

CAPÍTULO 8

TERAPIAS GÊNICAS E CELULARES NA CARDIOLOGIA: O FUTURO DA MEDICINA REGENERATIVA

Fernanda Turque Martins

RESUMO

As doenças cardiovasculares (DCV) representam uma das principais causas de morbimortalidade global, impulsionando a busca por estratégias terapêuticas inovadoras. Nesse contexto, as terapias gênicas e celulares têm emergido como promissoras abordagens para a regeneração do tecido cardíaco, oferecendo novas perspectivas para pacientes com insuficiência cardíaca, infarto do miocárdio e outras condições debilitantes. A terapia celular baseia-se na utilização de células-tronco ou progenitoras para promover a regeneração do miocárdio danificado. Células-tronco mesenquimais, células derivadas da medula óssea e células progenitoras endoteliais são algumas das principais fontes estudadas, visando melhorar a função cardíaca por meio da diferenciação celular e da liberação de fatores parácrinos que estimulam a angiogênese e reduzem a inflamação. Ensaios clínicos demonstram benefícios modestos, sugerindo a necessidade de aprimoramento na retenção e integração celular ao tecido-alvo. Já a terapia gênica busca modificar a expressão de genes envolvidos na homeostase cardíaca, utilizando vetores virais ou não virais para introduzir material genético no coração. Estratégias incluem a entrega de fatores de crescimento, como VEGF e FGF, para promover a revascularização, ou a modulação de genes que regulam a apoptose e a contratilidade miocárdica. Avanços recentes na tecnologia CRISPR-Cas9 também possibilitam a correção de mutações associadas a cardiomiopatias hereditárias, ampliando o potencial terapêutico dessa abordagem. Apesar dos avanços, desafios persistem, como a segurança na manipulação genética, o risco de resposta imunológica adversa e a eficácia limitada da integração celular no tecido cardíaco. A combinação de terapia gênica com terapia celular tem sido explorada como estratégia sinérgica para superar essas limitações. O futuro das terapias gênicas e celulares na cardiologia regenerativa depende de pesquisas que aprimorem a especificidade e a durabilidade dos efeitos terapêuticos. O desenvolvimento de biomateriais para melhorar a retenção celular e novas abordagens de edição gênica pode revolucionar o tratamento das doenças cardiovasculares, oferecendo esperança para milhões de pacientes no mundo.

Palavras-chave: Terapia gênica. Terapia celular. Células-tronco. Medicina regenerativa. Regeneração miocárdica.

1. TERAPIAS REGENERATIVAS CARDÍACAS BASEADAS EM CÉLULAS

Nos últimos 25 anos, estudos regenerativos baseados em células se concentraram em restaurar a função de um coração lesionado pela administração de células-tronco/progenitoras exógenas ou outras células somáticas adultas. Diferentes fontes celulares foram investigadas, incluindo células-tronco adultas derivadas da medula óssea e células adiposas, células derivadas da cardiosfera, mioblastos esqueléticos e células-tronco pluripotentes. O objetivo principal desses estudos era de que essas células se diferenciassem em novos cardiomiócitos e se integrassem ao miocárdio hospedeiro lesionado, melhorando a função cardíaca. Ao longo dos anos, em meio a tentativas e desafios, os pesquisadores identificaram vários mecanismos de função cardíaca melhorada com transplante celular, seja mediado pelo efeito parácrino ou pela substituição celular direta de cardiomiócitos junto com a neovascularização¹⁻⁴.

2. CÉLULAS-TRONCO ADULTAS PARA REGENERAÇÃO CARDÍACA

2.1 Células derivadas da medula óssea

Uma das primeiras fontes de células para regeneração cardíaca a ser investigada foram as células derivadas da medula óssea. Considerava-se que essa fonte era a candidata mais adequada, dada a presença de células-tronco adultas na medula óssea e sua suposta capacidade de se diferenciar em outras linhagens celulares. Estudos em animais relataram que: os hemangioblastos da medula óssea contribuíram para a formação de novos vasos; as células-tronco hematopoiéticas da medula óssea eram capazes de se diferenciar em cardiomiócitos, endotélio e células musculares lisas⁵⁻⁶; as células da medula óssea deram origem a células progenitoras mesodérmicas que se diferenciaram em células endoteliais⁷; e os progenitores endoteliais transdiferenciaram-se em cardiomiócitos pulsantes⁸.

Os primeiros estudos alegando que o transplante de células derivadas da medula óssea em corações de camundongos lesionados poderia regenerar o tecido miocárdico não eram reproduzíveis e careciam de base científica rigorosa. No entanto, a aplicação de células derivadas de medula óssea de estudos pré-clínicos para clínicos progrediu mais rapidamente do que o previsto⁹⁻¹¹. Esses estudos se concentraram principalmente na terapia celular para infarto do miocárdio (IM) agudo por meio de injeção intracoronária de células derivadas de medula óssea. Porém, a capacidade regenerativa das células mononucleares derivadas de medula óssea (MNCs) ainda não foi cientificamente estabelecida. Ensaios clínicos demonstraram melhora na função cardíaca após o transplante de MNCs¹²⁻¹⁴. Por outro lado, estudos falharam em revelar o efeito terapêutico das MNCs derivadas de medula óssea¹⁵⁻¹⁷.

Dos estudos que identificaram melhora em curto prazo na função global e regional, não houve benefícios em longo prazo do transplante de células de medula óssea, indicando que as células de medula óssea podem acelerar a recuperação da função, mas não fornecem um efeito sustentado em longo prazo. É importante ressaltar que estudos subsequentes contradizem as descobertas iniciais em estudos com animais e mostraram, por meio de rastreamento genético, que as células-tronco hematopoiéticas não se transdiferenciam em cardiomiócitos e que o transplante de células de medula óssea não gerou um aumento significativo em cardiomiócitos em comparação com corações enxertados simulados. Experimentos bem planejados também revelaram que o transplante de células-tronco hematopoiéticas em corações lesionados levou apenas à geração de células de linhagem hematopoiética. Esses estudos confirmaram que a medula óssea não serve como reservatório para células precursoras cardíacas¹⁸⁻²⁰.

2.2 Adipócitos

Para encontrar outra fonte de células-tronco adultas, pesquisadores sugeriram que o tecido adiposo poderia ser uma fonte de células-tronco adultas com potencial de diferenciação multipotente²¹. Zuk et al²² avaliaram uma população putativa de células-tronco com lipoaspirados humanos, capazes de diferenciar *in vitro* em linhagens osteogênica, adipogênica, miogênica e condrogênica, quando tratadas com fatores específicos de linhagem estabelecidos. Vários estudos relataram a capacidade das células adiposas de melhorar a função cardíaca e reduzir a remodelação cardíaca e o tamanho do infarto em vários modelos animais²³⁻²⁵.

Hong et al²³ analisaram a área de defeito de perfusão miocárdica e a reserva de fluxo coronário em um modelo de IM suíno 28 dias após a administração intramiocárdica de bolus único ou doses divididas de células-tronco derivadas de tecido adiposo humano. Eles verificaram que os animais que receberam injeções celulares tiveram fração de ejeção significativamente melhorada e área de defeito de perfusão reduzida em comparação ao placebo, possivelmente mediada por efeitos moduladores imunológicos, aumento da angiogênese e brotamento de nervos miocárdicos. Embora outras equipes tenham demonstrado resultados semelhantes em ensaios clínicos controlados por placebo²⁶, os dois ensaios clínicos mais extensos falharam em detectar mudanças significativas nas funções cardíacas pós-transplante de células derivadas de tecido adiposo^{27,28}.

2.3 Células derivadas da cardiosfera

Alguns pesquisadores também começaram a usar tecido cardíaco como fonte de células-tronco, postulando que células derivadas do coração poderiam ser adequadas para regeneração miocárdica. Espécimes de biópsia endomiocárdica percutânea foram cultivados em cultura primária, revelando sua capacidade de desenvolver células multicelulares semelhantes ao estroma após vários dias. Células ao redor dos explantes foram coletadas

para produzir uma população heterogênea de células cardíacas com propriedades de células-tronco clonogênicas, denominadas células derivadas da cardiosfera (CDCs)²⁹⁻³¹. Quando as CDCs foram injetadas no miocárdio infartado de camundongo, rato ou porco, eles observaram melhora da função cardíaca e redução do volume da cicatriz³¹⁻³⁵.

Apesar dos resultados promissores em modelos animais, o ensaio clínico Intracoronary ALLogeneic heart STem cells to Achieve Myocardial Regeneration (ALLSTAR), que avaliou a administração intracoronária de CDCs alogênicos em pacientes, mostrou melhora nos volumes diastólico final e sistólico final do ventrículo esquerdo, mas não melhorou a fração de ejeção ou o tamanho da cicatriz em relação ao placebo em 6 meses^{34,36}. Outro ensaio clínico em humanos, CADUCEUS (Cardiosphere-Derived Autologous Stem Cells to Reverse Ventricular Dysfunction) administrou CDCs autólogos por infusão intracoronária em pacientes com IM agudo. Os resultados identificaram melhora no tamanho da cicatriz e na espessura da parede radiograficamente, mas nenhuma alteração significativa nos volumes diastólico final ou sistólico do ventrículo esquerdo ou na fração de ejeção^{37,38}.

2.4 Músculo esquelético

Os mioblastos – ou células satélites – apresentam várias propriedades interessantes para uso clínico: origem autóloga, facilidade de expansão *in vitro*, diferenciação exclusiva em células de fibras musculares e alta resistência à isquemia³⁹. Estudos descreveram a eficácia do transplante intramiocárdico de mioblastos esqueléticos autólogos em modelos animais de insuficiência cardíaca (IC) isquêmica, com melhora funcional e evidência histológica de diferenciação de mioblastos em miotubos⁴⁰⁻⁴³. Desde o primeiro transplante clínico de mioblastos, realizado em 2001³⁹, vários ensaios clínicos de fase I foram desenvolvidos, envolvendo, principalmente, doença cardíaca isquêmica crônica com células mioblásticas injetadas em regiões de cicatriz⁴⁴⁻⁴⁹.

Menasché et al³⁹ implantaram mioblastos esqueléticos autólogos na área de cicatriz pós-infarto de pacientes submetidos a enxerto de revascularização da artéria coronária. Cinco meses depois, houve evidência de contração e viabilidade na cicatriz enxertada na ecocardiografia e tomografia por emissão de pósitrons. Porém, no estudo de acompanhamento de Hagege et al⁴⁴, cinco de nove pacientes desenvolveram taquicardias ventriculares (TV) após o transplante de células.

Posteriormente, Menasché et al⁵⁰ concluíram um estudo multicêntrico de fase II – conhecido como – Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) – que incluiu 120 pacientes. Nele, os pacientes foram separados em grupo de células placebo, dose baixa e dose alta, indicando que o transplante de mioblastos esqueléticos não melhorou a função cardíaca e mostrou maior incidência de eventos arritmicos. Apesar da controversa melhora na função cardíaca, a aplicação de mioblastos

esqueléticos para regeneração cardíaca é limitada pelo efeito adverso das arritmias.

2.5 Células-tronco embrionárias e pluripotentes induzidas e regeneração

Nas últimas décadas, a medicina regenerativa passou por uma mudança drástica do uso de células-tronco adultas para células-tronco pluripotentes (PSCs). Cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes emergentes (PSC-CMs) com capacidade de proliferação indefinida se tornaram os candidatos ideais para a medicina regenerativa. Os PSCs são caracterizados por autorrenovação – a capacidade de proliferar indefinidamente – e potência – a capacidade de se diferenciar em diferentes tipos de células –, sendo, com isso, os principais meios para regeneração de tecidos após lesão⁵¹.

A derivação e caracterização de células-tronco embrionárias humanas (hESC) da massa celular interna do blastocisto começou no final da década de 1990⁵¹. A aplicação inicial de hESC para transplante cardíaco utilizou injeção miocárdica direta de hESCs indiferenciadas, o que levou à formação de teratoma⁵². Como resultado, os pesquisadores mudaram seu foco para o desenvolvimento de novas estratégias para isolar e gerar progenitores cardíacos derivados de ESC ou cardiomiócitos. Protocolos *in vitro* foram estabelecidos para diferenciar ESCs de camundongo e humanas em células progenitoras cardíacas (CPCs) e/ou cardiomiócitos^{53,54}.

Estudos pré-clínicos iniciais avaliaram o efeito do transplante de CPCs e/ou cardiomiócitos em modelos de isquemia aguda e crônica. Os resultados mostraram efeitos benéficos em modelos isquêmicos agudos e subagudos^{55,56}, porém, nenhum benefício foi observado em modelos de isquemia crônica^{57,58}. Alguns pesquisadores também utilizaram hiPSC-CMs incorporados em uma lâmina epicárdica para transplante em um modelo de IM suíno e mostraram efeitos benéficos de longo prazo, mesmo um mês após o IM^{59,60}.

Um desafio adicional do transplante celular é o desenvolvimento de arritmias fatais logo após o procedimento. A maioria dos estudos pré-clínicos em primatas não humanos e porcos revelou o desenvolvimento de arritmias após a administração intramiocárdica de cardiomiócitos derivados de PSC. A origem dessas arritmias pode ser a contaminação das células transplantadas com células marcapasso (automaticidade) ou a falta de integração dessas células no miocárdio do hospedeiro devido à sua imaturidade. Arritmias ventriculares transitórias devido a células transplantadas dificultam a aplicação clínica de cardiomiócitos derivados de PSC na medicina regenerativa^{61,62}.

No Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-derived Progenitors in Severe Heart Failure (ESCORT)⁶³ – um dos primeiros ensaios clínicos –, progenitores cardíacos derivados de ESC humanos (CD15⁺ Is-1⁺) foram incorporados em uma matriz de fibrina e aplicados pericárdicos durante

o enxerto de revascularização do miocárdio (CABG) em pacientes com histórico de IM (menos de 6 meses) e fração de ejeção do ventrículo esquerdo prejudicada (FEVE $\leq 35\%$). 100% dos pacientes apresentaram melhora leve da função cardíaca, com apenas um paciente desenvolvendo arritmias. O benefício clínico da cirurgia de CABG concomitante, no entanto, impactou a interpretação deste estudo. Uma diferença importante entre os modelos pré-clínicos e este estudo clínico foi o método de administração de células, indicando que o modo de administração desempenha um papel fundamental não apenas na retenção celular (efeito de longo prazo), mas também na arritmogenicidade da terapia baseada em células.

3. TERAPIA BASEADA EM CÉLULAS E DOENÇAS CARDIOVASCULARES

3.1 Infarto agudo do miocárdio

A aplicação da terapia baseada em células na medicina clínica começou em grande parte com ensaios investigando IAM. O objetivo era usar a infusão intracoronária de células-tronco como um complemento à intervenção coronária percutânea para limitar a necrose dos cardiomiócitos e prevenir a progressão para IC, uma estratégia também conhecida como cardioproteção. Os produtos mais comumente usados nesse caso são as células mononucleares da medula óssea (BMMNCs), coletadas de pacientes de 1 a 12 dias após a intervenção coronária percutânea e administradas no mesmo dia. As BMMNCs têm a vantagem de não exigir expansão da cultura e podem ser coletadas, isoladas e reinfundidas rapidamente⁶⁴.

Os primeiros ensaios Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI)^{65,66} e Bone Marrow Transfer to Enhance ST-Elevation Infarct Regeneration (BOOST)⁶⁷ avaliaram BMMNCs administradas, em média, 5 dias após um IAM. Ambos os ensaios relataram melhorias na FEVE nos grupos tratados com BMMNC durante um curto período de acompanhamento (4 a 6 meses), além de melhorias relacionadas diretamente à remodelação cardíaca, incluindo redução do tamanho do infarto, estimulando o entusiasmo pela terapia com BMMNC. Considera-se, no entanto, que o TOPCARE-AMI não incluiu um grupo de controle e, embora o ensaio BOOST tenha comparado pacientes tratados com células a pacientes de controle que receberam o padrão de tratamento, este estudo foi aberto, pois os pacientes de controle não passaram por nenhum procedimento adicional. Os ensaios Leuven-AMI⁶⁸ e FINCELL⁶⁹ (estudo Finish Stem Cell), que foram duplo-cegos, também relataram melhorias na FEVE em resposta à infusão de BMMNC.

O estudo The Reinfusion of Enriched Progenitor Cells and Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction (REPAIR-AMI)⁷⁰, um ensaio clínico de fase III, duplo-cego e controlado por placebo, é o maior ensaio clínico para IAM até o momento e foi projetado para avaliar a eficácia das BMMNCs. Este estudo randomizou pacientes para receber células ou

placebo de 3 a 7 dias após o IAM. Em 4 meses, a FEVE foi significativamente melhorada em uma média de 5,5% no grupo BMMNC em comparação com apenas 3,0% no grupo placebo. Em 1 ano, o composto de morte, IM e necessidade de revascularização repetida foi menor no grupo BMMNC⁷¹, e esse efeito na mortalidade, mas não na melhora da FEVE, foi mantido em 5 anos⁷².

Apesar das descobertas, outros ensaios produziram resultados contraditórios, moderando as expectativas relacionadas às BMMNCs. Os ensaios multicêntricos, duplo-cegos e controlados por placebo TIME⁷² e LateTIME⁷³, realizados por pesquisadores da Cardiovascular Cell Therapy Research Network (CCTRN) não encontraram melhorias na FEVE, volumes do VE ou movimento da parede, conforme medido por cMRI, entre os grupos BMMNC e placebo. O acompanhamento de dois anos dos 120 pacientes do estudo TIME não mostrou melhorias em relação ao placebo na função do VE, conforme medido por ressonância magnética cardíaca⁷⁴.

O estudo Swiss Multicenter Intracoronary Stem Cells Study in Acute Myocardial Infarction (SWISS AMI)⁷⁵, que analisou a administração de BMMNC em 2 intervalos pós-IAM (5 a 7 dias e 3 a 4 semanas) em 192 pacientes, não encontrou nenhuma diferença na função cardíaca, volumes cardíacos ou tamanho da cicatriz em comparação com os controles. O estudo BOOST-2⁷⁶ examinou o efeito da administração de BMMNCs 1 a 2 dias após a intervenção coronária percutânea em 153 pacientes e não conseguiu repetir os resultados positivos encontrados no estudo BOOST original. Os pesquisadores compararam doses altas e baixas de placebo, BMMNCs e BMMNCs irradiadas com radiação γ . O último grupo foi adicionado, pois a radiação γ inibe a mitose e previne a diferenciação de células-tronco, permitindo testar se a mitose é necessária para. Não houve diferença na FEVE, volumes do VE ou massa da cicatriz em 6 meses entre nenhum dos grupos.

O ensaio randomizado, duplo-cego e controlado por placebo investigando BMMNCs para IAM, o ensaio MiHeart/AMI⁷⁷, também não observou melhora nos marcadores de remodelação do VE ou FEVE. Embora o REPAIR-AMI tenha registrado melhora em endpoints clínicos rígidos, a meta-análise de dados individuais de pacientes e dados agregados de ensaios de controle randomizados em IAM não encontraram benefícios da terapia celular intracoronária em eventos clínicos ou FEVE⁷⁸.

Considerando-se que as BMMNCs são uma população não selecionada, a subpopulação selecionada de progenitores endoteliais CD34+ também foi avaliada como terapêutica para IAM, devido à sua capacidade angiogênica aumentada⁷⁹. O estudo The NBS10 Versus Placebo Post ST Segment Elevation Myocardial Infarction (PreSERVE-AMI)⁸⁰, o maior estudo de células-tronco para IAM, examinou células CD34+ isoladas da medula óssea em comparação com placebo. Em um ano, a terapia celular não melhorou a FEVE ou a perfusão miocárdica em repouso. Porém, quando os ajustes foram feitos para a duração da isquemia, houve uma melhora

dependente da dose na FEVE, tamanho do infarto e sobrevivência, indicando que esta população purificada de células pode exercer efeitos benéficos.

Os primeiros ensaios em IMA são marcados por um grande grau de heterogeneidade, destacando a importância do rigor e das técnicas padronizadas em ensaios clínicos. O manuseio e o isolamento das células variaram muito entre os ensaios, o que impacta o número total de células, as unidades formadoras de colônias e a capacidade migratória. Essas descobertas destacam ainda mais a heterogeneidade das BMMNCs e o impacto de diferentes meios de isolamento e armazenamento em sua atividade biológica. Também apoiam a necessidade de ensaios para determinar a função das células antes de seu uso em ensaios clínicos, um conceito que ainda não chegou à prática. Os ensaios futuros devem aderir a técnicas rigorosas de manuseio de células que sejam claras e reprodutíveis⁸¹.

As técnicas de imagem também variaram entre os estudos. Nos primeiros ensaios positivos, a FEVE e a função cardíaca foram avaliadas usando ventriculografia esquerda ou ecocardiografia, ambas repletas de problemas de variabilidade e precisão inter-observador. A ressonância magnética cardíaca é considerada o padrão ouro para imagens cardíacas, devido à sua maior precisão e capacidade de medir tecido cicatricial com o uso de realce tardio de gadolínio⁸². Em uma meta-análise de ensaios de IAM, a FEVE foi significativamente melhorada pela terapia BMMNC em estudos usando ecocardiografia ou ventriculografia esquerda, mas não naqueles que usaram tomografia computadorizada por emissão de fóton único ou cMRI⁸³. Outra meta-análise usando apenas resultados de cMRI não mostrou benefício significativo da administração de BMMNC após IAM na FEVE, volumes de VE ou tamanho do infarto⁸⁴. Essas descobertas são consistentes com ensaios mais recentes usando ressonância magnética cardíaca, que não conseguiram mostrar um benefício de BMMNCs⁷³⁻⁷⁶.

Vários de experiência clínica forneceram lições importantes. A consistência na medição de pontos finais melhorou, com a maioria das investigações adotando ressonância magnética cardíaca para avaliação anatômica e funcional. Da mesma forma, a padronização em técnicas de isolamento e manuseio de células foi defendida por consórcios como o CCTRN. Com essas melhorias, os ensaios mais recentes usando BMMNCs para IAM não conseguiram mostrar nenhum benefício. É possível que o ambiente pós-infarto inflamatório e hipóxico possa ser letal para a maioria das células transplantadas, limitando sua sobrevivência e eficácia reparadora⁶⁴⁻⁸⁴.

BMMNCs não demonstraram muita eficácia em ensaios mais recentes, o que levou a esforços para encontrar tipos de células mais eficazes, e MSCs parecem ser bons candidatos. De fato, ensaios que avaliam outros tipos de células, como células mononucleares da medula óssea alogênicas para IAM produziram resultados promissores. Hare et al⁸⁶ relataram que a administração intravenosa de células mononucleares da medula óssea alogênicas foi segura e reduziu episódios de taquicardia

ventricular e melhorou a FEVE, especialmente em pacientes com IM anterior. Gao et al⁸⁷, por sua vez, randomizaram 116 pacientes para tratamento com placebo intracoronário ou células mononucleares da medula óssea derivadas do cordão umbilical (UC-MSC) de 5 a 7 dias após IAM e notaram reduções no tamanho da cicatriz e um aumento médio na FEVE absoluta de 7,8% (5% maior do que no placebo).

3.2 Angina refratária

A angina refratária é um problema crescente entre sobreviventes de eventos cardíacos isquêmicos, contabilizando até 1,8 milhões de pacientes somente nos Estados Unidos. Esses pacientes clinicamente desafiadores, muitas vezes, não são elegíveis ou não se beneficiam de revascularização adicional devido à doença microvascular, além de existirem poucos tratamentos eficazes disponíveis para seus sintomas⁸⁸. As células-tronco são uma opção terapêutica nesses casos, pois estimulam a neoangiogênese para melhorar a perfusão⁸⁹. BMMNCs foram utilizadas nessa população de pacientes, por meio de infusão coronária ou injeção transendocárdica de células-tronco (TESI). Da mesma forma, populações purificadas de células CD34+ e CD133+ foram testadas, devido a sua capacidade de angiogênese e perfusão melhorada⁷⁹. Losordo et al⁸⁹ avaliaram o potencial da injeção endomiocárdica de uma dose baixa ou alta de células progenitoras circulantes CD34+ versus placebo em 167 pacientes com angina refratária. A frequência de angina foi significativamente menor no grupo tratado com células em comparação com o grupo placebo após 12 meses (6,3 versus 11 eventos/semana, respectivamente). Além disso, houve uma melhora importante na tolerância ao exercício nos pacientes que receberam a dose menor de células.

O estudo Efficacy and Safety of Targeted Intramyocardial Delivery of Auto CD34+ Stem Cells for Improving Exercise Capacity in Subjects With Refractory Angina (RENEW)⁸⁸ foi inicialmente planejado como um estudo de fase III para avaliar a eficácia de células CD34+ autólogas isoladas do sangue periférico. O estudo ficou aquém da projeção de 444 pacientes inscritos, em decorrência do encerramento por considerações financeiras, inscrevendo apenas 112 pacientes. Apesar do tamanho pequeno, os resultados registraram melhorias no tempo total de exercício em relação ao placebo em três meses e na frequência de angina em seis meses em pacientes que receberam injeções de células endomiocárdicas em comparação com nenhuma intervenção. Não houve melhora significativa no tempo de exercício nos pacientes tratados com células em 6 e 12 meses.

Uma análise agrupada em nível de paciente de 304 pacientes de três ensaios clínicos randomizados, duplo-cegos e controlados por placebo de TESI de células CD34+, por sua vez, verificou que a terapia resultou em melhorias clinicamente significativas e duradouras (até 12 meses) no tempo total de exercício e na frequência de angina. Além disso, houve redução da mortalidade na população tratada em 24 meses⁹⁰.

Outra meta-análise de seis ensaios clínicos usando células-tronco para angina refratária apoia a terapia com células CD34+, pois reduz o número de episódios de angina e melhora a tolerância ao exercício e a perfusão miocárdica. Considerando todos os dados conjuntamente, esses estudos indicam que a terapia com células CD34+ pode fornecer uma solução clinicamente significativa nessa população de pacientes, mesmo sem evidências definitivas de redução da mortalidade de um único ensaio⁹¹.

3.3 Cardiomiopatia isquêmica

A doença cardíaca isquêmica é atualmente uma das principais causas de morte no mundo. Após o IM, a extensão da lesão se correlaciona com o grau de remodelação cardíaca, que por sua vez é o substrato para insuficiência cardíaca (IC) e morte cardíaca súbita. Como a medicina regenerativa cardíaca visa reparar a lesão tecidual e restaurar a função do miocárdio danificado, ela representa um tratamento potencialmente curativo, em vez de paliativo, para a cardiomiopatia isquêmica (CMI) crônica. Por se tratar de um distúrbio crônico, a DCI permite tempo para a coleta, purificação e expansão *in vitro* de células autólogas. Portanto, os ensaios em CMI são relevantes, pelo uso de uma gama mais diversificada de tipos de células, incluindo subpopulações purificadas e expandidas em cultura de BMMNCs (como MSCs) e a introdução de células de segunda geração. Além disso, as lições aprendidas com grandes ensaios clínicos de produtos farmacêuticos para IC encorajaram a ampliação dos pontos finais substitutos avaliados para incluir função e anatomia cardíacas, qualidade de vida e capacidade funcional⁹².

A aplicação clínica da terapia celular para DCV começou no cenário da CMI em 2001, com o transplante de mioblastos esqueléticos em miocárdio danificado no momento do enxerto de revascularização da artéria coronária⁹³. Apesar do entusiasmo inicial por essas células e sua suposta capacidade de enxertar e funcionar dentro do miocárdio doente, elas foram abandonadas devido ao aumento de taquiarritmias ventriculares e à falta de eficácia⁹⁴. Essas células não têm expressão de junção comunicante após a diferenciação, impedindo assim o acoplamento elétrico aos cardiomiócitos residentes e aumentando a propensão a arritmias⁹⁵.

3.4 Cardiomiopatia dilatada não isquêmica

Cardiomiopatia dilatada não isquêmica (CMDNI) é uma síndrome grave e progressiva que demanda urgentemente tratamentos alternativos. Embora menos prevalente em relação à CMI, a CMDNI atualmente é o principal diagnóstico entre receptores de transplante cardíaco adulto⁹⁶. Em contraste à CMI, a CMDNI é caracterizada por um componente imunológico significativo, uma menor carga de cicatriz e uma maior proporção de miocárdio viável disfuncional (MVD), que é um alvo terapêutico potencial para terapias baseadas em células. Usando ressonância magnética cardíaca para medir a extensão da cicatriz e MVD, Bello et al⁹⁶ descobriram que a

quantidade de MVD é um preditor independente de melhorias na FEVE, pontuação de movimento da parede e índice de volume sistólico final do ventrículo esquerdo (LVESVI). Como a terapia com células-tronco e progenitoras funciona, pelo menos em parte, devido à sinalização imunomoduladora, a reversão da disfunção miocárdica é uma meta mais atingível do que a substituição da cicatriz, tornando a CMDNI em principal condição para a aplicação de terapias baseadas em células.

A aplicação clínica de terapias baseadas em células para CMDNI certamente está em um estágio inicial de desenvolvimento em comparação com IMA e CMI. Porém, a quantidade de ensaios que avaliam células-tronco nessas populações tem aumentado rapidamente, obtendo resultados promissores. BMMNCs foram as primeiras células testadas nessa população, com os ensaios Transplantation of Progenitor Cells and Recovery of Left Ventricular Function in Patients With Non Ischemic Dilative (TOPCARE-DCM)⁹⁸, Autologous Bone Marrow Cells in Dilated Cardiomyopathy (ABCD)⁹⁹ e MiHeart¹⁰⁰, produzindo resultados conflitantes.

Os ensaios de tratamento com células CD34+ observaram melhorias mais consistentes na FEVE^{101,102}. No entanto, a patogênese da CMDNI nesses ensaios variou amplamente, com alguns deles incluindo apenas aqueles com patogêneses idiopáticas^{99,103} e outros, principalmente, pacientes com CMDNI viral¹⁰² ou induzida por Chagas¹⁰⁴. Independentemente da patogênese, uma meta-análise de ensaios clínicos randomizados de terapia baseada em células em cardiomiopatia dilatada (CMD) descobriu que a terapia celular derivada da medula óssea melhorou a FEVE em um ano em 3,53%, mas não alterou significativamente os volumes das câmaras ou a capacidade funcional do paciente¹⁰⁵.

Ao contrário da CMI – na qual a terapia baseada em células normalmente registra apenas melhorias modestas na FEVE e mudanças mais marcantes na remodelação reversa –, o maior impacto na FEVE visto em ensaios de CMDNI pode ser resultado de MVD mais abundante. Em ambas as cardiomiopatias, a inflamação desempenha um papel importante na formação e manutenção de MVD, portanto, células-tronco com maiores efeitos anti-inflamatórios, como MSCs, podem ser mais benéficas para essa população, conforme sugerido por 2 ensaios usando MSCs que relataram melhorias marcantes na FEVE^{103,106}.

O estudo Percutaneous Stem Cells Injection Delivery Effects on Neomyogenesis in Dilated Cardiomyopathy (POSEIDON-DCM)¹⁰³ é único entre os estudos para CMDNI, pois comparou o efeito terapêutico de BMMSCs alogênicas e autólogas. Trinta e sete pacientes com CMDNI idiopática foram alocados aleatoriamente 1:1 para receber TESI de MSCs alogênicas ou autólogas. Aos 12 meses, a FEVE melhorou de 27% para 35% no grupo alogênico, mas não melhorou significativamente no grupo autólogo. Essa melhora marcante na FEVE não foi acompanhada por reduções significativas nos volumes do VE, sugerindo que a remodelação reversa não é o principal meio de melhora funcional cardíaca nesse caso.

Importante ressaltar que o tratamento com MSC levou a declínios substanciais e sustentados nos níveis de TNF- α , que foram reduzidos em maior extensão pela terapia alogênica do que pela autóloga. Além disso, o 6MWD no grupo alogênico melhorou significativamente mais do que no grupo autólogo, e a taxa de hospitalização por todas as causas e a incidência de eventos cardíacos adversos relevantes foram significativamente menores no grupo alogênico. Este estudo confirma a baixa imunogenicidade de MSCs alogênicos e apoia sua superioridade sobre MSCs autólogos, devido, provavelmente, à bioatividade reduzida entre células autólogas e ao envelhecimento e comorbidades. Embora esses resultados sejam positivos, o estudo é limitado pela falta de um grupo de controle e requer comprovação em um estudo maior¹⁰³.

No estudo piloto de Butler et al¹⁰⁷, BMMSCs foram isoladas de doadores saudáveis e cultivadas em condições hipóxicas, o que melhora sua capacidade migratória e secretora. Elas foram entregues a 22 pacientes com CMDNI. Considerando-se que a inflamação é um dos principais impulsionadores do agravamento da IC e resulta em níveis sistêmicos elevados de marcadores inflamatórios, incluindo TNF- α ¹⁰⁸, os autores levantaram a hipótese de que a administração intravenosa produziria benefícios cardíacos para pacientes com CMI. Embora nenhuma melhora na anatomia ou função do VE tenha sido observada, as pontuações de 6MWD e QoL melhoraram significativamente em resposta ao tratamento, mesmo com o pequeno tamanho da amostra. Este estudo também observou mudanças na porcentagem de células imunes, semelhantes aos ensaios POSEIDON-DCM¹⁰³ e TRIDENT¹⁰⁹ e reduções no TNF- α sistêmico em resposta ao tratamento celular.

4. DESAFIOS ATUAIS E DIREÇÕES FUTURAS

Em relação ao futuro das terapias celulares para doenças cardíacas, isso certamente depende dos resultados de ensaios clínicos usando cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes (PSCs). Mesmo com essas células, as barreiras a serem superadas não são simples. A primeira é a rejeição imunológica, e para isso estão sendo organizados biobancos nacionais de células-tronco pluripotentes induzidas (iPS) homozigotas (triplas ou quádruplas). Embora isso possa não impedir a rejeição imunológica completamente, é capaz de reduzir a necessidade de supressão imunológica. Também há grupos trabalhando na produção uma linhagem celular iPS universal por meio da exclusão genética das principais moléculas HLA¹¹⁰.

O segundo obstáculo que essas terapias enfrentam é o custo, sendo a disponibilidade de uma célula iPS universal capaz de reduzi-lo de forma significativa. A próxima barreira é o enxerto e a sobrevivência das células injetadas. Foi demonstrado que cardiomiócitos derivados de células PS humanas e de macaco injetadas em corações de primatas não humanos sobreviveram por pelo menos três meses, mas as células enxertadas não apresentaram um fenótipo de cardiomiócito maduro e, embora acopladas ao

miocárdio nativo, conforme demonstrado pela propagação de ondas de cálcio entre o miocárdio doador e o hospedeiro, os animais apresentaram arritmias transitórias após o transplante de células de cardiomiócitos embrionários humanos ou derivados de iPS de macaco^{111,112}.

O fenótipo imaturo dos cardiomiócitos injetados foi sugerido como a possível causa das arritmias e grande esforço foi feito para derivar cardiomiócitos com um fenótipo maduro^{113,114}. Alternativas como cultura de longo prazo, engenharia de tecidos tridimensional, carga mecânica, estimulação elétrica, modulação da rigidez do substrato e tratamento com fatores neuro-hormonais foram usadas para obter um fenótipo mais maduro¹¹³. Além disso, o transplante de remendos de andaimes artificiais ou naturais contendo as células está sendo testado atualmente, assim como a injeção de esferoides de cardiomiócitos derivados de iPS¹¹⁵. Mas todas essas alternativas só serão úteis se as células injetadas atuarem substituindo os cardiomiócitos perdidos por lesão, ou seja, se o mecanismo de ação da terapia celular proposta for a substituição celular¹¹³⁻¹¹⁵.

Grupos distintos também propuseram o uso de vesículas extracelulares (EVs) de progenitores de cardiomiócitos derivados de PSCs¹¹⁶ ou de cardiomiócitos projetados em um patch de hidrogel¹¹⁷ como uma alternativa aos cardiomiócitos derivados de PSCs, em modelos pré-clínicos de doença cardíaca isquêmica. O uso dessas terapias acelulares oferece muitas vantagens sobre as celulares, como disponibilidade pronta para uso, escala de fabricação, custo e evasão imunológica^{116,117}.

No entanto, o uso e o sucesso das terapias acelulares dependem, em última análise, do mecanismo de ação das terapias celulares. A esse respeito, recentemente foi realizado um experimento que injetou cardiomiócitos derivados de PSC, contendo um gene de troponina reguladora desativado. Os cardiomiócitos injetados foram incapazes de contribuir com unidades de contração adicionais em corações de primatas não humanos lesionados. Porém, os cardiomiócitos não contráteis apresentaram o mesmo efeito na melhora da função cardíaca que os do tipo selvagem, sugerindo assim um mecanismo parácrino de ação das células injetadas ou de suas vesículas extracelulares. Terapias combinadas, usando diferentes tipos de células derivadas de PSC ou de suas vesículas extracelulares, também foram examinadas. Em corações suínos, grandes manchas de fibrina contendo músculo cardíaco, músculo liso e células endoteliais derivadas de PSC humana melhoraram a função cardíaca e o tamanho da cicatriz avaliados por ressonância magnética¹¹⁸.

Lou et al¹¹⁸ relataram que adesivos contendo todos os quatro tipos de células presentes no coração – cardiomiócitos, células endoteliais, células musculares lisas e fibroblastos derivados de PSC humana – são mais eficazes na restauração da função cardíaca e na redução do tamanho da cicatriz em corações de camundongos infartados do que adesivos contendo menos tipos de células. Exossomos derivados de cardiomiócitos, células

musculares lisas e células endoteliais geradas de PSC humana mostraram-se igualmente eficazes à terapia combinada usando os três tipos de células em corações suínos infartados¹¹⁹.

5. ALÉM DAS TERAPIAS CELULARES

Outros produtos medicinais de terapia avançada estão sendo desenvolvidos para o tratamento de doenças cardíacas isquêmicas e não isquêmicas. Eles envolvem alterações genéticas de células residentes usando terapias genéticas. Uma abordagem promissora para doenças do coração que levam à substituição de cardiomiócitos por tecido cicatricial é a reprogramação direta de fibroblastos em cardiomiócitos tanto *in vitro* quanto *in vivo*, conforme proposto pela primeira vez pelo grupo de Srivastava^{120,121}.

Para converter fibroblastos cardíacos ou dérmicos em cardiomiócitos, foram usados três fatores de transcrição (Gata4, Mef2c e Tbx5), mostrando que a administração retroviral dos fatores diretamente no coração do camundongo lesionado poderia reduzir a área da cicatriz e melhorar a função cardíaca¹²¹. Usando uma abordagem baseada na regulação de fatores do ciclo celular, o grupo mostrou que a superexpressão da cinase dependente de ciclina 1 (CDK1), CDK4, ciclina B1 e ciclina D1 induziu eficientemente a divisão celular em cardiomiócitos pós-mitóticos de camundongos, ratos e humanos. Além disso, 15% a 20% dos cardiomiócitos adultos que expressam os quatro fatores passaram por divisão celular estável, com melhora significativa na função cardíaca após infarto agudo ou subagudo do miocárdio¹²².

O advento da tecnologia CRISPR (Clustered Mostly Interspaced Short Palindromic Repeats)-Cas permitiu reescrever o código genético e, assim, tratar várias doenças corrigindo ou removendo mutações prejudiciais ou introduzindo alterações protetoras no genoma do paciente. Todas as doenças cardiovasculares monogênicas poderiam ser potencialmente curadas por essas técnicas. Elas incluem um amplo espectro de doenças hereditárias que abrangem cardiomiopatias dilatadas e hipertróficas, síndromes de QT longo e Marfan, hipertensão pulmonar familiar e distrofias musculares. Melhoras na entrega dos agentes terapêuticos ao coração ou vasculatura e na eficiência do processo de edição farão com que essas terapias façam parte do cenário clínico¹²³⁻¹²⁵.

Na verdade, um ensaio clínico CRISPR-Cas9, interrompendo a transtirretina (TTR) no fígado, foi conduzido para tratar a amiloidose TTR, uma doença fatal que afeta os nervos e o coração, devido ao acúmulo de fibrilas amiloides da proteína TTR mal dobrada. Uma única injeção intravenosa do agente terapêutico reduziu os níveis de TTR em 87% nos pacientes tratados com altas doses, fornecendo prova de conceito de que a interrupção direcionada de genes *in vivo* em humanos é viável¹²⁶.

Outros exemplos de interrupção genética para atingir efeitos terapêuticos envolvem a ablação genética de enzimas relacionadas

ao metabolismo do colesterol de lipoproteína de baixa densidade, como PCSK9, por um editor de base CRISPR. Uma pequena porcentagem da população tem baixos níveis de colesterol devido à perda de mutações de função nesta enzima e isso não parece causar nenhum problema relacionado à saúde, tornando esta terapia de dose única uma alternativa ao uso contínuo de estatinas, siRNA ou anticorpos para prevenir o colesterol alto, especialmente na hipercolesterolemia familiar¹²⁷.

A distrofia muscular de Duchene (DMD), uma doença recessiva ligada ao cromossomo X que atrofia muscular e afeta o coração, também pode se beneficiar de técnicas de interrupção genética. Embora a interrupção genética possa ser possível no coração adulto, a correção de mutações pontuais pela tecnologia CRISPR-Cas envolve reparo direcionado por homologia (HDR) para permitir que um modelo de reparo corrija o gene mutado. Porém, o HDR requer que as células estejam na fase S ou G2 do ciclo celular e, como os cardiomiócitos são células pós-mitóticas, ele não funciona. Nesses casos, editores de base, que não causam quebras de fita dupla no DNA, podem ser usados para reescrever o genoma. Por exemplo, se uma mutação pontual que causa DMD for conhecida, editores de base podem ser usados para corrigir a mutação única no gene^{128,129}.

Outras doenças cardíacas monogênicas também foram tratadas usando edição de genoma. A mutação patogênica da síndrome de Marfan no gene *FBN1* foi corrigida pela edição de base em embriões humanos com alta eficiência e sem efeitos fora do alvo detectados¹³⁰. A cardiomiopatia hipertrófica também foi corrigida em embriões de camundongos e cardiomiócitos humanos usando editores de base sem edição fora do alvo, corrigindo mutações nos genes *MYH6* e *MYH7* (cadeia pesada de miosina)^{131,132}. Outro uso das ferramentas CRISPR tem sido o uso da enzima Cas9 morta (uma enzima não funcional) acoplada a repressores de transcrição ou ativadores de transcrição para diminuir ou aumentar a expressão gênica. Em cardiomiócitos derivados de iPS humanos que concentram uma mutação no gene *CALM2* da calmodulina, que leva ao prolongamento do intervalo QT, a repressão de *CALM2* usando um dCas-KRAB restaurou a duração do potencial de ação e a inativação cálcio-calmodulina da corrente de cálcio do tipo L¹³³.

REFERÊNCIAS

1. Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest*. 2001;107(11):1395–402.
2. Deb A, Wang S, Skelding KA, Miller D, Simper D, Caplice NM. Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart: a study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients. *Circulation*. 2003;107(9):1247–9.

3. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest*. 1999;103(5):697–705.
4. Rurai C, Roggia S, Bosatra D. Separation and quantitative evaluation of nucleotides in pharmaceutical specialties by means of high-pressure liquid chromatography. *Farmaco Prat*. 1975;30(1):47–58.
5. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(18):10344–9.
6. Dimmeler S, Zeiher AM. Cell therapy of acute myocardial infarction: open questions. *Cardiology*. 2009;113(3):155–60.
7. Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*. 2001;98(9):2615–25.
8. Condorelli G, Borello U, De Angelis L, Latronico M, Sirabella D, Coletta M, et al. Cardiomyocytes induce endothelial cells to trans-differentiate into cardiac muscle: implications for myocardium regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(19):10733–8.
9. Chen SL, Fang WW, Ye F, Liu YH, Qian J, Shan SJ, et al. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 2004;94(1):92–5.
10. Bartunek J, Vanderheyden M, Vandekerckhove B, Mansour S, De Bruyne B, De Bondt P, et al. Intracoronary injection of CD133-positive enriched bone marrow progenitor cells promotes cardiac recovery after recent myocardial infarction: feasibility and safety. *Circulation*. 2005;112(9 Suppl):1178–83.
11. Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, Steffens J, Lippolt P, Fichtner S, et al. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST trial. *Circulation*. 2006;113(10):1287–94.
12. Choudhury T, Mozid A, Hamshire S, Yeo C, Pellaton C, Arnous S, et al. An exploratory randomized control study of combination cytokine and adult autologous bone marrow progenitor cell administration in patients with ischaemic cardiomyopathy: the REGENERATE-IHD clinical trial. *Eur J Heart Fail*. 2017;19(1):138–47.

13. Pokushalov E, Romanov A, Chernyavsky A, Larionov P, Terekhov I, Artyomenko S, et al. Efficiency of intramyocardial injections of autologous bone marrow mononuclear cells in patients with ischemic heart failure: a randomized study. *J Cardiovasc Transl Res.* 2010;3(2):160–8.
14. Lu M, Liu S, Zheng Z, Yin G, Song L, Chen H, et al. A pilot trial of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation through grafting artery: a sub-study focused on segmental left ventricular function recovery and scar reduction. *Int J Cardiol.* 2013;168(3):2221–7.
15. Traverse JH, Henry TD, Pepine CJ, Willerson JT, Chugh A, Yang PC, et al. TIME trial: effect of timing of stem cell delivery following ST-elevation myocardial infarction on the recovery of global and regional left ventricular function: final 2-year analysis. *Circ Res.* 2018;122(3):479–88.
16. Santoso T, Siu CW, Irawan C, Chan WS, Alwi I, Yiu KH, et al. Endomyocardial implantation of autologous bone marrow mononuclear cells in advanced ischemic heart failure: a randomized placebo-controlled trial (END-HF). *J Cardiovasc Transl Res.* 2014;7(6):545–52.
17. Martino H, Brofman P, Greco O, Bueno R, Bodanese L, Clausell N, et al. Multicentre, randomized, double-blind trial of intracoronary autologous mononuclear bone marrow cell injection in non-ischaemic dilated cardiomyopathy (the dilated cardiomyopathy arm of the MiHeart study). *Eur Heart J.* 2015;36(42):2898–904.
18. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature.* 2004;428(6983):664–8.
19. Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature.* 2004;428(6983):668–73.
20. Nygren JM, Jovinge S, Breitbach M, Sawen P, Roll W, Hescheler J, et al. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med.* 2004;10(5):494–501.
21. Gojo S, Ueda T, Morioka C, Shintani Y, Shibuya M, Obokata H, et al. In vivo cardiovascular differentiation of human fetal aortic smooth muscle-derived progenitor cells. *Int J Cardiol.* 2008;129(3):437–48.
22. Amado LC, Saliaris AP, Schuleri KH, St John M, Xie JS, Cattaneo S, et al. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem

cells after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(32):11474–9.

23. Menasché P. Stem cell therapy for chronic heart failure: lessons from a 15-year experience. *C R Biol*. 2011;334(3):200–5.

24. Sanganalmath SK, Bolli R. Cell therapy for heart failure: a comprehensive overview of experimental and clinical studies, current challenges, and future directions. *Circ Res*. 2013;113(6):810–34.

25. Hare JM, Fishman JE, Gerstenblith G, DiFede Velazquez DL, Zambrano JP, Suncion VY, et al. Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial. *JAMA*. 2012;308(22):2369–79.

26. Ranganath SH, Levy O, Inamdar MS, Karp JM. Harnessing the mesenchymal stem cell secretome for the treatment of cardiovascular disease. *Cell Stem Cell*. 2012;10(3):244–58.

27. Yeh ET, Zhang S, Wu HD, Körbling M, Willerson JT, Estrov Z. Transdifferentiation of human peripheral blood CD34+ enriched cell population into cardiomyocytes, endothelial cells and smooth muscle cells in vivo. *Circulation*. 2003;108(17):2070–3.

28. Strauer BE, Steinhoff G. 10 years of intracoronary and intramyocardial bone marrow stem cell therapy of the heart: from the methodological origin to clinical practice. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58(11):1095–104.

29. Tang XL, Rokosh G, Sanganalmath SK, Tokita Y, Stowers H, Hunt G, et al. Effects of bone marrow-derived c-kit+ cells on left ventricular function and remodeling after myocardial infarction in rats. *Circ Res*. 2010;107(5):1192–9.

30. Makkar RR, Smith RR, Cheng K, Malliaras K, Thomson LE, Berman D, et al. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet*. 2012;379(9819):895–904.

31. Bolli R, Chugh AR, D'Amario D, Loughran JH, Stoddard MF, Ikram S, et al. Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet*. 2011;378(9806):1847–57.

32. Malliaras K, Makkar RR, Smith RR, Cheng K, Wu E, Bonow RO, et al. Intracoronary cardiosphere-derived cells for advanced ischemic heart failure:

the ALLSTAR phase II randomized trial. *J Am Coll Cardiol.* 2018;71(19):2314–26.

33. Florea V, Rieger AC, DiFede DL, El-Khorazaty J, Natsumeda M, Banerjee MN, et al. Dose comparison study of allogeneic mesenchymal stem cells in patients with ischemic cardiomyopathy (TRIDENT). *Circ Res.* 2017;121(11):1279–90.

34. Vrtovec B, Poglajen G, Lezaic L, Sever M, Domanovic D, Cernelc P, et al. Effects of intracoronary stem cell transplantation in patients with dilated cardiomyopathy. *J Card Fail.* 2011;17(4):272–81.

35. Madonna R, Taylor DA, Geng YJ, De Caterina R. Shedding light on the effects of aging on stem cell function and cardiovascular disease. *Int J Cardiol.* 2014;174(3):773–8.

36. Khan M, Mohsin S, Avitabile D, Abdul-Ghani R, Zisa D, Eliopoulos N, et al. Stem cell therapy and myocardial repair: a critical analysis of the literature. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2011;6(3):282–97.

37. Suncion VY, Gherlin E, Fishman JE, DiFede Velazquez DL, Karantalis V, Mushtaq M, et al. Does transendocardial injection of mesenchymal stem cells improve myocardial function locally or globally? An analysis from the POSEIDON randomized trial. *Circ Res.* 2014;114(8):1292–301.

38. Crisostomo PR, Wang M, Wairiuko GM, Morrell ED, Terrell AM, Ray M, et al. High passage number of stem cells adversely affects stem cell activation and myocardial protection. *Shock.* 2006;26(6):575–80.

39. Assmus B, Schächinger V, Teupe C, Britten M, Fischer-Rasokat U, Lehmann R, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation.* 2002;106(24):3009–17.

40. Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T, et al. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2006;355(12):1199–209.

41. Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P, Jones TR, Reedy MC, Hutcheson KA, et al. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med.* 1998;4(8):929–33.

42. Chiu RC, Zibaitis A, Kao RL. Cellular cardiomyoplasty: myocardial regeneration with satellite cell implantation. *Ann Thorac Surg.* 1995;60(1):12–8.

43. Scorsin M, Hagege A, Vilquin JT, Fiszman M, Marotte F, Samuel JL, et al. Comparison of the effects of fetal cardiomyocyte and skeletal myoblast transplantation on postinfarction left ventricular function. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2000;119(6):1169–75.
44. Hagege AA, Marolleau JP, Vilquin JT, Alheritiere A, Peyrard S, Duboc D, et al. Skeletal myoblast transplantation in ischemic heart failure: long-term follow-up of the first phase I cohort of patients. *Circulation.* 2006;114(1 Suppl):1108–13.
45. Herreros J, Prosper F, Perez A, Gavira JJ, Garcia-Velloso MJ, Barba J, et al. Autologous intramyocardial injection of cultured skeletal muscle-derived stem cells in patients with non-acute myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2003;24(22):2012–20.
46. Pagani FD, DerSimonian H, Zawadzka A, Wetzel K, Edge AS, Jacoby DB, et al. Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischemia-damaged myocardium in humans. Histological analysis of cell survival and differentiation. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41(5):879–88.
47. Siminiak T, Kalawski R, Fiszer D, Jerzykowska O, Rzezniczak J, Rozwadowska N, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for the treatment of postinfarction myocardial injury: phase I clinical study with 12 months of follow-up. *Am Heart J.* 2004;148(3):531–7.
48. Dib N, Michler RE, Pagani FD, Wright S, Kereiakes DJ, Lengerich R, et al. Safety and feasibility of autologous myoblast transplantation in patients with ischemic cardiomyopathy: four-year follow-up. *Circulation.* 2005;112(12):1748–55.
49. Ahmed MU, Cheng L, Dietrich S. Establishment of the epaxial-hypaxial boundary in the avian myotome. *Dev Dyn.* 2006;235(7):1884–94.
50. Menasche P, Alfieri O, Janssens S, McKenna W, Reichenspurner H, Trinquart L, et al. The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation.* 2008;117(9):1189–200.
51. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998;282(5391):1145–7.
52. Nussbaum J, Minami E, Laflamme MA, Virag JA, Ware CB, Masino A, et al. Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the

heart: teratoma formation and immune response. *FASEB J.* 2007;21(7):1345–57.

53. Maltsev VA, Rohwedel J, Hescheler J, Wobus AM. Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusodal, atrial and ventricular cell types. *Mech Dev.* 1993;44(1):41–50.

54. Xu C, Police S, Rao N, Carpenter MK. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Circ Res.* 2002;91(6):501–8.

55. Gao L, Gregorich ZR, Zhu W, Mattapally S, Oduk Y, Lou X, et al. Large cardiac muscle patches engineered from human induced-pluripotent stem cell-derived cardiac cells improve recovery from myocardial infarction in swine. *Circulation.* 2018;137(16):1712–30.

56. Ye L, Chang YH, Xiong Q, Zhang P, Zhang L, Somasundaram P, et al. Cardiac repair in a porcine model of acute myocardial infarction with human induced pluripotent stem cell-derived cardiovascular cells. *Cell Stem Cell.* 2014;15(6):750–61.

57. Fernandes S, Naumova AV, Zhu WZ, Laflamme MA, Gold J, Murry CE. Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes engraft but do not alter cardiac remodeling after chronic infarction in rats. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;49(6):941–9.

58. Shiba Y, Filice D, Fernandes S, Minami E, Dupras SK, Biber BV, et al. Electrical integration of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes in a guinea pig chronic infarct model. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2014;19(4):368–81.

59. Kawamura M, Miyagawa S, Miki K, Saito A, Fukushima S, Higuchi T, et al. Feasibility, safety, and therapeutic efficacy of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte sheets in a porcine ischemic cardiomyopathy model. *Circulation.* 2012;126(11 Suppl 1):S29–37.

60. Ishida M, Miyagawa S, Saito A, Fukushima S, Harada A, Ito E, et al. Transplantation of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes is superior to somatic stem cell therapy for restoring cardiac function and oxygen consumption in a porcine model of myocardial infarction. *Transplantation.* 2019;103(2):291–8.

61. Liu YW, Chen B, Yang X, Fugate JA, Kalucki FA, Futakuchi-Tsuchida A, et al. Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes restore function in infarcted hearts of non-human primates. *Nat Biotechnol.* 2018;36(7):597–605.

62. Chong JJ, Yang X, Don CW, Minami E, Liu YW, Weyers JJ, et al. Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. *Nature*. 2014;510(7504):273–7.
63. Menasche P, Vanneau V, Fabreguettes JR, Bel A, Tosca L, Garcia S, et al. Towards a clinical use of human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors: a translational experience. *Eur Heart J*. 2015;36(12):743–50.
64. Gerczuk PZ, Kloner RA. An update on cardioprotection: a review of the latest adjunctive therapies to limit myocardial infarction size in clinical trials. *J Am Coll Cardiol*. 2012;59:969–978.
65. Assmus B, Schächinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Döbert N, Grünwald 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.
66. Schächinger V, Assmus B, Britten MB, Honold J, Lehmann R, Teupe C, Abolmaali ND, Vogl TJ, Hofmann WK, Martin H, Dimmeler S, Zeiher AM. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCAREAMI trial. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44:1690–1699.
67. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, Fichtner S, Korte T, Hornig B, Messinger D, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet*. 2004;364:141–148.
68. Janssens S, Dubois C, Bogaert J, et al. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet*. 2006;367:113– 121.
69. Huikuri HV, Kervinen K, Niemelä M, Ylitalo K, Säily M, Koistinen P, Savolainen ER, Ukkonen H, Pietilä M, Airaksinen JK, Knuuti J, Mäki-Kallio TH; FINCELL Investigators. Effects of intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells on left ventricular function, arrhythmia risk profile, and restenosis after thrombolytic therapy of acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2008;29:2723–2732.
70. Schächinger V, Erbs S, Elsässer A, Haberbosch W, Hambrecht R, Hölschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Süselbeck T, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM; REPAIR-AMI Investigators. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2006;355:1210–1221.

71. Schächinger V, Erbs S, Elsässer A, et al; REPAIR-AMI Investigators. Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial. *Eur Heart J*. 2006;27:2775–2783.
72. Assmus B, Leistner DM, Schächinger V, et al; REPAIR-AMI Study Group. Long-term clinical outcome after intracoronary application of bone marrow-derived mononuclear cells for acute myocardial infarction: migratory capacity of administered cells determines event-free survival. *Eur Heart J*. 2014;35:1275–1283.
73. Traverse JH, Henry TD, Pepine CJ, et al; Cardiovascular Cell Therapy Research Network (CCTRN). Effect of the use and timing of bone marrow mononuclear cell delivery on left ventricular function after acute myocardial infarction: the TIME randomized trial. *JAMA*. 2012;308:2380–2389.
74. Traverse JH, Henry TD, Pepine CJ, et al. TIME trial: effect of timing of stem cell delivery following ST-elevation myocardial infarction on the recovery of global and regional left ventricular function: final 2-year analysis. *Circ Res*. 2018;122:479–488.
75. Sürder D, Manka R, Moccetti T, et al. Effect of bone marrow-derived mononuclear cell treatment, early or late after acute myocardial infarction: twelve months CMR and long-term clinical results. *Circ Res*. 2016;119:481–490.
76. Wollert KC, Meyer GP, Müller-Ehmsen J, et al. Intracoronary autologous bone marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST-2 randomised placebo-controlled clinical trial. *Eur Heart J*. 2017;38:2936–2943.
77. Nicolau JC, Furtado RHM, Silva SA, Rochitte CE, Rassi A Jr, Moraes JBMC Jr, Quintella E, Costantini CR, Korman APM, Mattos MA, Castello HJ Jr, Caixeta A, Dohmann HFR, de Carvalho ACC; MiHeart/AMI Investigators. Stem-cell therapy in ST-segment elevation myocardial infarction with reduced ejection fraction: a multicenter, double-blind randomized trial. *Clin Cardiol*. 2018;41:392–399.
78. Gyöngyösi M, Wojakowski W, Lemarchand P, et al; ACCRUE Investigators. Meta-Analysis of Cell-based CaRdiac stUdiEs (ACCRUE) in patients with acute myocardial infarction based on individual patient data. *Circ Res*. 2015;116:1346–1360.

79. Chong MS, Ng WK, Chan JK. Concise review: endothelial progenitor cells in regenerative medicine: applications and challenges. *Stem Cells Transl Med.* 2016;5:530–538.
80. Quyyumi AA, Vasquez A, Kereiakes DJ, et al. PreSERVE-AMI: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial of intracoronary administration of autologous CD34+ cells in patients with left ventricular dysfunction post STEMI. *Circ Res.* 2017;120:324–331.
81. Seeger FH, Tonn T, Krzossok N, Zeiher AM, Dimmeler S. Cell isolation procedures matter: a comparison of different isolation protocols of bone marrow mononuclear cells used for cell therapy in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2007;28:766–772.
82. Bellenger NG, Burgess MI, Ray SG, Lahiri A, Coats AJ, Cleland JG, Pennell DJ. Comparison of left ventricular ejection fraction and volumes in heart failure by echocardiography, radionuclide ventriculography and cardiovascular magnetic resonance; are they interchangeable? *Eur Heart J.* 2000;21:1387–1396.
83. Jeevanantham V, Butler M, Saad A, Abdel-Latif A, Zuba-Surma EK, Dawn B. Adult bone marrow cell therapy improves survival and induces long-term improvement in cardiac parameters: a systematic review and meta-analysis. *Circulation.* 2012;126:551–568.
84. Traverse JH, Henry TD, Moye' LA. Is the measurement of left ventricular ejection fraction the proper end point for cell therapy trials? An analysis of the effect of bone marrow mononuclear stem cell administration on left ventricular ejection fraction after ST-segment elevation myocardial infarction when evaluated by cardiac magnetic resonance imaging. *Am Heart J.* 2011;162:671–677.
85. Mathur A, Arnold R, Assmus B, et al. The effect of intracoronary infusion of bone marrow-derived mononuclear cells on all-cause mortality in acute myocardial infarction: rationale and design of the BAMi trial. *Eur J Heart Fail.* 2017;19:1545–1550.
86. Hare JM, Traverse JH, Henry TD, Dib N, Strumpf RK, Schulman SP, Gerstenblith G, DeMaria AN, Denktas AE, Gammon RS, Hermiller JB Jr, Reisman MA, Schaer GL, Sherman W. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2009;54:2277–2286.

87. Gao LR, Chen Y, Zhang NK, et al. Intracoronary infusion of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in acute myocardial infarction: double-blind, randomized controlled trial. *BMC Med.* 2015;13:162.
88. Povsic TJ, Henry TD, Traverse JH, et al; RENEW Investigators. The RENEW trial: efficacy and safety of intramyocardial autologous CD34(+) cell administration in patients with refractory angina. *JACC Cardiovasc Interv.* 2016;9:1576–1585.
89. Losordo DW, Henry TD, Davidson C, et al; ACT34-CMI Investigators. Intramyocardial, autologous CD34+ cell therapy for refractory angina. *Circ Res.* 2011;109:428–436.
90. Henry TD, Losordo DW, Traverse JH, et al. Autologous CD34+ cell therapy improves exercise capacity, angina frequency and reduces mortality in no-option refractory angina: a patient-level pooled analysis of randomized double-blinded trials. *Eur Heart J.* 2018;39:2208–2216.
91. Khan AR, Farid TA, Pathan A, Tripathi A, Ghafghazi S, Wysoczynski M, Bolli R. Impact of cell therapy on myocardial perfusion and cardiovascular outcomes in patients with angina refractory to medical therapy: a systematic review and meta-analysis. *Circ Res.* 2016;118:984–993.
92. Solomon SD, Skali H, Anavekar NS, Bourgoun M, Barvik S, Ghali JK, Warnica JW, Khrakovskaya M, Arnold JM, Schwartz Y, Velazquez EJ, Califf RM, McMurray JV, Pfeffer MA. Changes in ventricular size and function in patients treated with valsartan, captopril, or both after myocardial infarction. *Circulation.* 2005;111:3411–3419.
93. Menasché P, Hagège AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, Schwartz K, Vilquin JT, Marolleau JP. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet.* 2001;357:279–280.
94. Menasché P, Alfieri O, Janssens S, McKenna W, Reichenspurner H, Trinquart L, Vilquin JT, Marolleau JP, Seymour B, Larghero J, Lake S, Chatellier G, Solomon S, Desnos M, Hagège AA. The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation.* 2008;117:1189–1200.
95. Reinecke H, MacDonald GH, Hauschka SD, Murry CE. Electromechanical coupling between skeletal and cardiac muscle. Implications for infarct repair. *J Cell Biol.* 2000;149:731–740.

96. Lund LH, Khush KK, Cherikh WS, Goldfarb S, Kucheryavaya AY, Levvey BJ, Meiser B, Rossano JW, Chambers DC, Yusen RD, Stehlik J; International Society for Heart and Lung Transplantation. The registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: thirty-fourth adult heart transplantation report-2017; focus theme: allograft ischemic time. *J Heart Lung Transplant*. 2017;36:1037–1046.
97. Bello D, Shah DJ, Farah GM, Di Luzio S, Parker M, Johnson MR, Cotts WG, Klocke FJ, Bonow RO, Judd RM, Gheorghiade M, Kim RJ. Gadolinium cardiovascular magnetic resonance predicts reversible myocardial dysfunction and remodeling in patients with heart failure undergoing beta-blocker therapy. *Circulation*. 2003;108:1945–1953.
98. Fischer-Rasokat U, Assmus B, Seeger FH, Honold J, Leistner D, Fichtlscherer S, Schächinger V, Tonn T, Martin H, Dimmeler S, Zeiher AM. A pilot trial to assess potential effects of selective intracoronary bone marrow-derived progenitor cell infusion in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy: final 1-year results of the transplantation of progenitor cells and functional regeneration enhancement pilot trial in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy. *Circ Heart Fail*. 2009;2:417–423.
99. Seth S, Bhargava B, Narang R, Ray R, Mohanty S, Gulati G, Kumar L, Airan B, Venugopal P; AIIMS Stem Cell Study Group. The ABCD (Autologous Bone Marrow Cells in Dilated Cardiomyopathy) trial a long-term follow-up study. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55:1643–1644.
100. Martino H, Brofman P, Greco O, Bueno R, Bodanese L, Clausell N, Maldonado JA, Mill J, Braille D, Moraes J Jr, Silva S, Bozza A, Santos B, Campos de Carvalho A; Dilated Cardiomyopathy Arm of the MiHeart Study Investigators. Multicentre, randomized, double-blind trial of intracoronary autologous mononuclear bone marrow cell injection in non-ischaemic dilated cardiomyopathy (the dilated cardiomyopathy arm of the MiHeart study). *Eur Heart J*. 2015;36:2898–2904.
101. Vrtovec B, Poglajen G, Lezaic L, Sever M, Domanovic D, Cernelc P, Socan A, Schrepfer S, Torre-Amione G, Haddad F, Wu JC. Effects of intracoronary CD34+ stem cell transplantation in nonischemic dilated cardiomyopathy patients: 5-year follow-up. *Circ Res*. 2013;112:165–173.
102. Vrtovec B, Poglajen G, Lezaic L, Sever M, Socan A, Domanovic D, Cernelc P, Torre-Amione G, Haddad F, Wu JC. Comparison of transendocardial and intracoronary CD34+ cell transplantation in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 2013;128:S42–S49.
103. Hare JM, DiFede DL, Rieger AC, et al. Randomized comparison of allogeneic versus autologous mesenchymal stem cells for nonischemic dilated

cardiomyopathy: POSEIDON-DCM Trial. *J Am Coll Cardiol.* 2017;69:526–537.

104. Bocchi EA, Bacal F, Guimarães G, Mendroni A, Mocelin A, Filho AE, Dorés da Cruz Fd, Resende MC, Chamone D. Granulocyte-colony stimulating factor or granulocyte-colony stimulating factor associated to stem cell intracoronary infusion effects in non ischemic refractory heart failure. *Int J Cardiol.* 2010;138:94–97.

105. Lu Y, Wang Y, Lin M, Zhou J, Wang Z, Jiang M, He B. A systematic review of randomised controlled trials examining the therapeutic effects of adult bone marrow-derived stem cells for non-ischaemic dilated cardiomyopathy. *Stem Cell Res Ther.* 2016;7:186.

106. Xiao W, Guo S, Gao C, Dai G, Gao Y, Li M, Wang X, Hu D. A randomized comparative study on the efficacy of intracoronary infusion of autologous bone marrow mononuclear cells and mesenchymal stem cells in patients with dilated cardiomyopathy. *Int Heart J.* 2017;58:238–244.

107. Butler J, Epstein SE, Greene SJ, Quyyumi AA, Sikora S, Kim RJ, Anderson AS, Wilcox JE, Tankovich NI, Lipinski MJ, Ko YA, Margulies KB, Cole RT, Skopicki HA, Gheorghiade M. Intravenous allogeneic mesenchymal stem cells for nonischemic cardiomyopathy: safety and efficacy results of a phase II-A randomized trial. *Circ Res.* 2017;120:332–340.

108. Kelkar AA, Butler J, Schelbert EB, Greene SJ, Quyyumi AA, Bonow RO, Cohen I, Gheorghiade M, Lipinski MJ, Sun W, Luger D, Epstein SE. Mechanisms contributing to the progression of ischemic and nonischemic dilated cardiomyopathy: possible modulating effects of paracrine activities of stem cells. *J Am Coll Cardiol.* 2015;66:2038–2047.

109. Florea V, Rieger AC, DiFede DL, et al. Dose comparison study of allogeneic mesenchymal stem cells in patients with ischemic cardiomyopathy (The TRIDENT study). *Circ Res.* 2017;121:1279–1290.

110. Deuse T, Tediashvili G, Hu X, et al. Hypoimmune induced pluripotent stem cell-derived cell therapeutics treat cardiovascular and pulmonary diseases in immunocompetent allogeneic mice. *Proc Natl Acad Sci.* 2021;118(28):e2022091118.

111. Chong JJ, Yang X, Don CW, et al. Human embryonic-stem-cell derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. *Nature.* 2014;510(7504):273–277.

112. Rurik JG, Tombácz I, Yadegari A, et al. CAR T cells produced in vivo to treat cardiac injury. *Science.* 2022;375(6576):91–96.

113. Marchiano S, Nakamura K, Reinecke H, et al. Gene editing to prevent ventricular arrhythmias associated with cardiomyocyte cell therapy. *Cell Stem Cell*. 2023;30(4):396–414.e9.
114. Carvalho T. Stem cell–derived heart cells injected into first patient. *Nat Med*. 2023;29(5):1030–1031.
115. Harane NE, Kervadec A, Bellamy V, et al. Acellular therapeutic approach for heart failure: in vitro production of extracellular vesicles from human cardiovascular progenitors. *Eur Heart J*. 2018;39(20):1835–1847.
116. Liu B, Lee BW, Nakanishi K, et al. Cardiac recovery via extended cell-free delivery of extracellular vesicles secreted by cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells. *Nat Biomed Eng*. 2018;2(5):293–303.
117. Gao L, Gregorich ZR, Zhu W, et al. Large cardiac muscle patches engineered from human induced-pluripotent stem cell–derived cardiac cells improve recovery from myocardial infarction in swine. *Circulation*. 2018;137(16):1712–1730.
118. Lou X, Tang Y, Ye L, et al. Cardiac muscle patches containing four types of cardiac cells derived from human pluripotent stem cells improve recovery from cardiac injury in mice. *Cardiovasc Res*. 2023;119(4):1062–1076.
119. Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, et al. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell*. 2010;142(3):375–386.
120. Qian L, Huang Y, Spencer CI, et al. In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature*. 2012;485(7400):593–598.
121. Mohamed TMA, Ang YS, Radzinsky E, et al. Regulation of cell cycle to stimulate adult cardiomyocyte proliferation and cardiac regeneration. *Cell*. 2018;173(1):104–116.e12.
122. Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 2014;346(6213):1258096.
123. Badran AH, Komor AC, Bryson DI, et al. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*. 2017;551(7681):464.
124. Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*. 2019;576:1–9.

125. Gillmore JD, Gane E, Taubel J, et al. CRISPR-Cas9 in vivo gene editing for transthyretin amyloidosis. *N Engl J Med*. 2021;385(18):1721–1722.
126. Musunuru K, Chadwick AC, Mizoguchi T, et al. In vivo CRISPR base editing of PCSK9 durably lowers cholesterol in primates. *Nature*. 2021;593(7859):429–434.
127. Cohen JC, Boerwinkle E, Mosley TH, Hobbs HH. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N Engl J Med*. 2006;354(12):1264–1272.
128. Ryu SM, Koo T, Kim K, et al. Adenine base editing in mouse embryos and an adult mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Nat Biotechnol*. 2018;36(6):536–539.
129. Xu L, Zhang C, Li H, et al. Efficient precise in vivo base editing in adult dystrophic mice. *Nat Commun*. 2021;12(1):3719.
130. Zeng Y, Li J, Li G, et al. Correction of the marfan syndrome pathogenic FBN1 mutation by base editing in human cells and heterozygous embryos. *Mol Ther*. 2018;26(11):2631–2637.
131. Ma S, Jiang W, Liu X, et al. Efficient correction of a hypertrophic cardiomyopathy mutation by ABEmax-NG. *Circ Res*. 2021;129(10):895–908.
132. Chai AC, Cui M, Chemello F, et al. Base editing correction of hypertrophic cardiomyopathy in human cardiomyocytes and humanized mice. *Nat Med*. 2023;29(2):401–411.
133. Limpitikul WB, Dick IE, Tester DJ, et al. A precision medicine approach to the rescue of function on malignant calmodulin no pathic long-QT syndrome. *Circ Res*. 2017;120(1):39–48.