eu
viajo, viajo, olhando, olhando...sem fôlego.”

Carlos Castañeda, Uma estranha realidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, pelas oportunidades oferecidas, por me guardar e me iluminar em todos os meus caminhos.

Aos meus pais, Nonoir e Francisca, que eu tanto amo e me orgulho, e que sempre me apoiaram, incentivaram, ensinaram meus valores, me ouvem, me socorrem quando preciso, enfim, que são grande parte da pessoa que me tornei.

Aos meus queridos irmãos, Artur, Bárbara e Laura, que estão sempre presentes na minha vida, me trazendo tantas alegrias e apoio.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Radovan Borojevic, por ter me acolhido em seu grupo de pesquisa com tanto carinho e atenção, ter acreditado no meu trabalho, me incentivado em todos os momentos, pela oportunidade concedida. A Profa. Dra. Christina Maeda Takiya, que me recebeu de maneira tão carinhosa em seu laboratório, que me ensinou de tudo no dia-a-dia e possibilitou a realização dos experimentos deste trabalho. Para mim, vocês professores consistem em mais

que um exemplo de pesquisador, sempre perseverantes e prontos para o trabalho.
Aos senhores, minha eterna gratidão.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e atenção.

Aos amigos do laboratório da UFRJ: Bernardo, o técnico, mais que isto, é um grande amigo para vida toda. Luciana, grande amiga, companheira na cidade do Rio de Janeiro, a carioca mais às avessas que conheci! Minhas queridas amigas, Ana Patrícia (exemplo de bom humor!), Aline (tão atenciosa e amiga em todos os momentos), Juliana (uma pessoa tão querida, tão presente, agregada ao nosso laboratório) e TODOS os outros, não menos importantes, Túlio, Leo, Priscila, Virgínia, Ramon, Lorena, Silvânia...que em todas as horas tornavam o dia a dia no trabalho tão agradável e mais descontraído. Devo ainda dizer que nunca me esquecerei da festa surpresa de aniversário que vocês me proporcionaram...fizeram uma paulista feliz, mesmo longe de casa!

Aos amigos da Unicamp também! Tati, Sérgio, Maê, Macau, Alexandre...amigos que me acompanham e me fazem feliz desde a graduação. Fernanda, Francis, Patrick (e tantos outros), também amigos e companheiros, principalmente durante as incansáveis horas de estudo de biologia celular e histologia.

Não poderia ainda me esquecer das minhas queridas amigas com as quais morei em Campinas (Júlia, Sara, Larissa, Paula, Fernanda, Núbia, Verena, Nancy e Naomi...tantas mulheres num casarão só...que viviam tão bem!). Meninas, foi um prazer ter convivido com vocês, pena ter sido por tão pouco tempo.

Em especial, a minha amiga Thaís Mantovani, que me acolheu tão carinhosamente no Rio de Janeiro na hora em que mais precisei, tão generosa...que me ajuda tanto e que consiste em um belo exemplar de ser humano prático do sexo feminino!

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), por me fornecerem suporte para minha formação profissional. Em especial, aos docentes do departamento de Biologia Celular (UNICAMP) e departamento de Histologia e Embriologia (UFRJ).

A CAPES, pela bolsa de mestrado concedida.

As secretárias, Líliam (Depto. de biologia celular – UNICAMP) e Gorete (secretária pessoal do Prof. Radovan - UFRJ), meus sinceros agradecimentos, pois me ajudaram em todos os momentos. Sem as quais teria ficado muito difícil ter conseguido realizar este trabalho Campinas/Rio de Janeiro.

E a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação profissional e como ser humano até o dia de hoje.

RESUMO

Terapias celulares para o tratamento de doença isquêmica cardíaca estão atualmente sob investigação. Foram anteriormente publicados pelo nosso grupo os resultados de ensaio clínico na fase I, onde células autólogas mononucleares da medula óssea foram injetadas por via transendocárdica em pacientes com doença cardíaca isquêmica terminal. O estudo atual reporta os achados anatomopatológicos do estudo *post-mortem* de um dos pacientes tratados, que morreu 11 meses após a terapia celular objetivando verificar a presença de neovascularização nas zonas tratadas assim como descrever a possibilidade de ter havido transdiferenciação de populações celulares. Trata-se de estudo necroscópico de paciente de 55 anos com cardiomiopatia isquêmica, com defeito parcial reversível na parede anterolateral e defeito fixo (cicatriz) na parede posterior, pertencente à classe funcional III (NYHA – New York Heart Association) e angina classe III (CCS – Canadian Cardiovascular Society). O paciente recebeu um total de 30 milhões de células mononucleares da medula óssea colhidas 2 horas antes da injeção, obtidas através de punção óssea. As células foram injetadas por via transendocárdica na parede anterolateral do ventrículo esquerdo com o auxílio de mapeamento eletromecânico. Fragmentos das paredes ventriculares, anterolateral (a que recebeu a terapia celular), septal (septo interventricular, a qual tinha perfusão normal e que não recebeu terapia celular) e a inferoposterior (a qual tinha cicatriz extensa e sem terapia celular) foram retiradas durante a necropsia e processados em parafina e congeladas.

Anticorpos foram utilizados contra fator VIII para células endoteliais, actina α de músculo liso para pericitos, troponina T, actina α sarcomérica e actinina α sarcomérica e desmina para identificação de cardiomiócitos. Estudo histomorfométrico da densidade capilar nas diferentes paredes ventriculares e da densidade de capilares contendo pericitos foi realizado, assim como foi quantificado o número de capilares/mm² das paredes anterolateral e posterior, dados estes submetidos a testes estatísticos. Nossos resultados demonstraram não haver crescimento excessivo de nenhuma população celular, havendo aumento significativo da densidade de capilares com e sem pericitos na parede anterolateral. Nas zonas de cicatrizes comparando-se a parede anterolateral com a posterior foi verificado também haver aumento significativo do número de capilares. Nesta mesma parede houve uma hiperplasia dos pericitos, algumas destas células adquiriram elementos do citoesqueleto e proteínas contráteis (desmina e troponina).

Em conclusão, nosso estudo demonstrou que o procedimento utilizado é seguro e que leva ao aumento da densidade capilar, hiperplasia pericitária com provável transdiferenciação de pericitos em cardiomiócitos.

ABSTRACT

Cell-based therapies for treating ischemic heart disease are currently under investigation. We previously reported the results of a human phase I trial of transendocardial injection of autologous mononuclear bone marrow cells in patients with end-stage ischemic heart disease. The current report focuses on *post mortem* cardiac findings from one of the treated patients, who died 11 months after cell therapy in order to verify modifications on cardiac structure produced by the procedure. The heart of study was obtained on necropsy of a 55 years old patient suffering of an ischemic cardiomyopathy with a reversible partial defect on anterolateral ventricular wall (scar), a fixed one in the posterior wall. At enrollment, he was in New York Heart Association (NYHA) functional class III and Canadian Cardiovascular Society (CCS) angina class III. Patient was treated with 30 millions bone marrow mononuclear cells collected 2 hours and injected transendocardially with the guidance of electromechanical mapping, into the anterolateral wall of the left ventricle. Fragments of ventricular wall, anterolateral, septal (interventricular) and posterior walls were collected for histology and frozen. Immunohistological detection of endothelial and pericytic population allowed the quantification of capillaries and pericytic containing capillaries in anterolateral, septal and posterior walls (surface density). The amount of capillaries present in fibrotic zones of anterolateral and posterior walls were also quantified.

No signs of adverse events were found in the cell-injected areas. Capillary density was significantly higher ($P<0.0001$) in the anterolateral wall than in the

previously infarcted tissue in the posterior wall. The increased vascularity of the anterolateral wall was associated with hyperplasia of pericytes, mural cells, and adventitia. Some of these cells had acquired cytoskeletal elements and contractile proteins (troponin, sarcomeric α -actin, actinin). In conclusion, our morphological and immunocytochemical analysis of the area that received autologous bone marrow cell injections showed no abnormal cell growth or tissue lesions, thereby suggesting the safety of transendocardial cell injections. The treated areas had a heightened capillary density. Pericyte hyperplasia and pericytes with cytoskeletons and early cardiomyocyte morphology were seen only at injected sites.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
2. Objetivos gerais.....	28
2.1. Objetivos específicos.....	28
3. Material e Métodos.....	30
3.1. Paciente.....	30
3.2. Terapia celular.....	31
3.3. Acompanhamento clínico.....	32
3.4. Necrópsia.....	33
3.5. Estudo histológico.....	33
3.6. Estudo imunohistológico.....	34
3.7. Estudo histomorfométrico.....	34
4. Resultados.....	36
4.1. Resultados anatomopatológicos.....	36
4.2. Resultados histológicos.....	37
4.3. Resultados imunohistoquímicos.....	38
4.4. Análise morfométrica.....	41
5. Discussão.....	53
6. Conclusões.....	63
7. Referências bibliográficas.....	64
8. Apêndice.....	76

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CAD - coronary artery disease.

CCS - *Canadian cardiovascular society*.

CFU - unidades formadoras de colônia.

EPC - células progenitoras endoteliais.

FISH - *Fluorescent in situ hybridization*.

G-CSF - *Granulocyte colony-stimulating factor*.

GFP - *green fluorescent protein*.

HSC - células tronco hematopoéticas.

LIF - fator inibidor de leucócitos.

METs - equivalentes metabólicos.

MSC - células tronco mesenquimais.

MVO₂ - máximo consumo de O₂.

NYHA - *New York heart association*.

PDGF - *platelet derived growth factor*.

SP - side population.

SPECT - *Single Photon Emission Computer Tomography*.

SUS - Sistema Único de Saúde.

TGF- β - *transforming growth factor β* .

VEGF - *vascular endothelial growth factor*.

1. INTRODUÇÃO

"A regeneração de partes do corpo têm fascinado os humanos (e os cientistas) desde o começo da civilização. Mais de duzentos anos atrás e mesmo antes de sabermos algo sobre a biologia do desenvolvimento, a regeneração de partes do corpo de invertebrados e de anfíbios já haviam sido documentadas" (sic) (TSONIS, 2002). No entanto, atualmente, podemos notar um grande potencial para reparo em vertebrados, inclusive humanos.

Há algum tempo explora-se o potencial das terapias celulares para o tratamento de diversas doenças que afetam os órgãos vitais. Muito ainda se discute sobre a presença das células tronco nos tecidos, como estas podem ser identificadas e possivelmente isoladas, e finalmente, como elas poderiam contribuir para o tratamento de doenças debilitantes (ALISON, 2002).

Muitas estratégias são atualmente investigadas e incluem: terapia celular derivada de células autólogas, terapia celular derivada de linhagens celulares estabelecidas, terapia celular derivada de uma variedade de células tronco, incluindo medula óssea/células tronco mesenquimais, células tronco de cordão umbilical, células tronco embrionárias, assim como tecidos e órgãos de animais que foram modificados geneticamente (FODOR, 2003).

A biologia regenerativa foi recentemente reconhecida como um campo promissor com objetivos e metas, que será capaz de solucionar problemas

médicos e trazer a esperança de novos tratamentos terapêuticos para doenças ou lesões que remédios convencionais e mesmo novas drogas biológicas não podem curar efetivamente (FODOR, 2003). Desta forma, entender os mecanismos básicos pelos quais os tecidos são reparados e restaurados são necessários. Durante os últimos anos, muitos trabalhos foram publicados mostrando a existência de células tronco e sua participação na renovação tecidual.

Os termos, reparo tecidual e regeneração, são usados às vezes indiscriminadamente e basicamente se referindo à mesma coisa. Ambos podem ser usados para descrever como um tecido particular ou ainda, parte de um órgão que pode consistir de dois ou mais tecidos, são reconstruídos depois de uma lesão. Porém, estes termos não devem ser confundidos com cicatrização. Na cicatrização, o ferimento é preenchido por um tecido colagênico sem que ocorra restauração do tecido lesado. Ao contrário, durante a regeneração tecidual, o tecido original lesado é substituído por uma cópia bem parecida do que era antes.

A regeneração pode ocorrer através de dois modos. Primeiro, através de células diferenciadas vizinhas ao local lesado. Neste caso, estas células restauram o tecido através de proliferação ou por transdiferenciação. Queremos nos referir transdiferenciação quando células locais são capazes de se dediferenciar (perdendo assim as suas características originais) e assumem um fenótipo diferente. Esta estratégia é usada em muitos casos, tais como fígado e pâncreas, e é uma característica de regeneração epimórfica (mais complexa, a qual envolve a regeneração de partes inteiras do corpo, assim como nos invertebrados e anfíbios). O segundo modo envolve as células tronco, estas

podem ser locais (tecido-específicas, que residem em diversos tecidos adultos) e depois da lesão, se diferenciam e reconstituem a parte perdida. Exemplos de células tronco tecido-específicas envolvem cérebro, músculo esquelético, pele, fígado e células hematopoéticas. Uma outra alternativa, no entanto, são células tronco não tecido-específicas. Estas células residem na medula óssea e podem migrar para o sítio lesado e se diferenciar em tecido nervoso, músculo esquelético, músculo cardíaco, fígado, e ainda células da linhagem mesenquimal (TSONIS, 2002). Assim sendo, podem atuar na regeneração de eventuais danos sofridos em qualquer um destes tipos de tecidos citados, configurando-se como instrumento fundamental para o tratamento de muitas doenças e trazendo alternativas clínicas e melhora da qualidade de vida para a população.

As células tronco são ancestrais das células especializadas que compõem os tecidos e órgãos dos organismos. Mesmo na vida pós-natal, as células tronco regeneram tecidos que perdem continuamente suas células por maturação ou senescência. Dentre estes podemos citar: camadas epiteliais da pele, mucosa pulmonar e intestinal, e tecidos conjuntivos como: osso, cartilagem, sangue, músculo e medula óssea. E ainda, de acordo com evidências recentes, pode-se incluir coração e cérebro na lista de tecidos adultos com capacidade regenerativa. A taxa muito baixa de renovação de células nervosas e cardíacas pode explicar o fato de estas células em renovação serem tão dificilmente detectadas nestes órgãos (KAJSTURA, 1998).

As células tronco têm sido alvo de intensa investigação devido às suas propriedades biológicas e à sua potencial aplicação na medicina. Porém, muitos

especialistas da área ainda se questionam o que vem a ser exatamente uma célula tronco. Muitos pesquisadores definem células tronco de maneiras diferentes, no entanto, uma definição usual, simplificada e geralmente aceitável pode ser: “São células que tem a capacidade de auto-renovação e de geração de diversas linhagens celulares diferentes”. A partir deste momento, muitas indagações surgem no campo de trabalho dos pesquisadores da área. Morrison (1997) se questiona nos seguintes aspectos, por exemplo: como cada divisão celular pode ser capaz de transmitir a propriedade “tronco” (capacidade de diferenciação) para pelo menos uma das duas células-filhas? E ainda, o que determina se a divisão da célula tronco será para a auto-renovação ou se deve seguir para a diferenciação?

Além da capacidade de auto-renovação e potencial diferenciação, outras propriedades podem ser atribuídas às células tronco. Algumas delas são: a habilidade de sofrer divisões assimétricas, de existirem em formas quiescentes em diferentes órgãos, e de regenerarem todas as células que constituem determinado tecido (HALL & WATT, 1989; POTTEN & LOEFFLER, 1990). Entretanto, estas propriedades das células tronco podem ser observadas em alguns tecidos e organismos, mas não necessariamente em outros. Isto leva à compreensão de quanto é difícil elaborar uma definição universal para uma célula tronco.

Pouco ainda se conhece quanto ao controle dos mecanismos moleculares destas células, e alguns autores ainda se perguntam se estes mecanismos são compartilhados por todas as células tronco dos diferentes tecidos, e também, de espécies distintas.

Para entendermos como a proliferação das células tronco é controlada, não nos basta apenas entender como a auto-renovação ocorre, pois nem toda divisão celular envolve auto-renovação. Haveriam “sinais” específicos que manteriam o estado de célula tronco (indiferenciada) ou mitose (proliferação)? Ou seriam estes estados mantidos por “sinais” diferentes? O que limitaria o número das células tronco? Como podemos perceber, algumas perguntas permanecem em aberto.

Uma possibilidade seria que as células tronco poderiam viver apenas em micro-ambientes restritos em cada tecido. Nestes micro-ambientes, determinados fatores manteriam seu estado, ou então, outros fatores que induzem a diferenciação poderiam ser excluídos (TRENTIN, 1970). Se o espaço ou micro-ambiente do tecido onde as células tronco estão alojadas é limitado, o número de células tronco também seria limitado, para que estas possam caber no espaço.

A proliferação das células tronco pode também aumentar em resposta à lesão tecidual, para que células perdidas possam ser restituídas. Em princípio, a indução da divisão celular nos diferentes sistemas pode ocorrer através da liberação de mitógenos pelas células que estão morrendo, ou ainda, pela falta de inibidores que são produzidos normalmente pelas células saudáveis, ou ambos. No entanto, nenhuma evidência concreta existe ainda acerca destas possibilidades.

Com base na argumentação acima, outros trabalhos sugerem que tal controle da proliferação das células tronco por feedback deve ser local (POTTEN & LOEFFLER, 1990). Por outro lado, REYNOLDS & WEISS (1992), DONOVAN (1994), GRITTI e colaboradores (1996), dentre outros autores, demonstraram que existem fatores não locais que são capazes de induzir a auto-renovação

repetidamente quando as células normalmente iriam se manter quiescentes ou diferenciadas. Em resumo, estes resultados sugerem que existem fatores locais e não locais responsáveis pelo controle da auto-renovação das células tronco, e que estes por si só ou mesmo combinados, podem induzir ou inibir a proliferação celular. Uma quantidade muito pequena de fatores envolvidos foi identificada. HARRISON e ZHONG, em seu trabalho em 1992, relataram que nem todas as células pluripotentes hematopoéticas têm a mesma capacidade de auto-renovação. Nesta época, os pesquisadores acreditavam que esta diferença era devido ao ambiente em estas células estavam expostas. Porém, em 1994, MORRISON e WEISSMAN, revelaram que diferentes subpopulações de células hematopoéticas (identificadas através da expressão de marcadores celulares) exibem a mesma diferença na capacidade de auto-renovação, mesmo quando colocadas em ambientes equivalentes *in vivo*. Este fato sugere que esta diferença seja intrínseca de cada célula. Desta maneira, a base molecular da capacidade de auto-renovação, bem como a manutenção do estado indiferenciado, ainda permanecem em fase de elucidação.

A origem das células tronco nos tecidos em regeneração está agora em questão. Estas células tronco tecido-específicas sustentam os tecidos por toda a vida, e são responsáveis pela regeneração de tecidos lesados, por exemplo, por radiação ou tratamentos quimioterápicos. Como podemos encontrar em diversos trabalhos publicados, as células da medula óssea apresentam a capacidade de repopular muitos tecidos não-hematopoéticos (ORLIC, 2001a, b, c; PERIN, 2003a; WANG & TRESTER, 2004). Sendo assim, a medula óssea serve como um

reservatório central de células tronco primitivas que podem repopular tecidos somáticos.

Uma grande variedade de estudos sugere que células tronco adultas sofrem novos padrões de desenvolvimento por um processo que conhecemos como transdiferenciação ou plasticidade. Estas observações estimularam um agitado período de descoberta e grande expectativa, que foram seguidos de controvérsia já que dados emergentes sugeriam fusão célula – célula como uma interpretação alternativa para a transdiferenciação (ALVAREZ-DOLADO, 2003). Há algumas correntes de interpretação deste processo de regeneração em questão. Alguns autores acreditam que a transdiferenciação seja o evento responsável mais provável, enquanto que outros apostam na fusão celular como argumento mais convincente para explicação do surgimento de novas células nas áreas que sofreram alguma lesão prévia. Entretanto, até mesmo os pesquisadores que acreditam na fusão celular ainda não estão totalmente convencidos de que a fusão precede a diferenciação ou vice-versa (OH, 2003).

Os estudos de células tronco são geralmente focados em hematopoese e neurogênese, o que pode ser justificado pelo fato de que estas células foram as mais rigorosamente e diretamente identificadas. As células tronco hematopoéticas foram isoladas utilizando-se anticorpos para antígenos de superfície celular (SPANGRUDE, 1988) e suas propriedades funcionais foram estabelecidas por transplante em animais hospedeiros irradiados de forma letal, em condições onde a progênie de uma única célula tronco pôde ser identificada.

O dogma de que o cérebro constituiria um tecido incapaz de regeneração vem sendo desacreditado atualmente. Recentemente, muitos trabalhos têm mostrado que algumas regiões do cérebro adulto são capazes de exibir o processo de neurogênese. Este processo ocorre devido à presença de células progenitoras já identificadas, responsáveis pelo desenvolvimento neural embrionário e pós-natal (ALVAREZ-BUYLLA & LOIS, 1995). Estas células apresentam a mesma capacidade de auto-renovação e são capazes de se diferenciarem em neurônios, astrócitos e oligodendrócitos, e ainda, em diversas linhagens celulares se mantidas sob condições adequadas (TSONIS, 2002). Desta maneira, neurônios e células da glia poderão ser produzidas para o tratamento de doenças neurodegenerativas como Mal de Parkinson e Alzheimer. O mesmo vem ocorrendo na área da cardiologia, onde o infarto do miocárdio é considerado por natureza uma lesão irreversível. Nenhum medicamento ou procedimento usado clinicamente consegue total eficácia na substituição da cicatriz do infarto em um tecido contrátil funcional. No entanto, este panorama atual também vem sendo novamente delineado (VANDERVELD, 2005), já que algumas terapias estão disponíveis para melhorar o prognóstico de pacientes com infarto agudo do miocárdio.

Embora as células tronco embrionárias tenham sido vistas com um maior potencial de proliferação e diferenciação se comparadas com as células tronco adultas da medula óssea, a falta de disponibilidade e muitos debates éticos ainda impedem a sua aplicação clínica, causando muita polêmica (PERIN, 2003a).

O emprego de células autólogas (oriundas do próprio indivíduo) diferenciadas tecido-específicas retiradas e expandidas em cultura, e posteriormente reintroduzidas no sítio da lesão do mesmo indivíduo seria o procedimento ideal, pensando em uma perspectiva imunológica. Desta maneira, as células utilizadas têm o mesmo conteúdo de DNA do indivíduo em tratamento, tornando-se desnecessárias as preocupações referentes a problemas causados por rejeição.

Porém, mesmo com o atrativo desta “self” reparação, sem a necessidade da utilização de drogas imunossupressivas, esta técnica tem certas limitações referentes à coleta do tecido e sua expansão em cultura. Embora eliminando a questão da rejeição, a coleta do tecido original requer um procedimento cirúrgico, ao menos uma biópsia, que constitui uma agressão ao tecido criando um segundo sítio defeituoso que pode causar dor e desconforto. Ainda, culturas primárias podem tornarem-se senescentes ou se dediferenciam durante o período da cultura (FODOR, 2003).

Células progenitoras autólogas coletadas de um indivíduo e usadas para seu próprio reparo seria também um procedimento imunologicamente ideal, já que eliminaríamos novamente o problema da rejeição através da utilização de células com o mesmo conteúdo genético. A fonte mais comumente utilizada de células progenitoras são as células derivadas da medula óssea obtidas a partir de punção. As células do compartimento mesenquimal dentro da medula óssea têm a capacidade de se diferenciar em muitos tipos celulares se mantidas sob condições de crescimento adequadas. Alguns estudos exploram o uso destas células estromais da medula óssea para reparo de defeitos ósseos. É sabido que estas

células estromais (também chamadas de células mesenquimais) são células progenitoras de componentes do tecido ósseo, mas também têm a capacidade de se diferenciar em condrócitos, células reticulares, adipócitos, e ainda sob condições experimentais, em células nervosas e miogênicas, revelando certo grau de multipotencialidade (BIANCO, 2001).

Estudos recentes apostam na utilização de células progenitoras da medula óssea para reparar uma variedade de tipos de tecidos, inclusive cartilagem, miocárdio, fígado, medula espinhal e até mesmo para males causados pela diabetes (FODOR, 2003). Embora estes estudos estejam em fase de experimentação, a potencial capacidade de diferenciação celular destas células progenitoras em diferentes fenótipos teciduais representa um campo promissor para este tipo de pesquisa de interesse aplicado em diversas áreas da medicina. A partir deste momento daremos destaque especial para tratamentos na área da cardiologia.

O papel da terapia celular no tratamento de doenças isquêmicas do coração consiste em um tema que está atualmente sob investigação. As doenças isquêmicas do coração compreendem aproximadamente 50% das mortes cardiovasculares e é a principal causa do desenvolvimento de lesões cardíacas congestivas. Só nos EUA, são mais de 400.000 casos novos a cada ano, atingindo tanto homens como mulheres de diferentes grupos étnicos. No Brasil, segundo o SUS (Sistema Único de Saúde) 420.000 internações decorrentes de doenças cardíacas foram relatadas em 2000, das quais resultaram em 30.000 mortes no mesmo ano (dados coletados no portal do ministério da saúde).

Dado que o miocárdio tem sua capacidade regenerativa limitada após lesões isquêmicas, o uso terapêutico de células progenitoras exógenas ganharam grande interesse. Demonstrações *in vitro* de diferenciação de cardiomiócitos funcionais a partir de células progenitoras derivadas de medula óssea já foram realizadas (XU, 2004), assim como estudos *in vivo* em modelos animais. Os resultados obtidos são promissores, principalmente no reparo e regeneração de lesões musculares agudas e crônicas do miocárdio.

Em humanos, tentativas semelhantes têm sido realizadas, através da introdução de células derivadas da medula óssea por meio cirúrgico, intracoronariano, ou transendocárdico, com o objetivo de que estas possam melhorar lesões cardíacas (STRAUER, 2002).

Porém, este vasto campo de possibilidades aberto pelas células tronco na cardiologia tem freqüentemente gerado mais perguntas do que respostas aos médicos e pesquisadores. Perin (2003a) em decorrência a seus trabalhos na área, levanta as seguintes questões: quais pacientes com doença cardiovascular devem ser considerados para a terapia celular? Que tipo(s) de células tronco devem ser utilizadas? Qual a quantidade e concentração de células que deve ser administrada? Através de quais mecanismos as células tronco sobrevivem e se diferenciam? A melhora funcional e morfológica cardíaca é ativa (isto é, por aumento da contratilidade) ou passiva (ou seja, limitando a expansão da área infartada e o remodelamento)? Qual será a expectativa de vida das células tronco implantadas no coração? A terapia celular é segura? Há algum potencial

tumorigênico das células tronco? Qual pode ser o benefício do implante de células tronco em pacientes não isquêmicos?

ASAHARA e colaboradores relatam que a vasculogênese pós-natal é presente e que as células tronco contribuem diretamente na formação de novos vasos sanguíneos nos adultos. Esta descoberta trouxe novas idéias acerca dos mecanismos de reparo cardíaco. No adulto, a neovascularização não depende apenas da angiogênese (que se desenvolve a partir de vasos pré-existentes). Além disso, células progenitoras endoteliais da medula óssea assumem um papel na vasculogênese (fisiológica e patológica) e circulam no sangue periférico (PERIN, 2003b).

O modo com que estas células chegam ao sítio devido constitui um problema a ser resolvido e entendido. O processo que denominamos de recrutamento (corriqueiramente designado como "homing" pelos pesquisadores da área) refere-se à chegada das células na área lesada, por exemplo, no miocárdio infartado. O próprio processo de isquemia e hipóxia podem aumentar a permeabilidade vascular, causar a liberação de fatores quimiotáticos e promover a expressão de proteínas de adesão, que podem facilitar o "homing".

Atualmente, é bem possível que vários pesquisadores pensem em uma técnica de "angiogênese terapêutica", e neste caso há de se considerar os diferentes tipos de células tronco que podem ser utilizadas, dentre elas: células mononucleares da medula óssea, e também subfrações de células de medula óssea incluindo células progenitoras endoteliais, células estromais e também células tronco hematopoéticas.

A utilização de mioblastos (que podem ser facilmente coletados através de pequenas amostras de músculo esquelético e expandidos em cultura) no emprego da terapia celular com bons resultados foi também relatada por diversos pesquisadores (MENASCHE, 2001). Os mioblastos, também referidos como células satélites pelos pesquisadores, são células progenitoras capazes de mediar normalmente a regeneração de músculo esquelético (KOH, 1993; TAYLOR, 1998). No princípio, pesquisadores esperavam que os mioblastos poderiam se transdiferenciar em cardiomiócitos, no entanto, o estudo de muitas linhagens indicou que estas células permanecem comprometidas com o músculo esquelético (salvo algumas exceções em que pareceu ocorrer fusão celular dos mioblastos e células cardíacas do hospedeiro) (REINECKE, 2002). As células musculares esqueléticas adultas não expressam proteínas de adesão ou de junções GAP que são importantes no acoplamento elétrico-mecânico entre as células do miocárdio (REINECKE, 2000). Desta maneira, dados fisiológicos de outros trabalhos sugerem que os mioblastos não batem em sincronia com o restante das células cardíacas (LEOBON, 2003; RUBART, 2004). Dessa maneira, há indicações de que estes possam causar arritmias malignas e outras complicações futuras, sugerindo algum tipo de discordância entre as propriedades contráteis e estruturais dos mioblastos em oposição às suas características eletrofisiológicas (MAKKAR, 2003).

Até recentemente, o coração adulto consistia em um dos últimos órgãos em que ainda não haviam identificado nenhum tipo de população de células progenitoras. No entanto, estudos atuais sugerem que assim como o cérebro, o

coração pode conter células progenitoras residentes com algum potencial para cardiomiogênese. BELTRAMI e colaboradores (2003) isolaram e expandiram em cultura células de coração adulto de camundongos que expressavam c-kit, posteriormente, as injetou em coração com isquemia aguda. Em seguida, foi demonstrado que estas células foram capazes de se diferenciar em cardiomiócitos, em células musculares lisas e endotélio, regenerando o tecido lesado. DAWN (2005) relatou recentemente que estas mesmas células administradas intracoronariamente foram capazes de atravessar a barreira vascular e melhorar a função ventricular em modelos de infartos em ratos. Uma segunda população de células progenitoras foi descrita por OH e seus colaboradores (2003), onde foram isoladas células de coração adulto de camundongo baseadas na expressão de Sca-1. Quando estas células foram submetidas ao tratamento com 5-azacitidina, alguns genes específicos de cardiomiócitos foram ativados *in vitro*. As células Sca-1⁺ foram injetadas via intravenosa em camundongos que haviam sofrido infarto 6 horas antes da administração. Após 2 semanas, foram identificadas células do enxerto positivas para marcadoras de cardiomiócitos (actina sarcomérica e troponina I) no coração destes animais. Estudos posteriores mais requintados demonstraram que pelo menos metade destas células fundiram-se com cardiomiócitos do camundongo, e a outra metade se diferenciou sem haver fusão celular. Entretanto, neste caso, esbarramos na necessidade da utilização de 5-azacitidina para a ativação prévia dos genes de cardiomiócitos antes do transplante de células. Uma terceira população de células progenitoras foi identificada por MARTIN (2004) que isolou

células SP ("side population") com a utilização do corante Hoechst em células de coração adulto de camundongos. O mesmo autor relatou que estas células quando co-cultivadas com células cardíacas, foram capazes de expressar a proteína α -actinina sarcomérica (trabalhos com células SP são ainda limitados, embora se saiba que esta população de células seja dotada de grande potencial de diferenciação). Todos estes tipos de células progenitoras residentes são consideradas distintas entre si. Por exemplo, células Sca-1⁺ não expressam c-kit, e vice-versa. A presença destes tipos de progenitores pode parecer paradoxal em um órgão onde falta capacidade regenerativa efetiva. Evidentemente, estas células não conseguem agir robustamente após qualquer evento que lesa o órgão *in vivo*. Se estas células apresentam função de progenitora, esta parece estar mais relacionada com um processo de renovação muito lenta (LAFLAMME & MURRY, 2005).

A seleção de um tipo específico de células tronco requer tecnologia bastante sofisticada. No entanto, uma quantidade suficiente de células pode ser obtida através de aspirados de medula óssea. Para expansão destas células, seria necessário lançar mão das técnicas de cultura de células, fato que poderia levar algumas semanas. Estas células também podem ser obtidas através do sangue periférico, porém mediante uma estimulação prévia realizada com o auxílio de citocinas e fatores de crescimento. As células tronco coletadas a partir de sangue de cordão umbilical constituem em uma fonte potencial para uso futuro, no entanto, ainda esbarramos no fato de o número de células mononucleares ser limitado por cordão (havendo a necessidade de uma expansão destas células *in*

vitro pós congelamento, com recuperação das células mononucleares, CD 34⁺ e unidades formadoras de colônia (CFU) (SHEN, 2003).

Outro tipo celular de alta relevância para o assunto que estamos tratando são os pericitos. Estas células estão diretamente envolvidas com a formação de novos vasos (tanto a neoangiogênese como também a vasculogênese). Apresentam-se revestindo todo endotélio, formando uma camada contínua subendotelial, a parede vascular. Durante a formação e organização dos vasos, progenitores endoteliais diferenciam-se em células endoteliais e organizam-se em tubos em resposta ao VEGF liberado pelo tecido adjacente através dos receptores Flk-1 (VEGFR2) e Flt-1 (VEGFR1). Após a formação do tubo, pericitos e células musculares lisas são recrutadas para formarem a parede vascular. Na microvasculatura, PDGF está envolvido no recrutamento de pericitos; e em grandes vasos, Tie-2 e Ang-1 estão envolvidos no recrutamento de células musculares lisas. O TGF- β participará da maturação dos vasos (CLEAVER & MELTON, 2003). O sistema circulatório de todos os órgãos, assim como o sistema vascular da medula óssea, são delineados por uma camada contínua de células endoteliais e pericitos subendoteliais. Foi demonstrado que os pericitos expressam tanto a fosfatase alcalina como a α -actina de músculo liso, além de exibir uma plasticidade potencial (BIANCO, 2001). Evidências recentes sugerem que há mais de uma fonte de pericitos presente durante o desenvolvimento e crescimento. Primeiramente, durante desenvolvimento, os pericitos podem ser recrutados durante o processo de angiogênese e vasculogênese de células mesenquimais vizinhas residentes. Segundo, os pericitos podem surgir diretamente de células endoteliais ou de seus

progenitores. E terceiro, eles podem ter origem durante a angiogênese, tanto pré ou pós-natal, através da replicação, migração e diferenciação de outros pericitos do brotamento vascular. Em relação à medula óssea, isto implica que os pericitos da medula podem ser heterogêneos, tanto no seu modo de desenvolvimento como de origem. Alguns devem ser recrutados durante a formação dos vasos sanguíneos de células osteogênicas residentes; outros devem crescer a partir de pericitos pré-existentes durante o crescimento vascular. Levando-se em consideração as similaridades da localização próxima a vasculatura e a resposta celular a fatores de crescimento e a expressão de marcadores similares, existe a suspeita de que os pericitos da medula e as células estromais da medula tenham a mesma identidade (BIANCO, 2001). Outros autores, no entanto, classificam os progenitores estromais como células mesenquimais, capazes de originar linhagens celulares diferenciadas da medula óssea, incluindo adipócitos, osteoblastos, condrócitos e estroma de suporte hematopoético. A relação precisa entre células tronco mesenquimais (MSC) e células tronco hematopoéticas (HSC) ainda não está totalmente esclarecida; entretanto, acredita-se que as MSC dêem suporte às HSC através da produção de citocinas cruciais, tais como, interleucina 6 (IL-6), o fator inibidor de leucócitos (LIF), e secretam componentes da matriz extracelular, que ajudam na função das HSC dentro do microambiente da medula óssea (CAPLAN & BRUDER, 2001).

Já foi demonstrado que as MSCs tratadas com 5-azacitidina começaram a contrair e formar estruturas semelhantes a miotubos e miofilamentos. Elas foram positivas para marcadores específicos de cardiomiócitos e expressavam genes e

fatores de transcrição também específicos de cardiomiócitos (MAKINO, 1999). Além das MSCs da medula óssea murina, o desenvolvimento de cardiomiócitos *in vitro* também foi obtido com a medula óssea humana (XU, 2004). Diante destes resultados, a hipótese da utilização das MSCs para fins terapêuticos têm sido amplamente cogitada. Seu potencial foi demonstrado por WANG e colaboradores, em 2000, onde MSCs murinas participavam na formação de novos cardiomiócitos no coração normal e danificado. Células do doador expressando marcadores cardíacos foram detectadas. Estas células também expressavam conexina 43, uma proteína de junção intercelular, sugerindo assim um acoplamento entre as células adjacentes.

Em um estudo com ratos apresentando isquemia de membros inferiores tratados com fração mononuclear total e MSCs purificadas, demonstrou que estas últimas apresentam maior capacidade em se diferenciar tanto em células endoteliais quanto em células musculares lisas, mais do que as células mononucleares totais (IWASE, 2005).

De todas as populações de células derivadas da medula óssea apenas as MSCs comprovadamente se diferenciam em cardiomiócitos *in vitro* (HENG, 2004). As MSCs são negativas para os marcadores hematopoéticos CD 34 e CD 35 (PITTENGER, 2004).

O entendimento de que a vasculogênese possa ocorrer no adulto direcionou uma pesquisa intensa na área da terapia celular. Inúmeros estudos experimentais atuais confirmam o potencial da diferenciação de células pluripotentes em cardiomiócitos e células endoteliais (ORLIC, 2001a; KOCHER, 2001). Outras

evidências em modelos animais confirmaram que células pluripotentes da medula óssea melhoram a função do miocárdio e a perfusão na doença cardíaca isquêmica (KAWAMOTO, 2001; FUCHS, 2001). Além disso, trabalhos recentes têm descrito os efeitos benéficos da infusão intracoronária de células mononucleares autólogas da medula óssea no período pós-infarto imediato em humanos (STRAUER, 2002; ASSMUS, 2002). TSE e colaboradores (2003) descreveram melhora na perfusão do miocárdio e contratilidade segmentar, através de resultados obtidos por imagens de ressonância magnética em segmentos isquêmicos do miocárdio tratados com a introdução de células por meio de cateter. Recentemente, mostrou-se que pacientes terminais apresentando cardiomiopatia isquêmica crônica que receberam injeções endocárdicas de células mononucleares da medula óssea apresentaram melhora nos sintomas, função cardíaca e perfusão, sem evidência clínica de danos causados pelo procedimento em si (PERIN, 2003b).

Por outro lado, alguns estudos em animais propuseram que as células tronco responsáveis pela geração de novos cardiomiócitos fossem as HSC. A primeira indicação de que as HSC pudessem participar da regeneração cardíaca veio de JACKSON e colaboradores em 2001, este isolou uma população específica de HSC (SP - side population) e as transplantou em camundongos letalmente irradiados previamente. Subsequentemente, os camundongos transplantados foram usados num modelo de isquemia-reperfusão e seus corações foram analisados após 2 ou 4 semanas. Embora a prevalência não tenha sido muito

grande, cardiomiócitos derivados dos doadores (marcados com Lac Z) foram encontrados na região peri-infarto.

A injeção direta de HSC no miocárdio infartado também foi investigada. Após ligação direta da artéria coronária, uma população de células lin^- , c-kit^+ foi injetada na área contrátil ao redor do infarto experimental em camundongos. Após 9 dias, as células do doador diferenciaram-se não só em cardiomiócitos mas também em células endoteliais e fibroblastos. Além disso, evidências de restauração do miocárdio foram suportadas pela sobrevida prolongada e recuperação da função cardíaca (ORLIC, 2001b).

Embora estes estudos tenham demonstrado que diferentes populações de HSC tenham aparentemente alta capacidade de migração e regeneração no miocárdio infartado, alguns grupos argumentam o oposto. Alguns pesquisadores tentaram repelir os resultados mencionados anteriormente e injetaram células lin^- , c-kit^+ expressando GFP (green fluorescent protein) em miocárdio isquêmico (NYGREN, 2004; BALSAM, 2004). Outros injetaram HSCs contendo o gene LacZ sob o controle de um promotor específico (MURRY, 2004). Todos estes estudos detectaram células do doador no coração, mas estas células não se diferenciaram em cardiomiócitos. Ao invés disso, as células do doador expressavam marcadores hematopoéticos. Foi detectada fusão das células da medula óssea com os cardiomiócitos danificados pelo grupo de Murry. Desta maneira, ainda não está muito bem esclarecida qual a contribuição morfológica e fisiológica das HSC para o infarto do miocárdio.

Testes clínicos envolvendo medula óssea para reparo cardíaco têm atualmente sido realizados e estudados detalhadamente (DIMMELER, ZEIHNER & SCHNEIDER, 2005). A maioria dos estudos tem sido focado em células mononucleares de medula óssea, que compreendem uma população de células hematopoéticas heterogênea e células mesenquimais contendo <0,1% de células tronco, embora haja estudos que testam células progenitoras derivadas de sangue periférico (ASSMUS, 2002). Duas estratégias gerais têm sido utilizadas: entrega intracoronariana para pacientes com infarto agudos, e injeções intramiocárdicas introduzidas via cateter em pacientes com isquemia crônica ou infartos antigos. Estes estudos mostraram que a entrega via cateter das células da medula óssea no coração é viável, pois nenhuma complicação tem sido associada. Assim como no caso dos testes realizados com mioblastos, muitos dos ensaios realizados com células de medula óssea fizeram uso de controles não randomizados para comparação, limitando a avaliação da eficácia. No entanto, a maioria dos estudos demonstra aumento da função contrátil do miocárdio, aumento da perfusão, ou ambos.

No momento, há dois relatos na literatura de estudos realizados randomizados envolvendo células da medula óssea para reparo cardíaco. WOLLERT e colaboradores (2004), realizaram o primeiro teste com 30 pacientes que receberam injeções intracoronárias com células mononucleares não fracionadas e 30 pacientes no grupo controle que não sofreram aspiração de medula óssea ou infusão de células. Os pacientes que receberam células de medula apresentaram 6% de aumento na fração de ejeção quando comparados com o controle. No

segundo estudo, CHEN (2004) descreveu os efeitos da entrega intracoronária de células mesenquimais derivadas da medula óssea em 34 pacientes, enquanto que 35 pacientes controles passaram pela coleta de medula mas receberam apenas a infusão de uma solução salina. A infusão de células mesenquimais resultou no aumento da contratilidade da parede, redução na dilatação ventricular e um aumento de 14% da fração de ejeção, se comparados ao grupo controle. Estes estudos indicam que o transplante de células de medula óssea no coração é viável e apresenta-se seguro. Estudos iniciais sugerem aumento da função ventricular e perfusão. No entanto, estudos clínicos randomizados controlados adicionais deverão ser realizados para a exploração da eficácia e mecanismo de ação destas células (LAFLAMME & MURRY, 2005).

Muitos outros tipos de resultados já foram relatados na literatura, alguns indicando o processo de fusão celular, porém outros comprovando a ocorrência do fenômeno de transdiferenciação. Dentre eles, Badorff e colaboradores em 2003, demonstrou melhora na função cardíaca de modelos animais para infarto do miocárdio, a partir do transplante de células progenitoras endoteliais (EPCs). Neste trabalho, foram utilizadas células progenitoras humanas CD 34+, assim como células de medula óssea c-Kit ⁺/sca-1⁺ de ratos, a fim de se obter efeitos benéficos similares já que muitos outros autores afirmam que estas células progenitoras endoteliais têm a propriedade de aumentar a neovascularização de tecidos isquêmicos (MUROHARA, 2000; KAWAMOTO, 2001; KALKA, 2000). A melhora da função cardíaca pelo transplante de células progenitoras endoteliais foi atribuída ao seu potencial angiogênico. No entanto, até aquele momento, a

capacidade de transdiferenciação das células progenitoras endoteliais em cardiomiócitos era desconhecida. BADORFF (2003), em seu experimento refinado, demonstrou que estas células (EPCs) isoladas a partir de sangue periférico de indivíduos adultos (um grupo de voluntários saudáveis e outro grupo de pacientes com CAD – Coronary Artery Disease) têm a capacidade de se transdiferenciar em cardiomiócitos quando co-cultivados com cardiomiócitos neonatais de ratos. Esta transdiferenciação foi demonstrada através de parâmetros fenotípicos e funcionais. Com seis dias de co-cultura, nota-se a integração das EPCs com os cardiomiócitos, com mudança na morfologia (aumento do comprimento e área de superfície, assemelhando-se assim a cardiomiócitos). Nesta etapa também já são possíveis observar a expressão de proteínas específicas para músculo cardíaco, tais como troponina I, peptídeo atrial natriurético; dentre outras proteínas específicas para miócitos como α -actinina sarcomérica e MEF-2. Ainda nesta etapa, a organização sarcomérica pôde ser observada em algumas EPCs humanas.

Foi investigado também se as EPCs são capazes de interagir fisicamente com cardiomiócitos, para tal propósito foram utilizadas microinjeções do corante fluorescente Lucifer Yellow, o qual foi observado se transferindo diretamente dos cardiomiócitos de ratos para células adjacentes (as EPCs). Estes resultados, não apenas sugerem, porém indicam que as células progenitoras endoteliais estão fisicamente conectadas aos cardiomiócitos de ratos através de junções intercelulares do tipo Gap. Um outro aparato experimental foi montado para se

averiguar se as junções Gap são essenciais para que a transdiferenciação ocorra. Adicionou-se à co-cultura de cardiomiócitos e EPCs um inibidor de junções Gap (PMA – 50 nmol/L). O processo de transdiferenciação das EPCs ocorreu normalmente na presença do inibidor, sem a necessidade da presença das junções Gap. Estudos recentes mostram que mudanças fenotípicas de células tronco embrionárias podem ocorrer em consequência à fusão celular (YING, 2002). Para se investigar se este mecanismo interfere na transdiferenciação das EPCs, o mesmo autor do trabalho citado acima utilizou cardiomiócitos fixados em paraformaldeído, os quais não poderiam se fundir com as outras células, porém ofereciam uma superfície celular intacta de contato para cultura. Após 6 dias de co-cultura, juntamente com os cardiomiócitos que foram fixados, as EPCs exibiram aumento no comprimento e superfície celular. Muitas destas células progenitoras endoteliais co-cultivadas com os cardiomiócitos fixados apresentaram expressão de proteínas específicas de músculo como α -actinina sarcomérica e MEF-2. Estes resultados mostram que ambos, tanto as junções Gap e a fusão celular, não são essenciais para a transdiferenciação das células progenitoras endoteliais.

Quando as EPCs coletadas de pacientes com CAD e fatores de risco para a aterosclerose foram co-cultivadas com cardiomiócitos de ratos, o mesmo padrão de reposta foi observado (EPCs transdiferenciadas apresentando actinina positiva), entretanto com menor eficiência, se compararmos com os resultados dos voluntários saudáveis. Em suma, este trabalho mostra que células progenitoras endoteliais (EPCs) isoladas a partir de sangue periférico são capazes de se

transdiferenciar em cardiomiócitos quando co-cultivados com cardiomiócitos de ratos, exibindo não apenas o fenótipo típico, como as propriedades funcionais de cardiomiócitos em geral. Demonstra também que o contato célula-célula com os cardiomiócitos é essencial para este processo e ainda, sugere que as caderinas possam mediar este contato, regulando também a proliferação, diferenciação e a migração celular (STEINBERG & McNUTT, 1999). Outros experimentos *in vivo* demonstraram que injeções de EPCs também podem melhorar a neovascularização e função cardíaca em animais (KAWAMOTO, 2001). Desta maneira, o uso terapêutico das EPCs se torna potencial para pacientes com doenças isquêmicas do coração.

Por outro lado, a manipulação rápida das células mononucleares aspiradas da medula (após algumas horas) e sua posterior administração ao paciente, constitui uma abordagem mais prática, simples e eficaz do que células cultivadas por muito tempo (PERIN, 2003a).

Neste caso, temos que considerar os diferentes meios de administração das células tronco na terapia celular aplicada ao coração. É importante ressaltar que todos estes meios ainda estão sob estudo, e que o estado de cada paciente em particular pode influenciar na escolha do mesmo. As células tronco podem ser administradas periféricamente ou diretamente no sistema circulatório. Em pacientes nos quais os sinais de recrutamento ("homing") podem se encontrar menos intensamente, como no caso de pacientes com alguma cardiomiopatia crônica, a injeção de células deve ser feita diretamente no músculo cardíaco. Em alguns casos também, certos tipos de células tronco como por exemplo os

mioblastos, devem ser administrados diretamente no tecido para que o paciente não corra risco de sofrer embolia quando um grande número de células é injetado.

A injeção intramiocárdica cirúrgica constitui a maneira mais invasiva de infusão das células tronco e somente é considerada quando o paciente já tem algum procedimento cirúrgico programado. A injeção é feita em potenciais áreas alvo (afetadas), a critério do médico após visualização direta.

A injeção transendocárdica, mais sofisticada, envolve a utilização do sistema NOGA (Cordis). Com este método, um cateter é introduzido na circulação do paciente (veia femural) e é capaz de mapear o músculo cardíaco, de acordo com níveis de viabilidade do tecido. Desta maneira, a isquemia, por exemplo, pode ser mapeada em detalhe; permitindo que as células sejam injetadas em áreas alvo de modo preciso (nas bordas do infarto, por exemplo). Este tipo de aplicação já vem sendo testado em humanos e em modelos experimentais e tem se revelado bastante seguro.

A injeção intracoronária é um outro meio de administração que já foi testado com sucesso. Constitui o método mais adequado para a entrega das células em regiões coronárias específicas e é menos complexo que a injeção transendocárdica. Porém, a quantidade de células e o momento da injeção devem ser considerados para se evitar perturbação do fluxo coronário e a necrose de células do miocárdio.

Há também o meio de injeção intravenosa, sendo que este é o método mais simples para a administração destas células. Entretanto, neste procedimento há uma grande dependência do recrutamento das células tronco, para que estas

consigam alcançar o miocárdio. Células injetadas de maneira intravenosa podem ficar aprisionadas dentro de outros órgãos, como fígado, baço, pulmão e etc., e apenas uma pequena porção entrará na circulação coronária e atingirá o miocárdio isquêmico. Os sinais de recrutamento podem ser presentes em outros sítios do corpo, especialmente nos tecidos linfóides.

Muitos testes com células tronco em humanos já foram relatados na literatura, sendo a maioria deles com sucesso. O uso de células mononucleares da medula óssea injetadas via intracoronária em pacientes com infarto prévio, mas com fração de ejeção ventricular preservada, mostrou melhora na função e perfusão em um grupo pequeno de pacientes que foram avaliados durante os meses subseqüentes à terapia. Muitos grupos de pesquisa, inclusive o nosso em parceria com o Hospital Pró-Cardíaco do Rio de Janeiro, estão dando prosseguimento aos testes clínicos. Células mononucleares da medula óssea foram injetadas utilizando-se mapeamento eletromecânico em pacientes em estágio terminal de falência cardíaca. De acordo com dados já publicados, estes pacientes têm mostrado melhora tanto no aumento da contratilidade, perfusão, como também na capacidade funcional após serem submetidos à injeção de células (PERIN, 2003b). O presente trabalho tem como objetivo mostrar evidências histológicas da melhora/remodelação de área lesada em estudo anatomopatológico *post-mortem* de um destes pacientes após 11 meses da terapia celular.

2. OBJETIVOS GERAIS

Verificar o papel das células mononucleares da medula óssea autólogas na remodelação da cardiomiopatia isquêmica crônica humana 11 meses após o transplante em paciente.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar a segurança do transplante autólogo de medula óssea em paciente com cardiomiopatia isquêmica crônica através do estudo necroscópico em paciente.

Verificar a presença de:

- angiogênese na zona lesada da parede ventricular tratada comparando-a com as paredes não tratadas.
- angiogênese na zona de fibrose após o transplante de medula óssea comparando-a com a zona de fibrose não tratada.
- pericitos nos vasos capilares da parede ventricular tratada comparando-a com as paredes não tratadas.

- novos cardiomiócitos na parede ventricular lesada e tratada através da utilização de anticorpos dirigidos contra proteínas de cardiomiócitos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se da avaliação *post-mortem* de paciente submetido à terapia celular, do grupo de pacientes crônicos do ensaio clínico fase I (PERIN, 2003b).

3.1. Paciente

Paciente de 55 anos que apresentava cardiomiopatia isquêmica, tendo tido anteriormente episódios isquêmicos do miocárdio (o primeiro em 1985 e o segundo em 2000). Os sintomas de insuficiência cardíaca congestiva tiveram início dois anos antes do começo da inscrição deste estudo, sendo que, um ano antes do início do ensaio clínico, o paciente apresentou um episódio de acidente vascular cerebral que evoluiu com seqüelas leves (hemiparesia direita residual amena e episódios epilépticos tonico-clônicos). O paciente ainda apresentava fatores de risco para doença de artérias coronárias, e também, diabetes mellitus do tipo II, hipertensão arterial e hipercolesterolemia.

A capacidade funcional do paciente foi avaliada através de um protocolo “baseline by means of a ramp treadmill protocol” com um pico máximo de consumo de oxigênio (MVO_2) de 15,9 ml/Kg/min, e um workload de 4,51 equivalentes metabólicos (METs). Com base no SPECT (Single Photon Emission Computer Tomography), o estudo da perfusão apontou um defeito parcial reversível na

parede anterolateral. Um defeito fixo na perfusão (cicatriz) da parede posterior também foi apontado. O septo apresentou uma perfusão normal.

A cateterização cardíaca revelou uma fração de ejeção ventricular esquerda de 11%; uma estenose de 70% no óstio da artéria interventricular anterior e de 85% na porção mediana da artéria interventricular anterior; uma lesão proximal de 80% na artéria circunflexa; e uma oclusão total da primeira artéria marginal esquerda e artéria coronária direita. Os segmentos distais da artéria interventricular anterior e da artéria circunflexa mostraram-se difusamente lesados. Devido a gravidade e extensão da doença coronariana do paciente, o mesmo não pode ser considerado um candidato à cirurgia ou qualquer outro procedimento intervencional. Na inscrição do ensaio clínico, ele foi considerado classe III funcional (NYHA – New York Heart Association) e angina classe III (CCS – Canadian Cardiovascular Society). Os níveis de proteína C reativa, contagens sanguíneas completas e os níveis de creatinina e troponina do paciente apresentaram-se normais.

3.2. Terapia Celular

O paciente recebeu um total de 30 milhões de células mononucleares de medula óssea autólogas que haviam sido colhidas 2 horas antes do procedimento. Esta quantidade de células foi obtida após o exame da viabilidade celular (superior a 90%). Estas células foram injetadas por via transendocárdica (entrada pela veia femoral) na parede anterolateral do ventrículo esquerdo. Não houve nenhuma complicação durante o período do procedimento.

3.3. Acompanhamento Clínico

Foram realizadas avaliações posteriores, através de cateterização cardíaca após 4 meses, e esta não revelou nenhuma mudança na anatomia coronariana. Avaliações posteriores não-invasivas (como o Holter, por exemplo) foram realizadas 2 e 6 meses após a terapia celular. Melhoras sintomáticas e funcionais foram notadas e o paciente retornou à classe I funcional (NYHA) e de angina classe I (CCS). O monitoramento pelo Holter não acusou nenhuma arritmia ventricular maligna e os parâmetros eletrocardiográficos (signal-average) permaneceram estáveis. Não houve nenhuma mudança global na fração de ejeção ou no volume ventricular na eletrocardiografia. O índice para movimento da parede (wall-motion) avaliado através da ecocardiografia de duas dimensões melhorou de 1,94 para 1,65, assim como a contratilidade dos segmentos melhorou em 5 segmentos adjacentes nas áreas injetadas. A perfusão do miocárdio, avaliada através de SPECT, aumentou na parede anterolateral. Os dados mecânicos do SPECT apontaram melhora na fração de ejeção regional, movimento da parede, e espessura. O teste de MVO_2 (ramp treadmill testing) aumentou de 15,8 para 25,23 ml/Kg/min, e os METs aumentaram de 4,51 para 7,21 nos 2 meses. Nos testes realizados após 6 meses, o MVO_2 alcançou 31,6 ml/Kg/min, os METs atingiram 9,03.

De 6 até os 11 meses após o procedimento de injeção de células, a condição cardiovascular do paciente permaneceu estável. Aos 11 meses, no entanto, este

paciente sofreu outro acidente vascular cerebral (epilepsia tonico-clonica) em casa e foi encontrado em parada cardiopulmonar pelos membros da família.

3.4. Necrópsia

A necrópsia do paciente foi realizada após a assinatura com consentimento da família. O coração foi retirado e aberto para a visualização das cavidades ventriculares e atriais, válvulas mitral, tricúspide, aórtica e pulmonar assim como a parede septal. Verificou-se a presença macroscópica de áreas de infarto agudo ou crônico, endocardite e estenose das artérias coronárias.

Os termos utilizados, parede anterolateral/parede posterior/parede septal, foram assim designados em relação a posição anatômica do órgão, para melhor correlação com a clínica (eletrocardiograma).

3.5. Estudo histológico

Fragmentos das seguintes regiões anatômicas do coração foram identificadas e separadas para processamento em parafina e congeladas: parede ventricular anterolateral, que recebeu as células; septal interventricular e ventricular inferoposterior.

Para o estudo histológico, os fragmentos foram fixados em formaldeído 4% tamponado, desidratados e incluídos em parafina. Cortes de 5 µm de espessura foram obtidos em micrótomo rotatório e corados com tricrômico de Gomori e pela técnica de picrossírius modificada para confocal (Dolber & Spach).

3.6. Estudo imunohistológico

A análise imunohistoquímica de cortes parafinados foi realizada com anticorpos contra o Fator VIII (A082, DAKO, Carpinteria, CA), vimentina (M0725, DAKO), α -actina de músculo liso (M0851, DAKO), e Ki-67 (Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK). Estes anticorpos foram revelados pelo sistema EnVision™ HRP system (DAKO), sendo utilizada a diaminobenzidina (Liquid DAB, DAKO) como cromógeno e contracolorados pela hematoxilina.

Cortes congelados (5 μ m) obtidos em criostato foram fixados em acetona e incubados com anticorpos para troponina (T6277, Sigma, St. Louis, MO), α -actina sarcomérica (A-2172, Sigma), α -actinina sarcomérica (A-7811, Sigma), e desmina (D1033, Sigma). Os anticorpos foram revelados com IgG anti-camundongo ou anti-coelho, fragmento F(ab)₂, conjugados com isotiocianato de fluoresceína (1814192, 1238833, respectivamente; Boehringer, Mannheim, Alemanha) e contra-colorados com uma solução de 0,1% de Azul de Evans (Merck, Darmstadt, Alemanha).

3.7. Estudo histomorfométrico

Além da descrição histológica foi calculada a densidade dos vasos sanguíneos presentes nestas regiões, como um todo, assim como de áreas de cicatriz, comparando-se a parede tratada e a parede infartada não tratada. Foi utilizado um sistema de análise de imagem computadorizada (IMAGEPRO-PLUS, Media

Cybernetics) utilizando campos obtidos dos cortes parafinados tratados com os anticorpos anti-fator VIII e anti-actina α de músculo liso, capturados com a câmara COOLPIX 990, Nikon, Japan). A primeira para a identificação de endotélio e a outra para identificação de pericitos, células adjacentes a capilares (células murais capilares). Para a obtenção da densidade capilar nas paredes anterolateral, septal e posterior, foram capturados 108 campos aleatórios de cortes contra-corados com hematoxilina e tratados com o anticorpo anti-fator VIII e 96 campos em cortes tratados com anticorpos anti-actina α de músculo liso. Os cortes transversais de capilares identificados com as marcações foram quantificados separadamente. Os resultados foram expressos como número de capilares por mm^2 . Os vasos arteriais, arteriolares e venulares foram excluídos. As diferenças entre as paredes anterolateral, septal e posterior foram avaliadas através da análise de variância Kruskal-Wallis e o método de Student-Newman-Keuls para a comparação múltipla (pairwise).

Para se verificar se houve diferença no grau de angiogênese das zonas cicatrizadas, tratada e a não tratada (parede anterolateral x posterior) foi feita nova avaliação da densidade capilar nas áreas de cicatriz. Foram capturados 40 campos (lente objetiva de 40X) obtidos dentro de áreas de cicatriz sendo obtido o número de capilares per mm^2 nas áreas fibróticas. Diferenças entre as zonas infartadas tratada e não tratada foram avaliadas pelo teste Mann-Whitney.

4. RESULTADOS

4.1. Resultados anatomopatológicos

O coração pesou 765g. O órgão apresentou arterioesclerose severa com ateroma calcificado sub-oclusivo em todas as artérias coronárias, calcificação da artéria pulmonar, e ateromatose moderada da aorta. Em exame macroscópico, as cavidades do coração apresentaram-se dilatadas, com paredes hipertróficas. Não havia nenhuma evidência de lesão aguda, ou de lesões que poderiam estar relacionadas com a injeção de células tronco. Uma opacificação homogênea endocárdica generalizada, afetando todas as superfícies internas cardíacas, foi identificada no exame histológico como uma hiperplasia fibroelástica difusa do endocárdio. Foram observadas cicatrizes pontuais, focais e minúsculas, principalmente nas paredes posterior e anterolateral. A zona apical apresentou-se fina e fibrótica. A parede septal exibiu cicatrizes focais dispersas entre as fibras cardíacas nas regiões adjacentes às paredes anterior e posterior, sendo desprovida de áreas fibróticas na região central, a qual foi utilizada para estudos morfométricos. Áreas avermelhadas alongadas, irregulares e paralelas se estenderam às porções da parede ventricular anterolateral que recebeu injeções (congestão vascular). As regiões posterior e apical apresentaram cicatrizes densas, fibróticas, bem circundadas, que separavam feixes de cardiomiócitos.

4.2. Resultados histológicos

A parede anterolateral apresentou-se irregular, com regiões pálidas devido ao tecido fibrótico intercalado com regiões escuras de músculo cardíaco arranjado aproximadamente em paralelo, bandas entremeadas, perpendiculares ao plano da parede ventricular (Fig 1A). Não foi encontrado nenhum sinal de organização celular anormal, crescimento, diferenciação, ou ainda de necrose focal prévia, focos inflamatórios ou reparo tecidual nas regiões que receberam tratamento com injeções de células.

Dentro do tecido fibrótico, as colorações de tricômico e picrossírius revelaram regiões com densidade de colágeno diminuída, as quais exibiam uma vasta árvore vascular. Grandes vasos centrais ramificados foram observados entre vasos menores e paralelos a feixes de cardiomiócitos (Fig 1B). A zona periférica destas áreas fibróticas foi fundida com camadas de cardiomiócitos sem limites bem definidos como aqueles observados na parede posterior e na área apical (Fig 1C).

As células inflamatórias apresentaram-se raras na região perivascular, houve ocasionalmente um pequeno grupo isolado de linfócitos, e muito raramente, granulócitos. Simultaneamente, foi observado um grande número de células fibroblastóides ao redor de capilares, entremeadas com a matriz extracelular circundante, e intercaladas ao longo dos cardiomiócitos. Na interface entre o tecido fibrótico e feixes de cardiomiócitos, dois gradientes se fundiram: a diminuição do diâmetro do vaso sanguíneo e o aumento do tamanho dos cardiomiócitos. Cardiomiócitos isolados e pequenos, foram observados na matriz

fibrótica adjacente a capilares, assim como o aumento progressivo do número de células fibroblastóides que estavam isoladas ou entremeadas em pequenos grupos ao longo dos feixes de cardiomiócitos (Fig 1B).

4.3. Resultados Imunohistoquímicos

A marcação imunohistoquímica com Fator VIII identificou células endoteliais dos vasos sanguíneos capilares, arteriolares e arteriais das paredes ventriculares posterior, anterolateral e também no septo (Fig 2A e B). Estas marcações com Fator VIII não foram encontradas na população de células fibroblastóides dentro da matriz fibrótica. Na parede ventricular posterior e no septo, a marcação com α -actina de músculo liso foi facilmente identificada nas células da parede dos vasos sanguíneos. Esta marcação foi presente tanto nos pericitos como nas células musculares lisas da camada de células da parede de vasos finos (Fig 2C). Em contrapartida, a árvore vascular da parede ventricular anterolateral mostrou intensa marcação na parede dos vasos sanguíneos, evidenciando, em arteríolas e artérias hiperplasia e hiperplasia marcante das células musculares lisas (Fig 2D). O mesmo padrão de marcação foi observado em células isoladas localizadas em posição perivascular, identificando pericitos e nas regiões adjacentes ao longo dos cardiomiócitos e matriz fibrótica, miofibroblastos (Fig 2E).

A marcação com vimentina foi detectada na camada endotelial da parede ventricular anterolateral, nas células perivasculares e nas células adjacentes ou em íntimo contato com os cardiomiócitos (Fig 3A). Estas células formavam

freqüentemente uma rede que permeava a matriz fibrosa e o espaço intersticial ao longo dos cardiomiócitos (Fig 3B).

A marcação com a desmina foi identificada nessa mesma população de células. Esta marcação apresentou-se menos intensa nas células da parede vascular e nas células perivasculares, no entanto, uma maior intensidade foi observada nas células adjacentes aos cardiomiócitos. Nos cortes perpendiculares ao eixo principal dos cardiomiócitos, finas fibrilas desmina-positivas foram observadas na região submembranar; nos cortes longitudinais, foi observado um padrão de bandas transversais típicos de desmina (Fig 3C e D). Ao longo dos cardiomiócitos, algumas células pequenas apresentaram forte marcação periférica pela desmina (Fig 3C).

A marcação por troponina foi negativa nas células vasculares e perivasculares nas parede posterior e septo. Na parede anterolateral, a marcação com troponina foi negativa nas paredes dos capilares, porém foi positiva em pericitos pericapilares e em células próximas a matriz pericapilar (Fig 3E).

Células troponina-positivas foram observadas na camada mais externa e também na adventícia de arteríolas formando ocasionalmente uma camada de células troponina-positivas, contínua, ao redor do vaso (Fig 3F). Foram encontradas células troponina-positivas isoladas ou em pequenos grupos na área intermediária entre o tecido fibrótico e os cardiomiócitos dentro dos feixes de cardiomiócitos adjacentes. A intensidade de marcação aumenta com a proximidade dos cardiomiócitos, onde algumas células fibroblastóides pequenas revelaram uma marcação homogênea brilhante no citoplasma para troponina (Fig

4A). Ocasionalmente, tais células apresentaram um aumento no volume com marcação para troponina restrita à periferia da cicatriz; a área central foi preenchida com células troponina-negativas, similar à marcação da desmina em pequenos cardiomiócitos. Em cardiomiócitos maduros, o anticorpo específico para troponina marcou filamentos periféricos e citoesqueleto sarcomérico.

A marcação para actinina sarcomérica mostrou-se similar a troponina. Entretanto, tanto os pericitos perivasculares como as células de vasos sanguíneos murais na região anterolateral foi negativa para a actinina sarcomérica nos vasos sanguíneos que estavam profundamente inseridos na matriz da cicatriz fibrótica e nos que permaneciam distantes dos feixes de cardiomiócitos. As mesmas células localizadas nos vasos adjacentes, inseridas entre os feixes de cardiomiócitos apresentaram-se positivos para a actinina sarcomérica, assim como as células isoladas ou os pequenos grupos de células fibroblastóides (Figs 4B e C). Algumas destas células tinham um tamanho maior e na sua região central apresentavam positividade para a actinina sarcomérica, que já estava organizada no padrão de bandas típico dos sarcômeros (Figs 4D e E). Na região central da cicatriz foram observadas células isoladas um pouco maiores que os pericitos. Estas apresentavam fraca positividade para a actinina sarcomérica, sugerindo que estas células isoladas possam ter adquirido algumas características de cardiomiócitos (Fig 4F).

O anticorpo Ki67 que identifica células ativas envolvidas no ciclo celular, reagiu raramente e apenas nas células endoteliais da parede posterior. Na região anterolateral, o Ki67 também estava presente em pericitos perivasculares e em

células fibroblastóides isoladas em torno da matriz fibrótica (Fig 2F). De uma maneira geral, a reatividade do anticorpo Ki67 apresentou-se relativamente baixa.

4.4. Análise Morfométrica

A densidade total de capilares foi significativamente maior na área da parede ventricular anterolateral que recebeu injeções de células da medula óssea se comparadas à parede posterior previamente infartada ($P < 0,0001$), e ambas as áreas foram diferentes da região septal central (Fig 5A). Lembremos que nenhuma das duas últimas recebeu injeção de células. Considerando-se que o crescimento de capilares é estabilizado apenas quando estes mobilizam pericitos, nós também monitoramos a densidade de capilares que continham células positivas para α -actina de músculo liso em sua parede, sendo que resultados similares foram obtidos (Fig 5B). A dispersão ampla dos dados obtidos da parede septal foi devido à presença de áreas fibróticas, focais, em regiões próximas e adjacentes às paredes ventriculares.

A análise estatística separada das paredes ventriculares anterior e lateral também foi realizada para detecção de possíveis intercorrelações de irrigações sanguíneas focais oriundas de áreas adjacentes, porém nenhuma diferença foi detectada entre estas duas áreas tratadas com células (dados não mostrados).

Com o objetivo de excluir uma possível interferência na alta densidade relativa dos capilares na parede anterolateral do miocárdio preservado antes da terapia celular, nós nos preocupamos em realizar a análise morfométrica da densidade de capilares somente em áreas dentro das cicatrizes fibróticas, comparando as

paredes antero-lateral e posterior (Fig 5C). O número de capilares na parede anterolateral é maior e significativamente diferente da parede posterior ($P < 0,0001$), indicando níveis diferentes de irrigação sanguínea nos tecidos cicatrizados das duas regiões.

Figura 1. Cortes de regiões do coração estudado corados pela técnica de Tricômico de Gomori. Parede anterolateral (A e B), parede posterior (C), e parede septal (D). Notar feixes de cardiomiócitos (em A) e um aumento na rede vascular (em B) indicados por setas. Aumento 40x em A, B, e D, 100x em C.

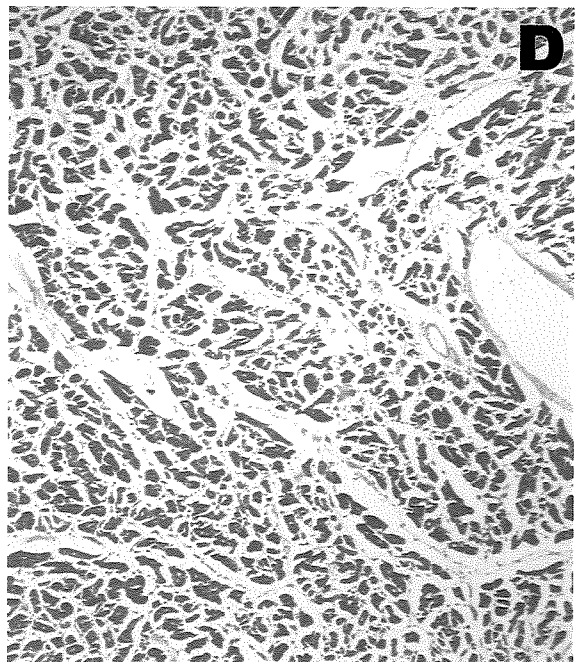
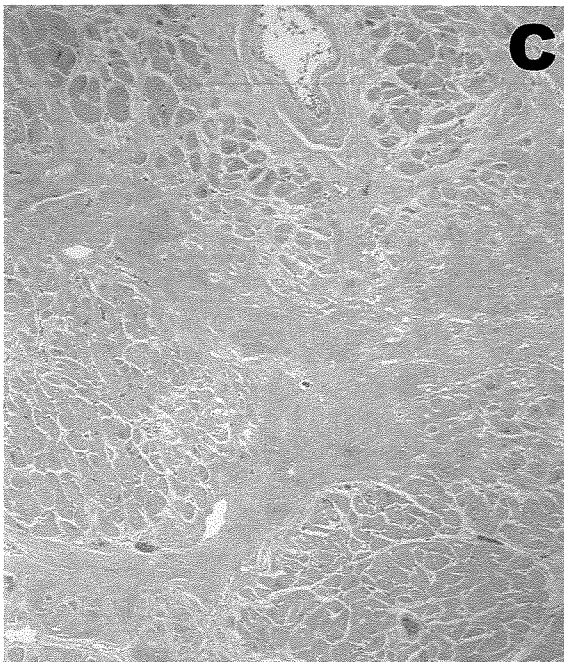
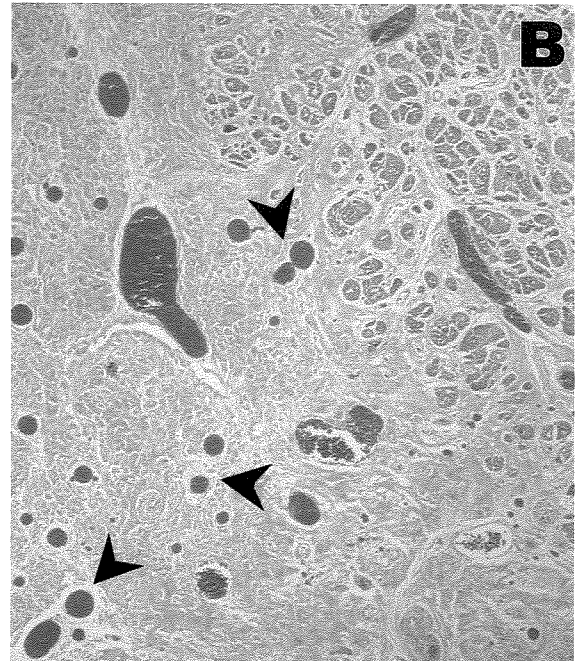
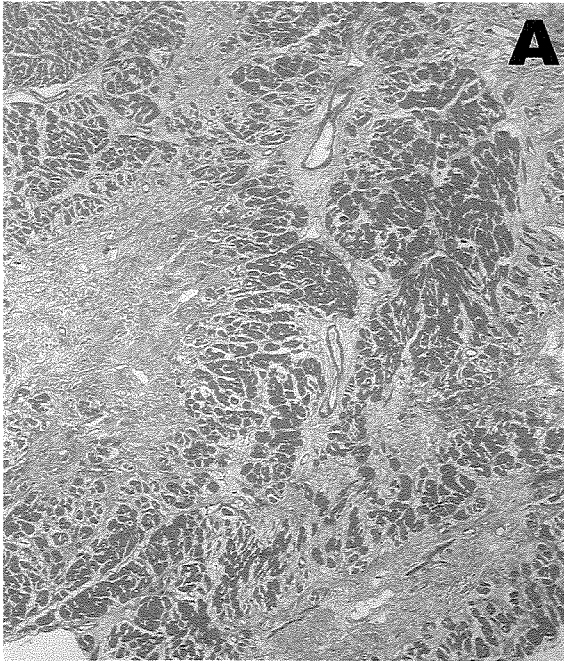


Figura 2. Identificação imunohistoquímica de fator VIII (A e B) e α -actina de músculo liso (C–E) nas paredes de vasos sanguíneos do septo (A) e anterolateral (B–E) nas regiões do coração estudado, representando aumento na densidade vascular (B) e hiperplasia perivascular de células murais (C–E) (marcação positiva dos vasos indicadas pelas setas). A reatividade do Ki67 (indicada pela seta) foi rara, presente nas células perivasculares da parede anterolateral (F). Aumento 40x em A e B, 400x em C e D, 1000x em E e F.

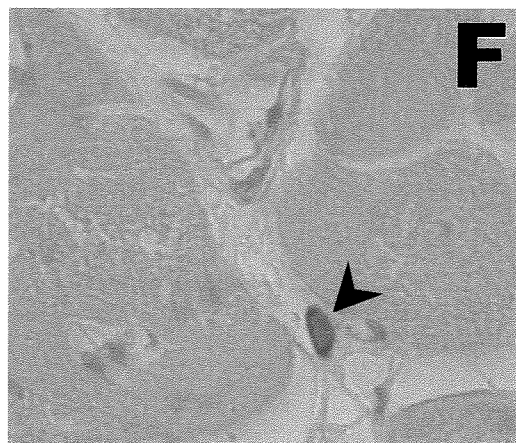
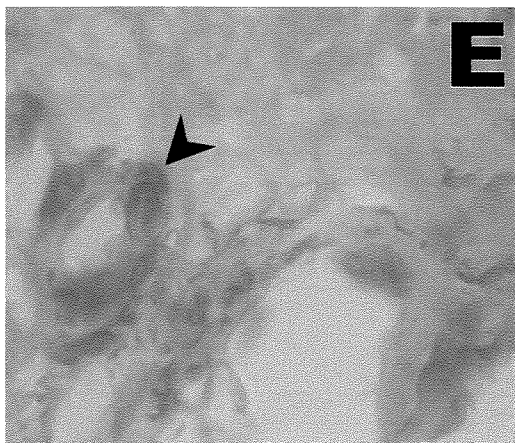
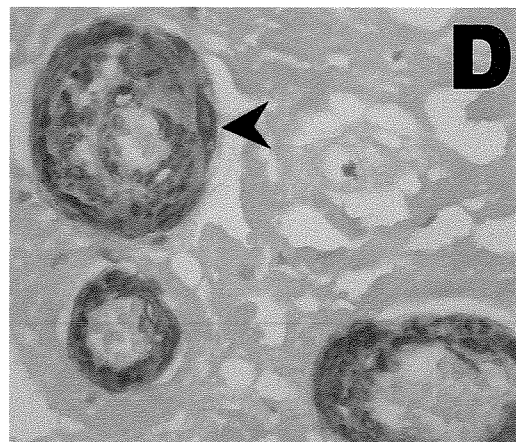
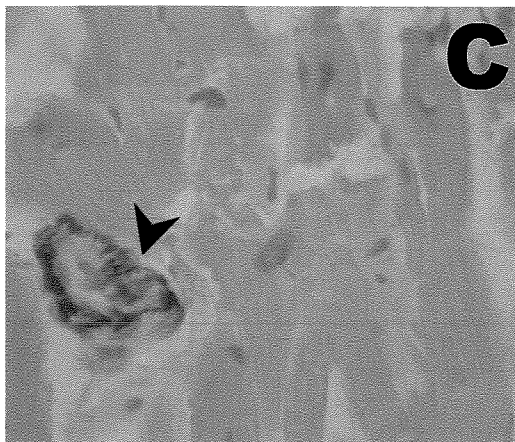
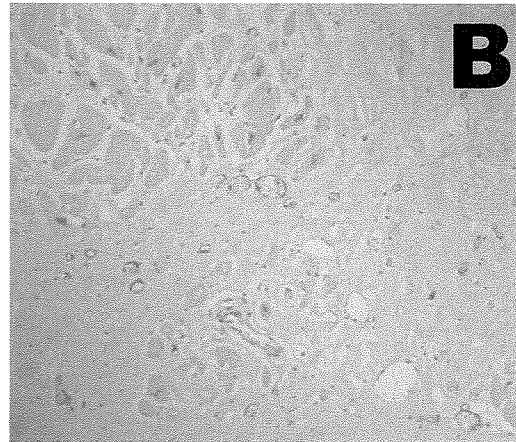
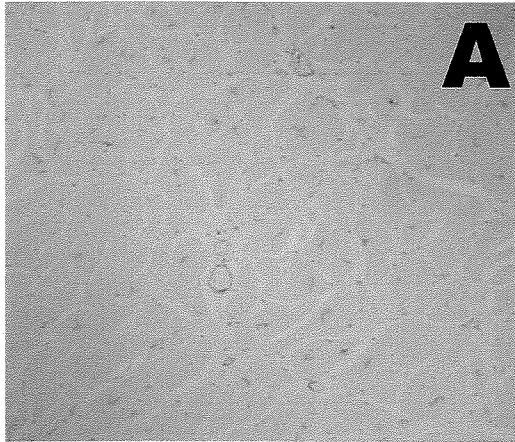


Figure 3. Parede anterolateral do coração, que recebeu injeção de células mononucleares. Imunomarcação para vimentina na cor verde, apresentando uma reação positiva na parede vascular e em células intersticiais fibroblastóides (A e B). Imunomarcação para desmina na cor verde, mostrando pequenos grupos de células intensamente reativas entre os vasos sanguíneos e os cardiomiócitos (indicada pela seta em C) e pequenas células dentro dos feixes de cardiomiócitos com o citoesqueleto estriado típico (D). Imunomarcação para troponina em cor verde, mostrando reação positiva em todas as células murais de vasos sanguíneos médios (E e F). Aumento 1000x em A e F, 400x em B–E.

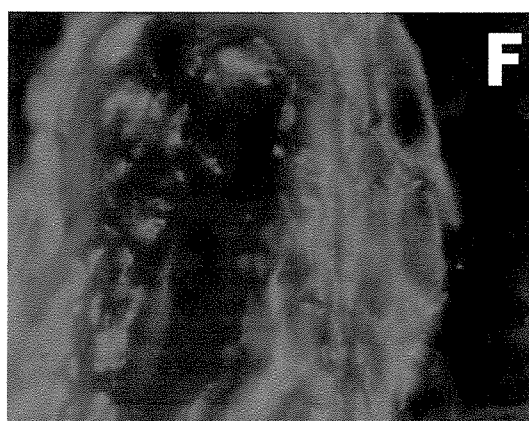
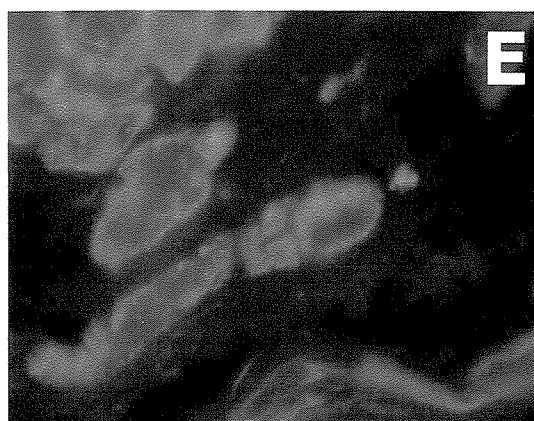
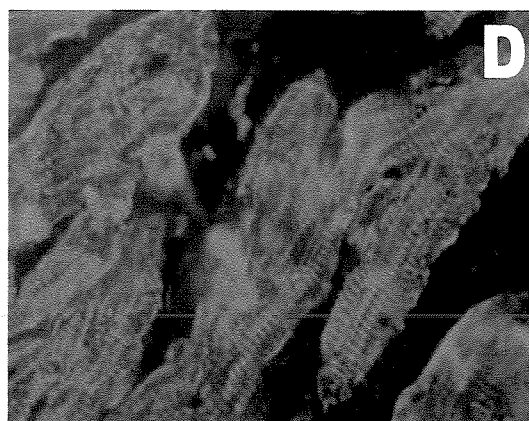
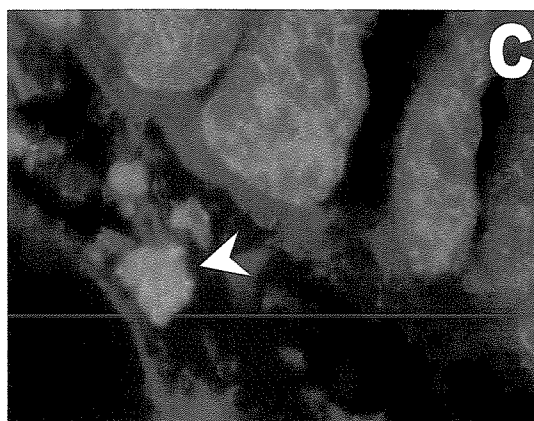
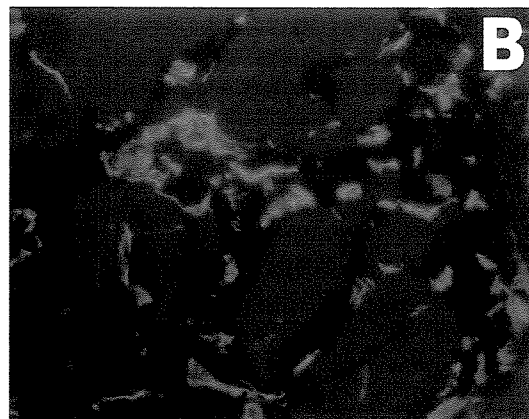


Figure 4. Parede anterolateral do coração, que recebeu injeção de células mononucleares. Imunomarcção em verde para troponina (A), apresentando pequenas células semelhantes a cardiomiócitos com uma intensa marcação nas áreas de células periféricas (indicadas por setas). Imunomarcção para actinina sarcomérica também em cor verde (B–F), apresentando reatividade nas células murais dos vasos sanguíneos (B–E) e células isoladas entre cardiomiócitos com organização da actinina semelhante a sarcômeros (E e F). Aumento 400x em A e F, 1000x em B–E.

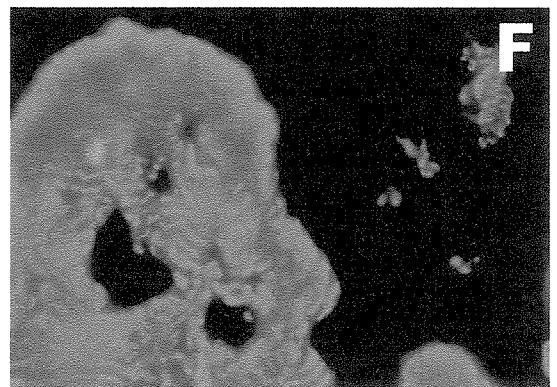
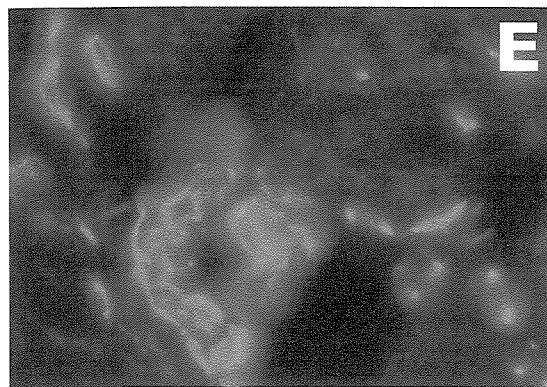
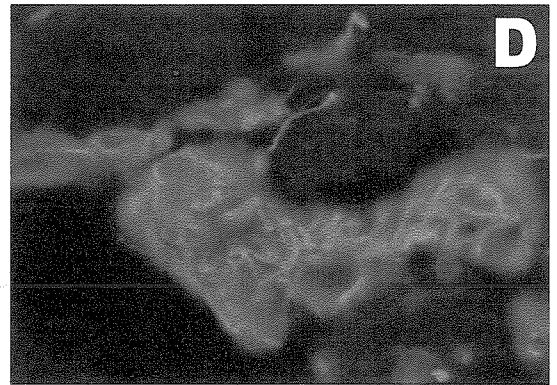
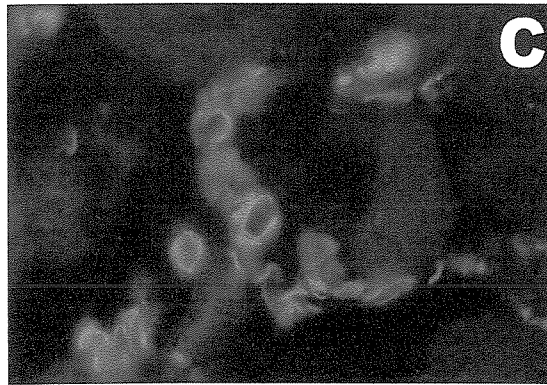
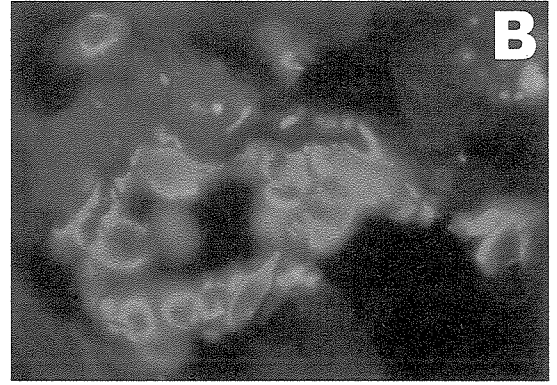
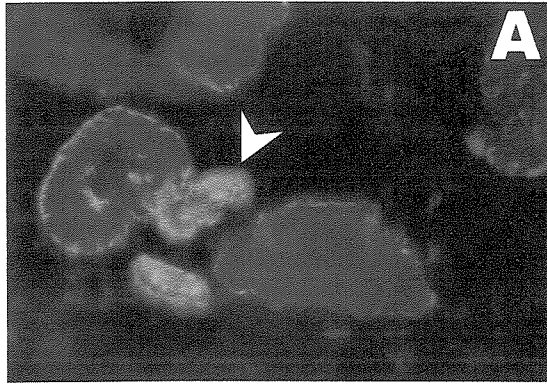
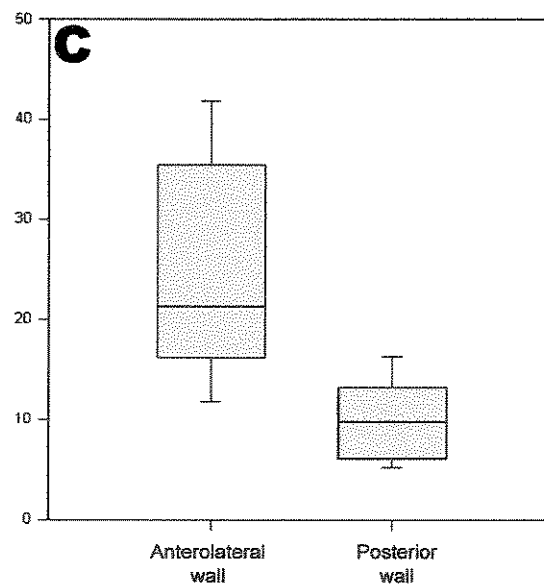
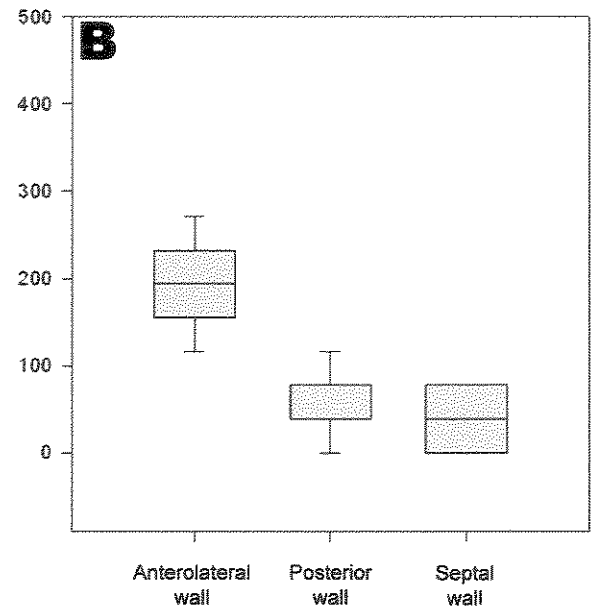
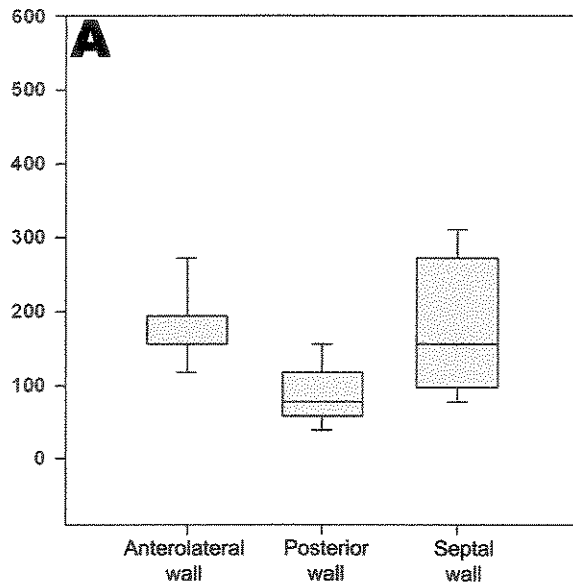


Figura 5. Números de capilares por mm^2 nas paredes anterolateral, posterior e septal do coração em questão. A – anti-fator VIII, contracorado com hematoxilina. B – anti- α -actina de músculo contracorado com hematoxilina. C – capilares tratados com anti-fator VIII apenas dentro das áreas fibróticas das paredes anterolateral e posterior. (n= 108 campos para A; 96 campos para B; e 40 campos para C). As diferenças foram estatisticamente significantes ao longo de todos os grupos em comparações parciais ($P < 0.05$, método de Newman-Keuls) para A e B. As diferenças foram significativas ($P < 0.05$) entre as paredes anterolateral e posterior no teste de Mann-Whitney em C.



5. DISCUSSÃO

Nossos resultados, apesar de serem baseados em um estudo *post-mortem* de somente um (01) paciente que recebeu um transplante autólogo de células mononucleares da medula óssea através de injeção transendocárdica, demonstraram que a terapia celular foi benéfica e segura. Foi possível verificar que um ano após a injeção de células da medula óssea não houve nenhum crescimento anormal de células e nem houve desorganização tecidual ou reação inflamatória indesejada. Houve evidências clínicas de melhora da perfusão do miocárdio provavelmente devido a significativa neoangiogênese no local da injeção de células, em relação às áreas não tratadas pelas mesmas na parede posterior, assim como evidenciou o aparecimento de células perivasculares que expressavam proteínas do citoesqueleto de cardiomiócitos.

Durante muito tempo pensou-se em cicatriz do infarto como um tecido inerte, desprovido de células, composto simplesmente por fibras de colágeno. Acreditava-se que sua função fosse meramente restaurar a integridade do miocárdio necrosado e prover forças de tensão para evitar rupturas teciduais (SUN & WEBER, 2000). No entanto, novas abordagens em biologia celular e molecular têm mudado esta perspectiva. Esta visão simplista vem sendo modificada, e atualmente sabe-se que o tecido conjuntivo continua a se acumular na área lesada durante anos após o infarto do miocárdio através da ação de fibroblastos (SUN,

2002). Esta cicatriz formada também se apresenta vascularizada, e desta maneira, aquela visão anterior de um tecido acelular com perfusão ausente foi caindo em desuso.

A cinética de remodelação tecidual após uma lesão isquêmica é bem conhecida, sabendo-se que o processo reparativo pós-infarto do miocárdio se inicia logo após o evento isquêmico para a reconstrução do tecido e manutenção da integridade da parede miocárdica (revisto por CLEUTJENS, 1999). Uma série de eventos ocorre e culmina no recrutamento de células inflamatórias, síntese e ativação de peptídeos regulatórios que levam a formação de novos vasos (angiogênese) e ao aparecimento de miofibroblastos. Este tipo celular já aparece a partir do terceiro dia, tornando-se uma das células predominantes na área do infarto no sétimo dia, permanecendo por meses (em modelos animais) ou anos (nos humanos) (revisto por CLEUTJENS, 1999). Ao contrário do que ocorre em outros tecidos como por exemplo na pele (DESMOULIERE, 1993), os miofibroblastos presentes na cicatriz do infarto do miocárdio, não sofrem apoptose o que explicaria a sua presença anos após o evento isquêmico (WILLEMS, 1994). Os miofibroblastos estão co-localizados nas áreas onde há acúmulo de colágeno e geram sinais fibrogênicos que perpetuam a cicatriz colagênica (SUN & WEBER, 1996; WILLEMS, 1994). Foi demonstrado que estas células apresentam aumento da expressão de genes que codificam para os colágenos dos tipos I e III (SUN, 2000). Esta população de células é responsável pela renovação do colágeno da cicatriz do infarto, e ainda, segundo alguns autores podem apresentar determinadas propriedades contráteis dado que já foi demonstrado que elas são

capazes de expressar α -actina de músculo liso (GABBIANI, 1972; WILLEMS, 1994). Para desempenhar estas funções estas células devem ser nutridas, sendo assim, são acompanhadas por uma rede neovascular. A neoangiogênese se inicia no terceiro dia pós-infarto se tornando evidente no décimo quarto dia aproximadamente permanecendo por cerca de 8 semanas (SUN, 2000).

A renovação do colágeno é regulada por substâncias que os miofibroblastos elaboram. Dentre elas estão, a angiotensina II e o TGF β -1 (Transforming Growth Factor 1). Estas substâncias são solúveis e capazes de atravessar o espaço intersticial do miocárdio, alcançando áreas distantes dentro do mesmo. A fibrose resultante que aparece em sítios remotos no infarto representa a maior parte do tecido conjuntivo encontrado na cardiomiopatia isquêmica, e pode ser considerado o maior componente de remodelamento estrutural adverso encontrado na falência de corações humanos com origem isquêmica (BELTRAMI, 1994).

É sabido que em casos de infartos extensos do miocárdio, o coração todo fica comprometido com o processo de reparo e focos de tecido fibroso podem surgir em áreas remotas, podendo contribuir desta maneira para o remodelamento do miocárdio não-infartado. A fim de se evitar, ou ainda minimizar os efeitos desta remodelação, outros autores lançaram mão da utilização de novas técnicas. Dentre elas, pode-se citar a administração de citocinas como o G-CSF (Granulocyte colony-stimulating factor) após o infarto. Esta citocina já foi alvo de muitos estudos realizados, e muito ainda se pesquisa sobre sua real ação. Dentre os trabalhos já relatados na literatura sobre o G-CSF, temos que esta citocina

(primeiramente envolvida com a proliferação de granulócitos, principalmente neutrófilos) está também envolvida no recrutamento e liberação de células tronco hematopoéticas (HSCs) e células progenitoras endoteliais (EPCs) da medula óssea para a circulação sanguínea, sendo de fundamental importância para o processo que chamamos de mobilização de células (TO, 1997; LINK, 2000; KOCHER, 2001; ORLIC, 2001c; IWANAGA, 2004). Recentemente foi demonstrado que o tratamento com G-CSF é capaz de melhorar a função cardíaca e reduzir a mortalidade após o infarto em camundongos (ORLIC, 2001c; OHTSUKA, 2004). No trabalho de Iwanaga com suínos em 2004, além do maior número de glóbulos brancos presentes na corrente sanguínea do grupo tratado com G-CSF, foi possível demonstrar que o tamanho da área de infarto no grupo controle apresentou-se marcadamente maior quando comparada com o grupo tratado. Detectou-se uma expansão significativa no ventrículo esquerdo dos suínos que não foram submetidos ao G-CSF. Além disso, verificou-se uma indução da mobilização de EPCs e um aumento no número de vasos (marcação positiva para VEGF) melhorando a perfusão do miocárdio. Ainda neste estudo foi demonstrado uma diminuição da apoptose em células endoteliais, que juntamente com o aumento do número de vasos na região isquêmica, resultou na redução da área do infarto.

Como já foi citado anteriormente, o TGF β é um fator de crescimento de crucial importância no processo de fibrose reparativa. SUGANO em seu trabalho em 2005, além de corroborar os resultados de IWANAGA (2004), demonstra que o G-CSF além modular a inflamação após a isquemia, também aumenta a

expressão de TGF β (que leva a proliferação de fibroblastos e colágeno, consequentemente) evitando a expansão ventricular. Outros resultados mostram que mobilização mediada por citocinas é capaz de promover a regeneração e neovascularização do miocárdio, e ainda, constitui uma estratégia não invasiva para o tratamento do miocárdio (ORLIC, 2001c).

Os neovasos formados são importantes para a nutrição dos miofibroblastos na cicatriz (SUN, 2002). Além disso foi verificado que além dos novos capilares o tecido cicatricial do infarto apresenta artérias coronárias mais espessas e com uma reatividade vasomotora alterada (KALKMAN, 1997), aspectos observados no nosso material tanto na parede posterior não tratada como na anterolateral tratada. O aumento da perfusão tecidual *in vivo* é um dos aspectos benéficos da terapia celular. Este fato já foi demonstrado em humanos (STRAUER, 2002; PERIN, 2003b), seu substrato morfológico podendo ser relacionado à proliferação de capilares induzida pelo recrutamento/transdiferenciação de progenitores endoteliais. Em modelos animais foi possível verificar a existência de neoangiogênese (ORLIC, 2001a; b; c; JACKSON, 2001).

No período pós-natal, a formação de novos vasos sanguíneos ocorre tanto por vasculogênese ou por angiogênese, evento que envolve remodelamento da matriz extracelular e proliferação das células da parede dos vasos (POTTEN & LOEFFLER, 1990; MORRISON & WEISSMAN, 1994; PERIN, 2003a). As células endoteliais podem resultar de progenitores derivados da medula óssea (vasculogênese pós-natal) ou da migração e proliferação de células endoteliais de vasos pré-existentes (angiogênese) (MORRISON & WEISSMAN, 1994). As

células murais, como os pericitos e as células musculares lisas, são derivadas de células mesenquimais da medula óssea (estroma), miofibroblastos, e/ou fibroblastos (HALL & WATT, 1989). No processo neoangiogênico, os pericitos são derivados tanto de células mesenquimais de tecidos adjacentes (mobilizados por fatores de crescimento produzidos por células endoteliais) como pela proliferação de pericitos pericapilares e adventícios e ainda pelo deslizamento distal destas células do sítio abluminal das membranas basais dos vasos sanguíneos em crescimento (MORRISON & WEISSMAN, 1994).

Os pericitos são essenciais à estabilização do processo angiogênico. No nosso material verificou-se que regiões injetadas por células, a parede ventricular tratada com as células da medula óssea apresentaram aumento da densidade de capilares contendo pericitos o que fala a favor de uma integração destes novos circuitos capilares neoformados provavelmente levando a melhora da perfusão no miocárdio. Além disso, verificamos que os pericitos hipertróficos demonstraram duas características: primeiro, estes expressaram proteínas miocárdicas específicas enquanto ainda estavam localizadas na parede vascular; segundo, estas células foram encontradas em locais que sugerem destacamento, migração para o tecido adjacente e encontro com cardiomiócitos próximos, isolados ou em pequenos grupos. Próximo aos cardiomiócitos, a expressão de proteínas miocárdicas apresentou-se aumentada, com imunomarcacão fluorescente em todo citoplasma. O significado destes resultados ainda permanece desconhecido. Entretanto, dentro da parede posterior, nenhum dos resultados acima foi encontrado, e apenas um vaso sanguíneo pequeno foi encontrado.

Trabalhos envolvendo fusão celular tentam esclarecer os ótimos resultados obtidos após a terapia celular, muitos modelos já foram testados, principalmente em camundongos onde se verificou a capacidade de fusão não apenas com cardiomiócitos, mas também com células hepáticas e nervosas (ALVAREZ-DOLADO, 2003). Outros ensaios já mostravam que este evento pode ocorrer espontaneamente *in vitro* (YING, 2002; TERADA, 2003). Foi observado que as células fundidas (células de origem hematopoética - cardiomiócitos) passaram a apresentar a morfologia de cardiomiócitos maduros, inclusive o padrão de bandas (filamentos de actina e miosina), discos intercalares e junções GAP conectando as fibras musculares cardíacas adjacentes (ALVAREZ-DOLADO, 2003). Muito ainda se discute sobre os eventos de fusão celular e transdiferenciação (OH, 2003). Muitos pesquisadores sugerem que a fusão celular consiste no mecanismo principal pelo qual células hematopoéticas possam contribuir na regeneração de diversos tecidos, enquanto que outros afirmam ser a transdiferenciação o mecanismo responsável. Outros autores, no entanto, não eliminam a hipótese de ambos os mecanismos poderem acontecer em maior ou menor grau nos tecidos. Porém em nosso trabalho não podemos inferir nenhum tipo de comentário sobre fusão celular, já que nenhuma técnica apropriada foi realizada neste sentido.

O presente trabalho tem limitações, restringindo as conclusões que possam ser tiradas, mas demonstra a eficácia do uso das células de medula óssea. Os resultados podem ter ocorrido por acaso. Trata-se de um caso isolado, um "case report" não controlado de últimos eventos ocorridos depois da injeção de células mononucleares não marcadas. Portanto, isto exclui o uso de qualquer técnica de

imagem que poderia auxiliar na co-localização e identificação da presença das células tronco próximas às paredes dos vasos ou no miocárdio.

Trabalhos como o de DEB em 2003, que demonstram a presença de células derivadas da medula óssea no coração de humanos adultos encorajam ainda mais a continuação de nossas pesquisas nesta área. Neste trabalho, com a utilização da combinação das técnicas de FISH (Fluorescent *in situ* hybridization) e imunohistoquímica, foi possível identificar a presença de cromossomos Y em corações de pacientes femininos. Estas pacientes haviam sido submetidas ao transplante células de medula óssea de doadores masculinos. Durante a autópsia dos 4 corações analisados, nenhuma evidência de inflamação foi detectada macroscopicamente (assim como no nosso material). A hipótese de fusão celular neste trabalho foi afastada depois da análise da ploidia. Estes dados sugerem que a medula óssea humana adulta pode agir como fonte de células progenitoras extra-cardíacas que contribuem para a formação de cardiomiócitos novos. Ainda neste trabalho, foi avaliado o recrutamento de células de medula óssea para outros órgãos como fígado e músculo esquelético. Este fato valida resultados prévios em humanos e animais, e ainda, indicam a multipotencialidade das células de origem hematopoética (KRAUSE, 2001; KORBLING, 2002).

Em conclusão, a terapia celular não foi associada com nenhum resultado histológico adverso nos 11 meses seguidos ao procedimento. As análises morfológicas e imunohistoquímicas das áreas que sofreram implante de células tronco sugerem que estas tiveram um grande aumento de capilares em relação às áreas não tratadas, e ainda, que a terapia celular autóloga com células

mononucleares da medula óssea foi associada com hiperplasia dos pericitos, das células murais e adventícias. Algumas destas células adquiriram elementos de citoesqueleto e proteínas contráteis (troponina e actinina sarcomérica).

O presente estudo, dentre muitos outros, estabelece que as células de medula óssea podem contribuir para a melhora funcional de corações com alguma cardiomiopatia. Entretanto, uma significância clínica real destes resultados irá depender do sucesso no entendimento da mobilização, recrutamento, e propriedades de diferenciação destas células (DEB, 2003). O entendimento da relação entre fatores regulatórios intracelulares e extracelulares no controle da determinação de uma linhagem consiste também em um grande desafio para o futuro.

A combinação da terapia celular com outros tratamentos pode aumentar ainda mais as opções terapêuticas no futuro. A terapia gênica tem mostrado resultados encorajadores na promoção da angiogênese. Porém, a entrega do gene através de veículos virais ainda não se apresenta muito segura. As células tronco poderão servir como veículos que carregarão os genes até os tecidos, porém há muito ainda que se estudar e testar para que tal procedimento se torne acessível e corriqueiro.

Tratamentos farmacológicos e cirúrgicos também podem ser combinados com a terapia celular para que possam promover benefícios, entretanto, ainda é muito cedo para este tipo de especulação.

6. CONCLUSÕES

A terapia celular mostrou-se segura e eficaz ao paciente, uma vez que não foi observado nenhum sinal de organização celular anormal no material examinado.

Trata-se do primeiro caso relatado na literatura com fortes indícios de cardiomiogênese em humanos com base no protocolo utilizado.

O processo de neoangiogênese foi marcante na parede anterolateral (que recebeu injeção de células mononucleares de medula óssea).

A terapia celular mostrou-se eficaz melhorando a capacidade funcional miocárdio do paciente (contratilidade e perfusão da área tratada).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALISON, M. R. et al. Preface to stem cells. *J. f. Pathol.*, v. 197, p. 417-418, 2002.

ALVAREZ-BUYLLA, A.; LOIS, C. Neuronal stem cell in the brain of adult vertebrates. *Stem cells*, v. 13, p. 263-272, 1995.

ALVAREZ-DOLADO, M. et al. Fusion of bone marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature*, v. 425, p. 968-972, 2003.

ASAHARA, T. et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularilazation. *Circ. Res.*, v. 85, p. 221-228, 1999.

ASSMUS, B. et al. Transplantation of progenitors cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*, v. 106, p. 3006-3017, 2002.

BADORFF, C. et al. Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. *Circulation*, v. 107, p. 1024-1032, 2003.

BALSAM, L. B. et al. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischemic myocardium. *Nature*, v. 428, p. 668-673, 2004.

BELTRAMI, A. P. et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*, v. 114, p. 763-776, 2003.

BELTRAMI, C. A. et al. Structural basis of end-stage failure in ischemic cardiomyopathy in humans. *Circulation*, v. 89, p. 151-163, 1994.

BIANCO, P. et al. Bone Marrow Stromal Stem Cells: Nature, Biology, and Potencial Applications. *Stem cells*, v. 19, p. 180-192, 2001.

CAPLAN, A.L.; BRUDER, S.P. Mesenchymal stem cells: Buildings blocks for molecular medicine of the 21 st century. *Trends Mol. Med.*, v. 2, p. 259-264, 2001.

CHEN, S. L. et al. Effect on left ventricular functional of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.*, v. 94, p. 92-95, 2004.

CLEAVER, O.; MELTON, D.A. Endothelial signaling during development. *Nat. Med.*, v. 9, p. 661-668, 2003.

CLEUTJENS, J. P. et al. The infarcted myocardium simply dead tissue, or a lively target for therapeutic interventions. *Cardiovasc. Res.*, v. 44, p. 232-241, 1999.

DAWN, B. et al. Cardiac stem cells delivered intravascularly transverse the vessel barrier, regenerate infarcted myocardium, and improve cardiac function. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 102, p. 3766-3771, 2005.

DEB, A. et al. Bone Marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart: A study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients. *Circulation*, v. 107, p. 1247-1249, 2003.

DESMOULIERE, A. et al. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am. J. Pathol.*, v. 146, p. 56-66, 1993.

DESMOULIERE, A. et al. Transforming growth factor- β 1 induces α -smooth muscle actin expression granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J. Cell Biol.*, v. 122, p. 103-111, 1993.

DIMMELER, S.; ZEIHNER, A. M.; SCHNEIDER, M. D. Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *J. Clin. Invest.*, v. 115, p. 572-583, 2005.

DONOVAN, P.J. Growth factor regulation of mouse primordial germ cell development. *Curr. Top. Dev. Biol.*, v. 29, p. 189-225, 1994.

FODOR, W. L. Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: The potential to replace, repair and regenerate. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, v.1, p. 102-107, 2003.

FUCHS, S. et al. Transendocardial delivery of autologous bone marrow enhances collateral perfusion and regional function in pigs with chronic experimental myocardial ischemia. *J. AM. Coll. Cardiol.*, v. 37, p. 1726-1732, 2001.

GABBIANI, G. et al. Granulation tissue as a contractile organ. A study of structure and function. *J. Exp. Med.*, v. 135, p. 719-734, 1972.

GRITTI, A. et al, Multipotencial stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. *J. Neurosci.*, v. 16, p. 1091-1100, 1996.

HALL, P. A., WATT, F. M. Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Development*, v. 106, p. 619-633, 1989.

HARRISON, D. E.; ZHONG, R. K. The same exhaustible multilineage precursor produces both myeloid and lymphoid cells as early as 3-4 weeks after marrow transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 89, p. 10134-10138, 1992.

HENG, B.C. et al. Strategies for directing the differentiation of stem cells into the cardiomyogenic lineage in vitro. *Cardiovasc. Res.*, v. 62, p. 34-42, 2004.

IWANAGA, K. et al. Effects of G-CSF on cardiac remodeling after acute myocardial infarction in swine. *Biochem. Biophys. Res. Communications*, v. 325, p. 1353-1359, 2004.

IWASE, T. et al. Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia. *Cardiovasc. Res.*, v. 66, p. 543-551, 2005.

JACKSON, K. A. et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J. Clin. Invest.*, v. 107, p. 1395-1402, 2001.

KAJSTURA, J. et al. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 95, p. 8801-8805, 1998.

KALKA, C. et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 97, p. 3422-3427, 2000.

KALKMAN, E. A. et al. Regionally different vascular response to vasoactive substances in the remodeled infarcted rat heart; aberrant vasculature in the infarcted scar. *J. Mol. Cell Cardiol.*, v. 29, p. 1487-1497, 1997.

KAWAMOTO, A. et al. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation*, v. 103, p. 634-637, 2001.

KOCHER, A. A. et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat. Med.*; v. 7, p. 430-436, 2001.

KOH, G. Y. et al. Differentiation and long-term survival of C2C12 myoblast grafts in heart. *J. Clin. Invest.*, v. 92, p. 2548-1554, 1993.

KORBLING, M. et al. Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N. Engl. J. Med.*, v. 346, p. 738-746, 2002.

KRAUSE, D. S. et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*, v. 105, p. 369-377, 2001.

LAFLAMME, M. A.; MURRY, C. E. Regenerating the heart. *Nature Biotech.*, v. 23, p. 845-856, 2005.

LEOBON, B. et al. Myoblast transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 100, p. 7808-7811, 2003.

LINK, D. C. Mechanisms of granulocyte colony-stimulating factor-induced hematopoietic progenitor-cell mobilization. *Semin. Hematol.*, v. 37, p. 25-32, 2000.

MAKINO, S. et al. cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J. Clin. Invest.*, v. 103, p. 697-705, 1999.

MAKKAR, R. R. et al. Stem cell therapy for myocardial repair. Is it arrhythmogenic? *J. Am. Coll. Cardiol.*, v. 42, p. 2070-2072, 2003.

MARTIN, C. M. et al. Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, Abcg2, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart. *Dev. Biol.*, v. 265, p. 262-275, 2004.

MENASCHE, P. et al. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet*, v. 357, p. 279-280, 2001.

MORRISON, S. J. et al. Regulatory Mechanisms in Stem Cell Biology. *Cell*, v. 88, p. 287-298, 1997.

MORRISON, S. J.; WEISSMAN, I. L. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity*, v. 1, p. 661-673, 1994.

MUROHARA, T. et al. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J. Clin. Invest.*, v. 105, p. 1527-1536, 2000.

MURRY, C. E. et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature*, v. 428, p. 664-668, 2004.

NYGREN, J. M. et al. Bone marrow derived-hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat. Med.*; v. 10, p. 494-501, 2004.

OH, H. et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *PNAS*, v. 100, p. 12313-12318, 2003.

OHTSUKA, M. et al. Cytokine therapy prevents left ventricular remodeling and dysfunction after myocardial infarction through neovascularization. *FASEB J.*, v. 18, p. 851-853, 2004.

ORLIC, D. et al. Bone marrow cells regenerating infarcted myocardium. *Nature*, v. 410, p. 701-705, 2001a.

ORLIC, D. et al. Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. *Ann. New York Acad. Sci.*, v. 938, p. 221-230, 2001b.

ORLIC, D. et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc. New York Acad.*, v. 98, p. 10344-10349, 2001c.

PERIN, E. C. et al. Adult Stem Cell Therapy in Perspective. *Circulation*, v. 107, p. 935-938, 2003a.

PERIN, E. C. et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation*, v. 107, p. 2294-2302, 2003b.

PITTENGER, M. F.; MARTIN, B. J. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ. Res.*, v. 95, p. 9-20, 2004.

POTTEN, C. S.; LOEFFLER, M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development*, v. 110, p. 1001-1020, 1990.

REINECKE, H. et al. Electromechanical coupling between skeletal and cardiac muscle. Implications for infarct repair. *J. Cell Biol.*, v. 149, p. 731-740, 2000.

REINECKE, H.; POPPA, V.; MURRY, C. E. Skeletal muscle stem cells do not transdifferentiate into cardiomyocytes after cardiac grafting. *J. Mol. Cell Cardiol.*, v. 34, p. 241-249, 2002.

REYNOLDS, B. A.; WEISS, S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, v. 255, p. 1707-1710, 1992.

RUBART, M. et al. Spontaneous and evoked intracellular calcium transients in donor-derived myocytes following intracardiac myoblast transplantation. *J. Clin. Invest.*, v. 104, p. 775-783, 2004.

SHEN, H.P. et al. Effects of different cooling rates on cryopreservation of hematopoietic stem cells from cord blood. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, v. 19, p. 489-492, 2003.

15. SPANGRUDE, G. J. et al. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*, v. 241, p. 58-62, 1988.

STEINBERG, M. S.; McNUTT, P. M. Cadherins and their connections: adhesion junctions have broader functions. *Curr. Opin. Cell Biol.*, v. 11, p. 554-560, 1999.

STRAUER, B. E. et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation*; v. 106, p. 1913-1918, 2002.

SUGANO, Y. et al. Granulocyte colony-stimulating factor attenuates early ventricular expansion after experimental myocardial infarction. *Cardiov. Res.*, v. 65, p. 446-456, 2005.

SUN, Y. et al. Infarct scar as living tissue. *Basic Res. Cardiol.*, v. 97, p. 343-347, 2002.

SUN, Y.; WEBER, K. T. Angiotensin converting enzyme and myofibroblasts during tissue repair in the rat heart. *J. Mol. Cell Cardiol.*, v. 28, p. 851-858, 1996.

SUN, Y.; WEBER, K. T. Infarct scar: a dynamic tissue. *Cardiovasc. Res.*, v. 46, p. 250-256, 2000.

TAYLOR, D. A. et al. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat. Med.*, v. 4, p. 929-933, 1998.

TERADA, N. et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*, v. 422, p. 901-904, 2003.

TO, L. B. et al. The biology and clinical uses of blood stem cells. *Blood*, v. 89, p. 2233-2258, 1997.

TRENTIN, J.J. Influence of hematopoietic organ stroma (hematopoietic inductive microenvironments) on stem cell differentiation. In: Regulation of Hematopoiesis. A. S. Gordon, ed. New York: Appleton-Century-Crofts, p. 161-185.

TSE, H. F. et al. Angiogenesis in ischemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet*, v. 361, p. 47-49, 2003.

TSONIS, P. A. Regenerative biology: the emerging field of tissue repair and restoration. *Differentiation*, v. 70, p. 397-409, 2002.

VANDERVELDE, S. et al. Signaling factors in stem cell-mediated repair of infarcted myocardium. *J. Mol. Cell Cardiol.*, v. 39, p. 363-376, 2005.

WANG, J. S. et al. Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages. *Thorac. Cardiovasc. Surg.*, v. 120, p. 999-1005, 2000.

WANG, F. S.; TRESTER, C. Bone marrow cells and myocardial regeneration. *Int. J. Hematol.*, v. 79, p. 322-327, 2004.

WILLEMS, I. E. M. G. et al. The α -smooth muscle actin-positive cells in healing human myocardial scars. *Am. J. Pathol.*, v. 145, p. 868-875, 1994.

WOLLERT, K. C. et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomized controlled clinical trial. *Lancet*, v. 364, p. 141-148, 2004.

XU, W. et al. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, v. 229, p. 457-469, 2004.

YING, Q-L. et al. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature*, v. 416, p. 545-548, 2002.

9. APÉNDICE

Transendocardial Autologous Bone Marrow Mononuclear Cell Injection in Ischemic Heart Failure

Postmortem Anatomicopathologic and Immunohistochemical Findings

Hans F.R. Dohmann, MD*; Emerson C. Perin, MD, PhD*; Christina M. Takiya, MD, PhD;
Guilherme V. Silva, MD; Suzana A. Silva, MD; Andre L.S. Sousa, MD;
Claudio T. Mesquita, MD, PhD; Maria-Isabel D. Rossi, PhD; Bernardo M.O. Pascarelli, MD;
Isabella M. Assis, MD; Helio S. Dutra, PhD; João A.R. Assad, MD;
Rodrigo V. Castello-Branco, MD; Cantidio Drummond, MD;
Hans J.F. Dohmann, MD, PhD; James T. Willerson, MD; Radovan Borojovic, PhD

Background—Cell-based therapies for treatment of ischemic heart disease are currently under investigation. We previously reported the results of a phase I trial of transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear (ABMM) cells in patients with end-stage ischemic heart disease. The current report focuses on postmortem cardiac findings from one of the treated patients, who died 11 months after cell therapy.

Methods and Results—Anatomicopathologic, morphometric, and immunocytochemical findings from the anterolateral ventricular wall (with cell therapy) were compared with findings from the interventricular septum (normal perfusion and no cell therapy) and from the inferoposterior ventricular wall (extensive scar tissue and no cell therapy). No signs of adverse events were found in the cell-injected areas. Capillary density was significantly higher ($P<0.001$) in the anterolateral wall than in the previously infarcted tissue in the posterior wall. The prominent vasculature of the anterolateral wall was associated with hyperplasia of pericytes, mural cells, and adventitia. Some of these cells had acquired cytoskeletal elements and contractile proteins (troponin, sarcomeric α -actinin, actinin), as well as the morphology of cardiomyocytes, and appeared to have migrated toward adjacent bundles of cardiomyocytes.

Conclusions—Eleven months after treatment, morphological and immunocytochemical analysis of the sites of ABMM cell injection showed no abnormal cell growth or tissue lesions and suggested that an active process of angiogenesis was present in both the fibrotic cicatricial tissue and the adjacent cardiac muscle. Some of the pericytes had acquired the morphology of cardiomyocytes, suggesting long-term sequential regeneration of the cardiac vascular tree and muscle. (*Circulation*. 2005;112:521-526.)

Key Words: angiogenesis ■ stem cells ■ heart failure ■ revascularization ■ ischemia

The role of cell-based therapy for the treatment of ischemic heart disease is currently under investigation. In view of the myocardium's limited capacity to regenerate spontaneously after an ischemic injury, the therapeutic use of exogenous progenitor cells has recently gained increasing interest. In vitro demonstration of functional cardiomyocyte differentiation from bone marrow-derived progenitor cells^{1,2} has prompted in vivo studies in animal models, and promising results have been obtained in the repair and regeneration of acute and chronic cardiac muscle lesions. Several types of progenitor cells have been used in experimental models,

including bone marrow-derived endothelial and blood cell progenitors, as well as bone marrow mesenchymal progenitors.³⁻⁶

In humans, similar attempts have been made with surgical, intracoronary, or transendocardial introduction of bone marrow-derived cells to improve cardiac lesions.^{7,8} Our group recently reported the results of the first phase I human trial of transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear (ABMM) cells in patients with end-stage ischemic heart disease.⁹ We observed a significant increase in perfusion, contractility of ischemic myocardial segments, and

Received March 31, 2004; de novo received August 13, 2004; revision received January 28, 2005; accepted February 23, 2005.

From the Hospital Procardiaco (H.F.R.D., S.A.S., A.L.S.S., C.T.M., J.A.R.A., R.V.C.B., C.D., H.J.F.D.), Rio de Janeiro, Brazil; the Texas Heart Institute at St. Luke's Episcopal Hospital (E.C.P., G.V.S., J.T.W.), Houston, Tex; and the Institute of Biomedical Sciences and Clementino Fraga Filho Hospital, Federal University (C.M.T., M.-I.D.R., B.M.O.P., I.M.A., H.S.D., R.B.), Rio de Janeiro, Brazil.

*Drs Dohmann and Perin are coprincipal investigators.

Correspondence to Hans F.R. Dohmann, MD, Rua General Polidoro 192, 22080-000 Rio de Janeiro, Brazil (e-mail diretoria.cientifica@procardiaco.com.br), or Emerson C. Perin, MD, 6624 Fannin, Suite 2220, Houston TX 77030 (e-mail eperin@crescentb.net).

© 2005 American Heart Association, Inc.

Circulation is available at <http://www.circulationaha.org>

DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.499178

Phenotype and Functional Characterization of 3×10^7 Cells Injected via a Transendocardial Route*

Phenotype, % in ABMM cell fraction	
CD45 ^{lo} CD34 ⁺	3.2
CD45 ^{lo} CD34 ⁺ HLA-DR ⁻	0.2
T cells (CD4 ⁺)	29.3
T cells (CD8 ⁺)	24.4
B cells (CD19 ⁺)	8.7
NK cells (CD56 ⁺)	0.7
Monocytes (CD14 ^{hi})	13.7
Functional assay, cell No./10 ⁶ ABMM cells	
CFU-GM	802
CFU-F	1

NK indicates natural killer; CFU-F, colony-forming-unit fibroblasts; and CFU-GM, colony-forming-unit granulocyte/macrophages.

*After mononuclear fraction purification, cell viability was 98.1%.

functional capacity of the cell-injection recipients. This report presents postmortem cardiac findings from one of these patients.

Case Report

The patient was a 55-year-old man with ischemic cardiomyopathy and 2 previous myocardial infarctions (in 1985 and 2000). He began to have symptoms of congestive heart failure 2 years before study enrollment. One year before enrollment, the patient had an ischemic stroke with mild residual right hemiparesis and resultant episodes of chronic tonic-clonic seizures. His risk factors for coronary artery disease included diabetes mellitus type II, hypertension, and hypercholesterolemia.

The patient's functional capacity was evaluated at baseline by means of a ramp treadmill protocol¹⁰ with a peak maximal oxygen consumption ($\dot{V}O_{2\max}$) of $15.9 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ and a workload of 4.51 metabolic equivalents (METs). A baseline single-photon-emission computed tomography (SPECT) perfusion study showed a partially reversible perfusion defect in the anterolateral wall, a fixed perfusion defect (scar) in the inferior and posterior walls, and normal perfusion in the septal wall.

Cardiac catheterization revealed a left ventricular ejection fraction of 11%, a 70% ostial and an 85% middle stenosis of the left anterior descending (LAD) coronary artery, an 80% proximal lesion of the left circumflex (LCx) coronary artery, and total occlusion of the first obtuse marginal artery and right coronary artery. The distal segments of the LAD and LCx were diffusely diseased. Owing to the severity and extent of the patient's coronary disease, he was not considered a candidate for surgical or interventional procedures. At enrollment in our study, he was in New York Heart Association (NYHA) functional class III and Canadian Cardiovascular Society (CCS) angina class III. His serum C-reactive protein level, complete blood count, creatine kinase level, and troponin level were normal at baseline.

The patient received a total of 3×10^7 ABMM cells (the Table) that had been harvested 2 hours before the procedure. With the guidance of electromechanical mapping,^{11,12} the cells were injected transendocardially into the anterolateral

wall of the left ventricle. No periprocedural complications were observed.

Noninvasive follow-up evaluation was performed 2 and 6 months after cell therapy. Invasive follow-up evaluation, with cardiac catheterization, was performed at 4 months and revealed no change in coronary anatomy. Symptomatic and functional improvements were noted because the patient returned to NYHA and CCS class I. Holter monitoring showed no malignant ventricular arrhythmias, and signal-averaged ECG parameters remained stable. There was no change in the patient's medications after cell therapy. There was no change in the global ejection fraction or left ventricular volume on echocardiography. The wall-motion index score (on 2-dimensional echocardiography) improved from 1.94 to 1.65 as contractility increased in 5 segments adjacent to the injected area. Myocardial perfusion, as assessed by SPECT, improved in the anterolateral wall. Mechanical data derived from SPECT showed improvements in regional ejection fraction, wall motion, and thickening. In addition, during ramp treadmill testing, the $\dot{V}O_{2\max}$ increased from 15.8 to $25.2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, and the METs increased from 4.51 to 7.21 at 2 months. At 6-month follow-up testing, the $\dot{V}O_{2\max}$ reached $31.6 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, and the METs was 9.03.

From 6 to 11 months after the cell injection procedure, the patient's cardiovascular condition remained stable. At 11 months, however, he had a tonic-clonic seizure at home and was found in cardiopulmonary arrest by family members.

Methods

After signed, informed consent was given by the family, an autopsy was performed, including morphological and immunocytochemical analysis of the heart. This report presents the anatomicopathologic findings about the infarcted areas of the anterolateral ventricular wall, which were the areas that had received bone marrow cell injections. The histological findings from this region were compared with findings from within the interventricular septum (which had normal perfusion in the central region and no cell therapy) and findings from the previously infarcted inferoposterior ventricular wall (which had extensive scarring and no cell therapy).

Immunocytochemical analysis of paraffin sections was performed with antibodies against factor VIII-related antigen (A0082, Dako), vimentin (M0725, Dako), smooth muscle α -actin (M0851, Dako), and CD34 and Ki-67 (NCL-L-End and NCL-Ki67MM1 respectively, Novocastra). Antibodies were reacted with Dako's EnVision+ System/HRP, with diaminobenzidine as a chromogen. Frozen sections were fixed, permeated with acetone, and incubated with antibodies for troponin T (T6277, Sigma), smooth muscle α -actin, sarcomeric actinin (A7811, Sigma), and desmin (D1033, Sigma). Antibodies were revealed with anti-mouse or anti-rabbit IgG, F(ab)₂ fragment, conjugated to fluorescein isothiocyanate (1814192 and 1238833, respectively, Boehringer-Mannheim), and counterstained with a 0.1% solution of Evans blue dye (Merck).

Capillary density was monitored by using computerized image analysis (Image-Pro Plus, MediaCybernetics) of randomly selected fields in sections stained with hematoxylin and reacted with antibody for factor VIII-related antigen ($n=108$) and randomly selected fields in sections reacted with antibodies for smooth muscle α -actin ($n=96$). Transverse sections of capillaries identified by staining for factor VIII and pericyte-containing capillaries identified by staining for smooth muscle α -actin were quantified separately. Results were expressed as the mean number of capillaries per square millimeter in the case of factor VIII-stained slides or the number of capillaries containing pericytes in α -smooth-muscle-actin-stained slides. Larger vessels identified by a continuous wall of smooth muscle actin-positive mural cells were excluded. Differences between the anterolateral, septal, and posterior walls were assessed with Kruskal-Wallis ANOVA and the

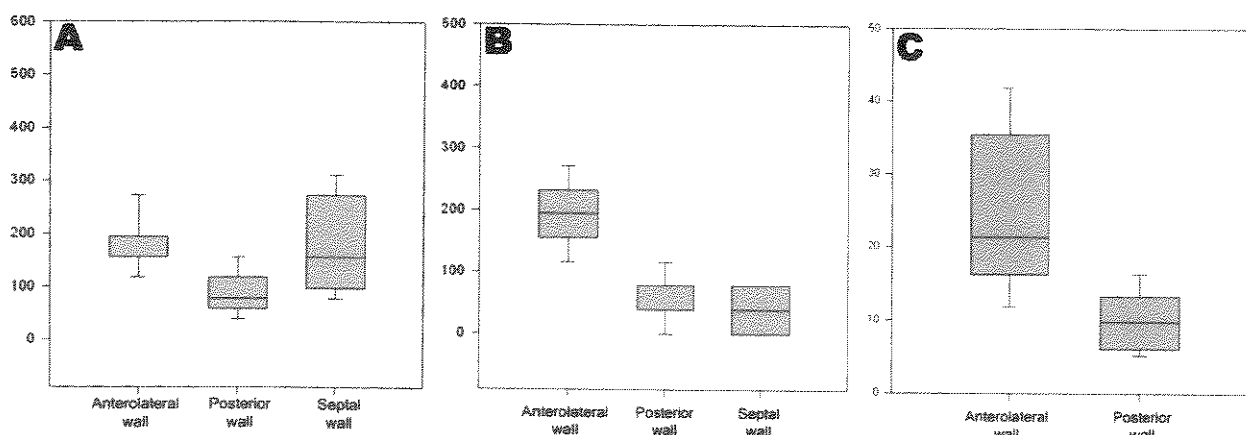


Figure 1. Number of capillaries per mm² in anterolateral, posterior, and septal walls of studied heart. A, Anti-factor VIII-associated antigen counterstained with hematoxylin. B, Anti-smooth muscle α -actin antigen counterstained with hematoxylin. C, Capillaries reacted with anti-factor VIII-associated antigen inside fibrotic areas only in anterolateral and posterior walls. (n=108 microscope fields for A; 96 microscope fields for B; and 40 microscopic fields for C.) Differences were statistically significant among all groups in pairwise comparisons ($P < 0.05$, Newman-Keuls method) for A and B. Differences were significantly different ($P < 0.05$) between anterolateral and posterior walls in Mann-Whitney rank-sum test for C.

Student-Newman-Keuls method for pairwise multiple comparison. Results were considered significant if P was < 0.05 .

Evaluation of the capillary density inside the fibrotic areas within the cell-treated anterolateral wall versus the nontreated posterior wall was performed in 40 selected fields inside the fibrotic scars, excluding the regions containing cardiomyocytes. Microscope fields (at $\times 100$) of factor VIII-stained slides were digitized, and the number of transverse sections of capillaries per square millimeter of fibrotic zones was assessed. Differences between the treated infarcted zones and the nontreated fibrotic wall were assessed by the Mann-Whitney rank-sum test. Results were considered significant if P was < 0.05 .

Results

Anatomopathologic Findings

The heart weighed 765 g. There was severe arteriosclerosis with subocclusive calcified atheromata in all coronary arteries, calcification of the pulmonary artery, and moderate atheromatosis of the aorta. The heart cavities were dilated, with hypertrophic walls. There was no evidence of any acute injury or of lesions that could be related to cell injections. A generalized, homogeneous endocardial opacification, affecting all the cardiac internal surfaces, was identified on histological examination as diffuse fibroelastic hyperplasia of the endocardium. Minute focal and punctate scars were observed, mainly in the posterior and anterolateral walls.

The apical zone was thinned and fibrotic. The posterior and apical regions had dense, fibrotic, well-circumscribed scars that separated cardiomyocyte bundles. The septal wall exhibited focal scars interspersed with cardiac fibers in the regions adjacent to the anterior and posterior ventricular walls, but it was devoid of fibrosis in the central region.

The anterolateral ventricular wall that received cell injections had elongated, irregular, and parallel reddish areas throughout. In the same wall, in adjacent regions that did not receive injections, the density and morphology of the fibrotic scars were similar to those of the posterior wall, suggesting that no overt differences were present among the different infarcted areas before cell injections.

Morphometric Analysis

The capillary density was significantly higher in the areas of the anterolateral ventricular walls that received cell injections than in the previously infarcted posterior wall ($P < 0.0001$) (Figure 1A). The median capillary density in the anterolateral wall was apparently similar to that in the septal wall. However, the broad dispersion of the septal wall data, which may have been due to fibrotic areas in regions close or adjacent to the ventricular walls, generated a statistically significant difference between these 2 groups.

The density of capillaries that contained smooth muscle α -actin-positive cells within their walls was also assessed (Figure 1B). The number of such vessels was higher in the anterolateral wall than in the septal and posterior walls ($P < 0.0001$). Larger vessels identified by a continuous wall of smooth muscle α -actin-positive mural cells were not included in these analyses. The capillary density was significantly higher within fibrotic areas of the anterolateral wall than within fibrotic areas of the posterior wall ($P < 0.0001$) (Figure 1C).

Histological Findings

The anterolateral wall showed irregular, pale regions of fibrotic tissue intercalated with dark regions of cardiac muscle arranged in roughly parallel, interspersed bands, perpendicular to the ventricular wall plane (Figure 2A). No abnormal cell organization, growth, or differentiation or signs of previous focal necrosis, inflammatory reactions, or tissue repair were found in the region that had received cell injections. Inside the fibrotic tissue, trichrome and picrosirius collagen staining disclosed regions with decreased collagen density, in which a rich vascular tree was present. The anterolateral wall also showed larger central vessels that ramified into smaller ones, parallel to the cardiomyocyte bundles (Figure 2B). In the anterolateral wall, the peripheral zone of fibrotic areas merged into the cardiomyocyte layer and lacked well-defined limits, unlike the fibrotic areas observed in the posterior wall (Figure 2C). No fibrotic tissue was seen in the central area of the septal wall (Figure 2D).

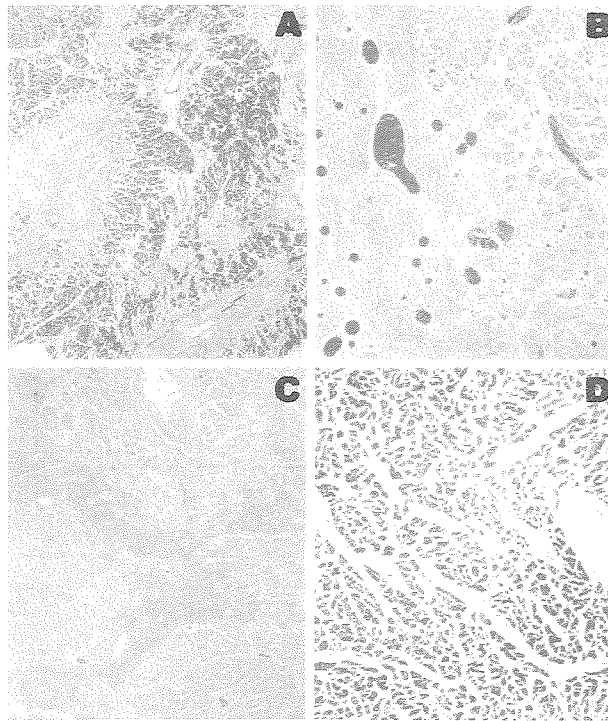


Figure 2. Gomori trichrome stain of anterolateral (A, B), posterior (C), and septal (D) walls. Increased vascular tree is present in B. Original magnification is $\times 40$ in A, B, and D; $\times 100$ in C.

Inflammatory cells were rare in the perivascular region: There were occasional isolated small groups of lymphocytes and, very rarely, granulocytes. At the interface between fibrotic tissue and cardiomyocyte bundles, 2 gradients merged: the decreasing blood vessel diameter and the increasing cardiomyocyte size. Very small cardiomyocytes were seen isolated in the fibrotic matrix adjacent to capillaries in the anterolateral wall, together with a progressively increasing number of fibroblastoid cells that were isolated or interspersed in small groups among the cardiomyocyte bundles.

Immunocytochemistry Findings

Immunocytochemical labeling of factor VIII-associated antigen identified a thin endothelial layer of blood vessels in the posterior, septal (Figure 3A), and anterolateral (Figure 3B) ventricular walls. In the anterolateral wall, neither factor VIII nor CD34 was found in the fibroblastoid cell population inside the fibrotic matrix. In the posterior ventricular wall and septum, smooth muscle α -actin was readily identified in blood vessel wall cells. This protein was present both in pericytes and in the smooth muscle cells of the thin vessel wall layer (Figure 3C) in the anterolateral wall. The vascular tree of the anterolateral wall showed intense labeling in the blood vessel walls, which had a marked hypertrophy of smooth muscle cells (Figure 3D). The same staining pattern was present in isolated cells located in the perivascular position and in the adjacent region among cardiomyocytes and fibrotic matrix (Figure 3E). Vimentin was present in the endothelial layer of the anterolateral wall, in the perivascular cells, and in cells adjacent to or in close contact with the

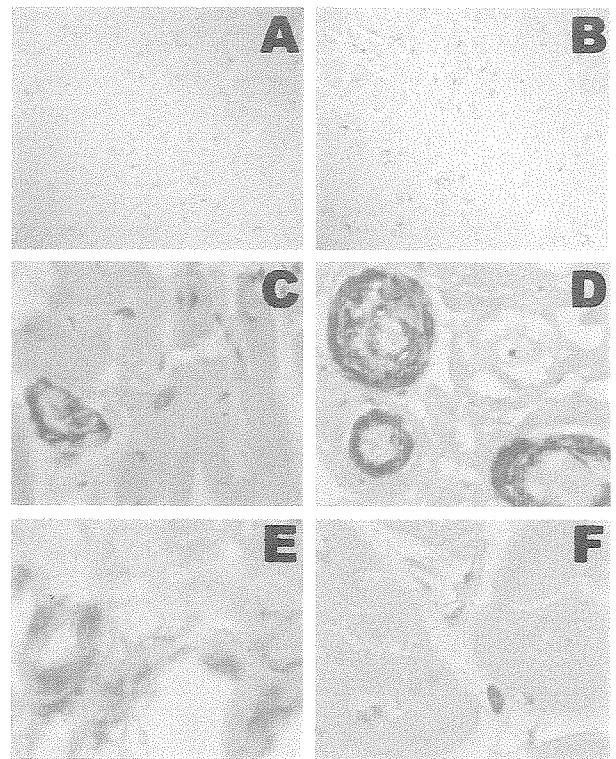


Figure 3. Immunocytochemical identification of factor VIII-associated antigen (A, B) and smooth muscle α -actin (C–E) in blood vessel walls of septal (A) and anterolateral (B–E) regions of studied heart, depicting increased vascular density (B) and hyperplasia of perivascular and mural cells (C–E). Ki67 reactivity was rarely present in perivascular cells of anterolateral wall (F). Original magnification $\times 40$ in A and B, $\times 400$ in C and D, and $\times 1000$ in E and F.

cardiomyocytes (Figure 4A). These cells frequently formed an extensive network that permeated the fibrotic matrix and the interstitial space among cardiomyocytes (Figure 4B).

Desmin was identified in the same cell population. Desmin labeling was less intense in the vascular wall cells and isolated perivascular cells and was more intense in the cells adjacent to cardiomyocytes. On sections perpendicular to the main cardiomyocyte axis, thin desmin-positive fibrils were observed mainly in the submembrane region; on longitudinal sections, a typical transverse banded pattern of desmin was observed (Figure 4C and 4D). Among cardiomyocytes, some of the small cells had strong, peripheral desmin-stained areas (Figure 4D).

In vascular and perivascular cells in the posterior wall and septum, troponin labeling was negative. In the anterolateral wall, troponin labeling was negative in capillary walls but was positive in the adjacent pericapillary pericytes and in cells migrating into the pericapillary matrix (Figure 4E). In larger vessels, troponin-positive cells were observed in the outer cell layers and adventitia, occasionally forming a continuous troponin-positive cell layer around the vessel (Figure 4F). Isolated cells or small groups of troponin-positive cells were found in the area between the fibrotic tissue and cardiomyocytes and inside the adjacent cardiomyocyte bundles. The intensity of labeling increased in the proximity of cardiomyocytes, where some small fibroblastoid cells disclosed a bright cytoplasm

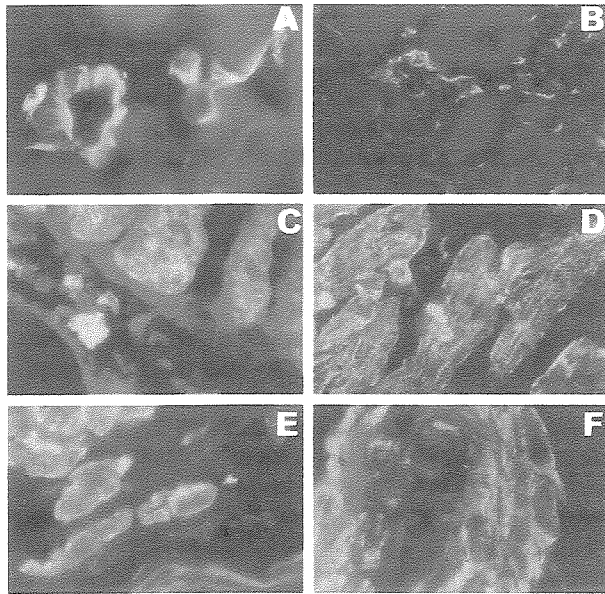


Figure 4. Anterolateral wall that received cell injection therapy. A and B, Immunostaining for vimentin depicted positive reaction in vascular wall and in fibroblastoid interstitial cells. C and D, Immunostaining for desmin showed small groups of intensely reactive cells between blood vessels and cardiomyocytes (C) and small cells inside cardiomyocyte bundles with typical striated cytoskeleton (D). E and F, Immunostaining for troponin showed positive reaction in all mural cells of medium-sized blood vessel. Original magnification is $\times 1000$ in A and F; $\times 400$ in B–E.

homogeneously labeled for troponin (Figure 5A). Occasionally, such cells had an increased volume, with troponin labeling restricted to the periphery; the central area was filled by a troponin-negative cytoskeleton similar to the desmin-stained areas in small cardiomyocytes. In mature cardiomyocytes, troponin-specific antibody labeled the peripheral filamentous and sarcomeric cytoskeleton.

Labeling of sarcomeric actinin was similar to that of troponin. However, both pericapillary pericytes and mural blood vessel cells in the anterolateral region were negative for sarcomeric actinin in blood vessels that were deeply embedded in the fibrotic scar matrix and that remained distant from cardiomyocyte bundles. The same cells located in vessels adjacent to or embedded between the cardiomyocyte bundles were positive for sarcomeric actinin, as were the isolated cells or small groups of fibroblastoid cells (Figures 5B and 5C). Some of these cells had increased in size and, in their central region, disclosed sarcomeric actinin that was already organized in the typical banded pattern of sarcomeres (Figures 5D and 5E). In this central region, isolated cells barely larger than pericytes could be observed; only a few sarcomeres were present, suggesting that those isolated cells had acquired some cardiomyocyte characteristics (Figure 5F).

The Ki67 antibody, which identifies cells actively engaged in replication, reacted only rarely with endothelial cells in the posterior wall. In the anterolateral region, the Ki67 antibody also reacted with pericapillary pericytes and with isolated fibroblastoid cells in the surrounding fibrotic matrix (Figure 3F). The overall cell reactivity with Ki67 antibody was relatively low.

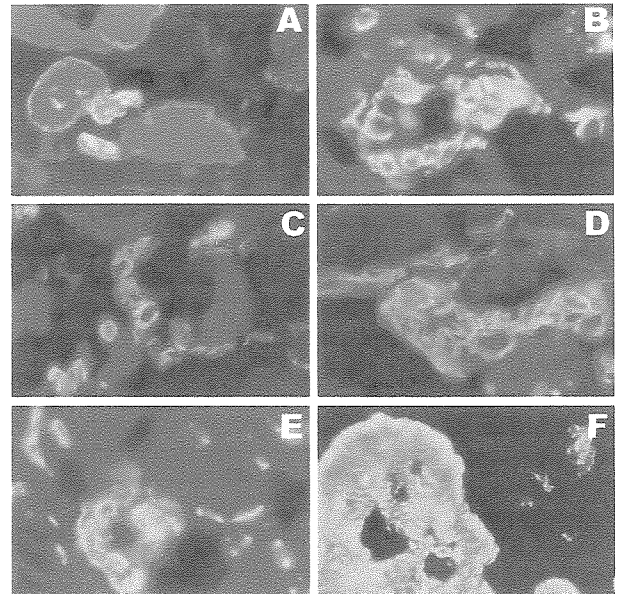


Figure 5. Anterolateral wall that received cell injection therapy. A, Immunostaining for troponin depicted small cardiomyocyte-like cells with intense reaction in peripheral cell area. B–F, Immunostaining for sarcomeric actinin depicted reactivity in mural cells of blood vessel (B–E) and isolated cells among cardiomyocytes with actinin organization similar to that of sarcomeres (E, F). Original magnification is $\times 400$ in A and F; $\times 1000$ in B–E.

Discussion

Accumulating evidence from both experimental animal studies^{4–6} and human trials^{7–9} indicates that ABMM cell therapy improves myocardial perfusion in patients with ischemic heart disease. At the same time, clinical stem cell therapy research is focusing more on safety than on efficacy. The present report describes the postmortem study of one patient who underwent transendocardial injection of ABMM cells. Accordingly, the major findings in this report pertain to the procedure's safety: No abnormal or disorganized tissue growth, no abnormal vascular growth, and no enhanced inflammatory reactions were observed. In addition, some intriguing histological and immunohistochemical findings were documented: (1) There was a higher capillary density in the cell-treated area than in nontreated areas of the heart. (2) A proliferation of smooth muscle α -actin-positive pericytes and mural cells was noted. (3) The aforementioned cells expressed specific cardiomyocyte proteins.

In the postnatal period, new blood vessels form through either vasculogenesis or angiogenesis, in which proliferation of endothelial cells is followed by remodeling of the extracellular matrix and proliferation of blood wall cells.^{13–15} Endothelial cells can result from bone marrow-derived progenitors (postnatal vasculogenesis) or from the migration and proliferation of endothelial cells from existing vessels (angiogenesis).¹⁶ Mural cells such as pericytes and smooth muscle cells can be derived from bone marrow mesenchymal cells (stroma), myofibroblasts, and/or fibroblasts.¹⁷ In the neoangiogenic process, pericytes are derived either from cells of adjacent tissues (mobilized by growth factors produced by endothelial cells) or from proliferation of adventitial and pericapillary pericytes and

their distal gliding on the abluminal side of the growing blood vessel's basement membranes.¹³ The alternative origination of pericytes from mesenchymal stem cells has been proposed and preliminarily confirmed in experimental models.¹⁸ Pericytes may be essential to achieve a physiological angiogenic process with resultant durable blood vessels. In the present case, when compared with the noninjected regions, the cell-injected wall had marked hyperplasia of pericytes and mural cells. The observed hypertrophic pericytes displayed 2 characteristics: First, although still located in the vascular wall, they expressed specific myocardial proteins and second, they were found in locations that suggested detachment, having migrated into the adjacent tissue and reached proximal cardiomyocytes that were either isolated or in small cell clumps. Closer to cardiomyocytes, the expression of myocardial proteins was enhanced, yielding brighter immunostaining throughout the whole cytoplasm. The significance of these findings remains to be established. However, within the posterior wall, none of the findings was seen, and small blood vessels could only rarely be found.

Notwithstanding the aforescribed data, the present report has limitations that severely restrict our ability to make conclusions about the role of ABMM cells in myocardial regeneration. The findings could have occurred by chance. It is impossible to exclude the influence of a natural recovery process as the cause for the difference in vascular density between cell-treated and nontreated areas. Comparisons of capillary density among different sections of wall were based on specimens from a single patient. Moreover, this is an isolated, uncontrolled case involving late events after injection of unlabeled cells; it precluded the use of any imaging technique that could have helped to colocalize and identify the presence of stem cell direct descendants within the vessel wall or myocardium. Therefore, the significant difference in vascular density between cell-treated and nontreated areas cannot be extrapolated to a larger population of similar patients. However, the increased vascular density within the cell-injected anterolateral wall accompanied that wall's improvement in perfusion as assessed by SPECT, whereas all other walls remained unchanged.

Conclusion

At 11-month follow-up evaluation, stem cell therapy was not associated with any adverse histological findings. Morphological and immunohistochemical analysis of the area that underwent ABMM cell implantation suggested that that area had more capillaries than nontreated areas and that ABMM cell therapy was associated with hyperplasia of pericytes, mural cells, and adventitia. Some of these cells had acquired cytoskeletal elements and contractile proteins (desmin, tropomyosin, and sarcomeric actinin).

Acknowledgments

The authors thank L. Maximilian Buja, MD, and Silvio Litovsky, MD, for reviewing the pathological findings; Marianne Mallia-Hughes, ELS, and Virginia Fairchild of the Section of Scientific Publications of the Texas Heart Institute, for editorial assistance; and William K. Vaughn, PhD, for assistance with statistical questions.

References

- Hakuno D, Fukuda K, Makino S, Konishi F, Tomita Y, Manabe T, Suzuki Y, Umezawa A, Ogawa S. Bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes (CMG cells) express functional adrenergic and muscarinic receptors. *Circulation*. 2002;105:380–386.
- Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest*. 1999;103:697–705.
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001;401:701–705.
- Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, Goodell MA. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest*. 2001;107:1395–1402.
- Nishida M, Li TS, Hirata K, Yano M, Matsuzaki M, Hamano K. Improvement of cardiac function by bone marrow cell implantation in a rat hypoperfusion heart model. *Ann Thorac Surg*. 2003;75:768–773.
- Olivares EL, Ribeiro VP, João PS, Ribeiro KC, Mattos EC, Goldenberg RC, Mill JG, Dohmann HF, dos Santos RR, de Carvalho AC, Masuda MO. Bone marrow stromal cells improve cardiac performance in healed infarcted rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287:H464–H470.
- Assmus B, Schächinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Döbert N, Grunwald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmeler S, Zeiher AM. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*. 2002;106:3009–3017.
- Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kosterling M, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G, Wernet P. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation*. 2002;106:1913–1918.
- Perin EC, Dohmann HFR, Borojevic R, Silva SA, Sousa AL, Mesquita CT, Rossi MI, Carvalho AC, Dutra HS, Dohmann HJ, Silva GV, Belem L, Vivacqua R, Rangel FO, Esporcatte R, Geng YJ, Vaughn WK, Assad JA, Mesquita ET, Willerson JT. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation*. 2003;107:2294–2302.
- Gibbons R, Balady GJ, Bricker JT, Chaitman BR, Fletcher GF, Froelicher VF, Mark DB, McCallister BD, Mooss AN, O'Reilly MG, Winters WL, Gibbons RJ, Antman EM, Alpert JS, Faxon DP, Fuster V, Gregoratos G, Hiratzka LF, Jacobs AK, Russell RO, Smith SC. American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. Committee to Update the 1997 Exercise Testing Guidelines. ACC/AHA 2002 guideline update for exercise testing: summary article. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to Update the 1997 Exercise Testing Guidelines). *J Am Coll Cardiol*. 2002;40:1531–1540.
- Perin EC, Silva G, Sarmento-Leite R, Sousa AL, Howell M, Muthupillai R, Lambert B, Vaughn WK, Flamm SD. Assessing myocardial viability and infarct transmural with left ventricular electromechanical mapping in patients with stable coronary artery disease: validation by delayed-enhancement magnetic resonance imaging. *Circulation*. 2002;106:957–961.
- Perin E, Silva GV, Sarmento-Leite R. Left ventricular electromechanical mapping as a diagnostic method. In: Abela GS, ed. *Myocardial Revascularization: Novel Percutaneous Approaches*. New York, NY: Wiley-Liss; 2001:183–195.
- Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med*. 2003;9:685–693.
- Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*. 2003;9:653–660.
- Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*. 2000;6:389–395.
- Isner JM, Asahara T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest*. 1999;103:1231–1236.
- Oettgen P. Transcriptional regulation of vascular development. *Circ Res*. 2001;89:380–388.
- Ziegelhoeffer T, Fernandez B, Kostin S, Heil M, Voswinckel R, Helisch A, Schaper W. Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature. *Circ Res*. 2004;94:230–238.