



# PROSPETTIVE DELLA TERAPIA GENICA E DELLA TERAPIA CELLULARE NELLA CARDIOPATIA ISCHEMICA

Massimo Chiariello,\* Antonio Rapacciuolo\*\*

*Nonostante i notevoli progressi realizzati, la malattia aterosclerotica coronarica rappresenta la causa principale di morbilità e mortalità nei paesi industrializzati. I principali problemi con i quali il cardiologo si trova ad interagire sono sia le complicanze in corso di sindromi coronariche acute, sia lo sviluppo di scompenso cardiaco congestizio, conseguenza del rimodellamento miocardico post-infartuale. Lo sviluppo di vettori virali cardiotropici capaci di espressione a lungo termine<sup>1</sup> e l'isolamento di cellule staminali con capacità rigenerative e potenziale angiogenico<sup>2,3</sup> forniscono nuove vie terapeutiche per la protezione ed il salvataggio del muscolo cardiaco dall'ischemia e dallo scompenso. La terapia genica è risultata cardioprotettiva in modelli animali di ischemia-riperfusione<sup>4,5</sup>, ed efficace nell'induzione della risposta angiogenetica<sup>6</sup>. Molteplici dati sono disponibili anche sull'utilizzo di cellule staminali nella rivascolarizzazione e nei fenomeni riparativi dopo infarto miocardico. Ulteriori studi sono necessari prima dell'utilizzo di tali affascinanti ed innovative tecniche nella pratica clinica.*

---

**Parole chiave:** Cardiopatia ischemica, terapia genica, cellule staminali, scompenso cardiaco

---

## **La terapia genica nella protezione del miocardio a rischio**

Lo sviluppo di terapie geniche in corso di infarto miocardico non è possibile con i vettori attualmente a disposizione a causa del tempo che necessariamente deve intercorrere

tra la somministrazione e l'efficace espressione del gene di interesse. Pertanto un gene transfer di geni ad attività trombolitica non è realizzabile mentre è ipotizzabile una terapia genica con geni ad effetto cardioprotettivo a lungo termine (Tabella I).

\* Presidente Società Italiana di Cardiologia, Direttore Cattedra di Cardiologia, Università degli Studi di Napoli Federico II

\*\* Dottore di Ricerca, Cattedra di Cardiologia, Università di Napoli "Federico II"

**Tabella I** (Melo et al 26): Geni bersaglio nella protezione miocardica e nel recupero del danno ischemico

Strategy/Therapeutic Target		Genetic Manipulation	Vector	Application
<b>Protection/prevention</b>				
Antioxidant genes	HO-1, SOD, catalase, GPx	Overexpression	ADV, AAV, LV, $\alpha$ -virus	CAD, ACS, I/R injury
Heat shock proteins	HSP70, HSP90, HSP27	Overexpression	ADV, AAV, LV, $\alpha$ -virus	CAD, ACS, I/R injury
Survival genes	Bcl-2, Akt, HGF	Overexpression	ADV, AAV, LV, $\alpha$ -virus	CAD, ACS, I/R, HF
Inflammatory cytokines, adhesion molecules, and TF	ICAM, VCAM, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B	Inhibition	AS-ODN, Decoy ODN, ADV-AS-ODN, RV-AS-ODN	MI, I/R injury, graft atherosclerosis, transplantation
Proapoptotic genes	Bad, caspase inhibitorp53, Fas ligand	Inhibition	AS-ODN Decoy ODN ADV-AS-ODN	I/R injury, HF
Coronary vessel tone	eNOS, adenosine (P1, P3) receptors	Overexpression	RV, ADV, AAV (?)	CAD, I/R injury, HF
<b>Rescue</b>				
Proangiogenic factors	VEGF <sub>121</sub> , VEGF <sub>165</sub> , FGF-1, FGF-2, FGF-4, FGF-5, HGF, eNOS Ang-1, MCP-1, G-CSF, PDGF-BB, IGF-1, IGF-2, HIF-1 $\alpha$ /VP16, egr-1, Prox-1	Overexpression	Plasmid, ADV, AAV, LV (?)	CAD, MI, HF

TF, fattore di trascrizione; SOD, superossido dismutasi; GPx, glutazione perossidasi; HSP, heat shock proteins; HGF, hepatocyte growth factor; ICAM, intracellular adhesion molecule; VCAM, vascular cell adhesion molecule; TNF, tumor necrosis factor; NF, nuclear factor; eNOS, endothelial NO sintetasi; Ang-1, angiopoietina 1; MCP-1, proteina chemiottatica monocitaria; G-CSF, granulocyte colony stimulating factor; PDGF, platelet derived growth factor; IGF, insulin like growth factor; HIF, hypoxia inducible factor; egr-1, early growth response factor; ADV, adenovirus; AAV, adeno-associated virus; LV, lentivirus; AS-ODN, antisense oligonucleotide; RV, retrovirus; ACS, acute coronary syndromes; HF, heart failure.

### La terapia genica per la protezione miocardica dallo stress ossidativo e dal danno infiammatorio

L'iperpressione di geni antiossidanti potrebbe essere utile nel potenziare le riserve antiossidanti endogene e nel ridurre il danno ischemico miocardico. In un modello di ischemia-riperfusionne generata nel ratto, il gene transfer con virus adeno-associati codificanti per heme-ossigenasi, effettuato diverse settimane prima dell'insulto ischemico, era capace di ridurre dell'80% l'estensione della zona infartuata <sup>4</sup>.

Il pretrattamento con un oligonucleotide capace di inibire l'attività del fattore nucleare kB riduce l'estensione dell'area infartuata dopo legatura della coronaria nel ratto <sup>5</sup>.

### La terapia genica nella protezione dei by-pass venosi

La terapia genica può avere un ruolo nella ingegnerizzazione di grafts venosi resistenti allo sviluppo della malattia aterosclerotica. È stato precedentemente dimostrato nel coniglio che il trattamento di vene giugulari con oligonucleotidi antisense diretti contro proteine regolatorie del ciclo cellulare (cdc2 kinase) <sup>7</sup> e contro l'antigene nucleare di proliferazione E2F-1 <sup>8</sup> sono in grado di ridurre la risposta aterosclerotica all'interposizione di tali segmenti venosi a livello carotideo. Tali studi su modelli animali sono stati seguiti da 2 studi randomizzati effettuati nell'uomo dove l'inibizione di E2F effettuata su segmenti di vena safena prima dell'impianto come by-pass aorto-coronarici, migliorava la pervietà e riduceva signifi-

cattivamente l'estensione della risposta proliferativa neointimale<sup>9, 10</sup>.

### La terapia genica nella terapia della cardiopatia ischemica ostruttiva

La somministrazione di geni esogeni in grado di indurre una risposta angiogenetica può rappresentare una alternativa per i pazienti affetti da malattia aterosclerotica coronarica ostruttiva che non possono giovare della riva-

scolarizzazione percutanea, mediante angioplastica coronarica o chirurgica. Il vascular endothelial growth factor (VEGF), il fibroblast growth factor (FGF) e l'hepatocyte growth factor sono quelli maggiormente studiati sia in fase preclinica che clinica. Diversi trials clinici di fase I e II sono stati condotti utilizzando terapia genica con fattori angiogenetici (Tabella II).

**Tabella II** (Melo et al 26): Trials clinici di terapia genica per l'induzione di angiogenesi terapeutica.

Trial Name/Authors	Trial Phase	Therapeutic Agent	Vector and Route of Administration	Therapeutic Target	Follow-Up	Therapeutic Outcome
Losordo et al. <i>Circulation</i> . 1998;98:2800	I	VEGF <sub>166</sub>	Plasmid, intramyocardial	CAD not amenable to revascularization	10 weeks	↑ SPECT-sestamibi, ↑ Rentrop score, ↓ NTG use
Losordo et al. <i>Circulation</i> . 2002;105:2012	I/II	VEGF <sub>166</sub>	Plasmid, transendocardial with NOGA catheter	CAD not amenable to revascularization	12 weeks	↑ CCS angina class, ↑ exercise duration, ↑ Seattle angina questionnaire
Vale et al. <i>Circulation</i> . 2001;103:2138	I	VEGF <sub>166</sub>	Plasmid, transendocardial with NOGA catheter	CAD not amenable to revascularization	1 year	↑ SPECT-sestamibi, ↑ Rentrop score, ↓ NTG use, ↓ weekly angina attacks
Symes et al. <i>Ann Thorac Surg</i> . 1999;68:830	I	VEGF <sub>166</sub>	Plasmid, Intramyocardial	CAD not amenable to revascularization with type III-IV angina	3 months	↑ SPECT-sestamibi, no rest ischemic pain, ↓ NTG use
Rosengart et al. <i>Circulation</i> . 1999;100:468	I	VEGF <sub>121</sub>	Adenovirus, intramyocardial	CAD not amenable to revascularization	1 month	↑ SPECT-sestamibi, ↑ CCS angina class ↑ treadmill exercise
Hedman et al. <i>Circulation</i> . 2003;107:2635	I	VEGF <sub>121</sub>	Adenovirus, intracoronary	CAD at time of PTCA	6 months	↓ coronary restenosis, ↑ myocardial KAT trial perfusion
Henry et al. VIVA trial. <i>Circulation</i> . 2003;107:1359	I	hrVEGF <sub>166</sub> protein	Intracoronary with intravenous supplement	CAD not amenable to revascularization	2 months	No change in ETT, ↓ angina episodes
Grines et al. AGENT trial. <i>Circulation</i> . 2002;105:1291	I/II	FGF-4	Adenovirus, intracoronary	Class II or III angina, >1 vessel per patient	1-3 months	↑ ETT, improved stress ECG
Simons et al. FIRST trial. <i>Circulation</i> . 2002;105:788	I/II	FGF-2	Intracoronary bolus	Class II or III angina	90 and 180 days	↑ ETT, ↓ angina episodes at 90 days no differences at 180 days
Laham et al. <i>J Am Coll Cardiol</i> . 2000;36:2132	I	FGF-2	Intracoronary infusion	CAD not amenable to revascularization	1-6 months	↑ ETT, ↑ wall thickness and perfusion by MRI, improved quality of life
Unger et al. <i>Am J Cardiol</i> . 2000;85:1414	I	FGF-2	Intracoronary bolus	CAD with stable angina	1 month	↑ diameter of epicardial arteries
Kleiman et al. <i>J Am Coll Cardiol</i> . 2000;36:310	I	FGF-2	Intracoronary infusion	CAD not amenable to revascularization	6 months	No differences between placebo and treatment groups
Schumacher et al. <i>Circulation</i> . 1998;97:645	I	FGF-1	Intramyocardial	Three-vessel disease and distal LAD disease	12 weeks to 3 years	↑ angiogenesis distal to LAD, ↑ SPECT-sestamibi, ↓ NTG use
Seiler et al. <i>Circulation</i> . 2001;104:1994	I	GM-CSF	Intracoronary subcutaneous	CAD not amenable to revascularization	2 weeks	↑ coronary flow index, ↓ ECG abnormalities during balloon inflation
Baumgartner et al. <i>Circulation</i> . 1998;97:1114	I	VEGF <sub>166</sub>	Plasmid, intramuscular	Critical limb ischemia	2-11 months	↑ ankle-brachial index, ↑ exercise time, ↑ neovascularization, limb salvage
Makinen et al. <i>Mol Ther</i> . 2002;6:127	I	VEGF <sub>166</sub>	Adenovirus, intraluminal after PTA	Critical limb ischemia and infrainguinal occlusion	3 months	↑ neovascularization, ↑ ankle-brachial index
Isner et al. <i>Lancet</i> . 1996;348:370	I	VEGF <sub>166</sub>	Plasmid, intraluminal	Critical limb ischemia	3 months	↑ neovascularization and Doppler flow,
Lederman et al. TRAFFIC trial. <i>Lancet</i> . 2002;359:2053	I	FGF-2	Intraluminal	Critical limb ischemia with intermittent claudication	3 months	↑ ETT

GM-CSF, granulocyte-macrophage colony stimulating factor; KAT, Kuopio angiogenesis trial; PTA, percutaneous transluminal angioplasty; LAD, left anterior descending coronary artery; NTG, nitroglycerin; CCS, Canadian cardiovascular society; ETT, exercise tolerance time.

Sebbene tali studi abbiano dimostrato la tollerabilità di tale approccio terapeutico, non sono disponibili dati definitivi soprattutto sull'efficacia a lungo termine di tali interventi. Uno degli studi più convincenti è stato effettuato mediante la somministrazione endocardica di VEGF 2 con mappaggio endocavitario elettromeccanico tramite NOGA in pazienti con cardiopatia ischemica cronica refrattaria alla terapia. Si registrava un incremento della perfusione miocardica ed un miglioramento significativo dei sintomi<sup>11, 12</sup>. D'altra parte, altri studi come gli studi AGENT ed AGENT 2, che hanno utilizzato FGF 4, non hanno dimostrato differenze significative tra il gruppo di pazienti trattati ed il gruppo di controllo<sup>13, 14</sup>.

Ulteriori problemi riguardano gli effetti collaterali della somministrazione di fattori angiogenetici come l'edema e soprattutto la vascolarizzazione di neoplasie occulte. L'uso di promotori tessuto specifici o di elementi sen-

sibili all'ipossia che possano consentire l'espressione mirata di tali geni solo nel tessuto target potranno migliorare non solo l'efficacia ma anche la sicurezza di tali approcci terapeutici.

### Terapia della cardiopatia ischemica mediante cellule staminali

Le cellule progenitrici endoteliali (EPCs) rappresentano un'altra opzione per la neovascolarizzazione del miocardio ischemico. Tali cellule derivano da un comune precursore emoangioblastico a livello del midollo osseo. Due diverse strategie sono state utilizzate per ottenere neovascolarizzazione miocardica tramite tali cellule. La prima prevede la purificazione di tali cellule a partire dalla frazione mononucleata del midollo osseo o del sangue circolante. Tale approccio è stato usato in diversi modelli animali ed in alcuni studi clinici con numero limitato di pazienti affetti da infarto miocardico (tabella III).

**Tabella III** (da Melo et al 26): Terapia cellulare per lo sviluppo di angiogenesi terapeutica in fase preclinica e clinica.

Target	Donor	Recipient	Type and Source of Cells	Method of Delivery	Therapeutic Effects
<b>Preclinical</b>					
Myocardial ischemia	Swine	Autologous	CD31 <sup>+</sup> , peripheral blood	Transendocardial with NOGA system	↑ Rentrop score, ↑ EF, ↑ capillary density
Myocardial ischemia	Swine	Autologous	MNC, bone marrow	Transendocardial	↑ capillary density, ↑ collateral flow, ↑ myocardial contractility
Hibernating myocardium	Swine	Autologous	MNC, peripheral blood MNC, bone marrow	Transendocardial	↑ EF, ↑ capillary density, ↑ flow, ↑ EF, ↑ collateral flow
Myocardial ischemia	Rat	Autologous	MNC, bone marrow	Intramyocardial	↑ capillary density
Myocardial infarction	Human	Nude rat	CD34 <sup>+</sup> , peripheral blood MNC, peripheral blood	Intramyocardial Intravenous	↑ EF, ↑ capillary density, ↓ fibrosis, ↑ EF, ↑ capillary density, ↓ fibrosis
Myocardial infarction	Human	Nude rat	CD34 <sup>+</sup> , bone marrow	Tail vein injection	↑ EF, ↑ capillary density, ↓ fibrosis, ↓ apoptosis, ↓ infarct size
Myocardial infarction	GFP-mouse	Syngenic mouse	Lin <sup>-</sup> c-kit <sup>+</sup> , bone marrow	Intramyocardial	↑ LVDP, ↑ capillary density, ↓ infarct
Myocardial infarction	Rosa-mouse	Syngenic	SP cells, bone marrow	Systemic injection	No therapeutic effect
<b>Clinical</b>					
Myocardial infarction	Human	Autologous	CD133 <sup>+</sup> , bone marrow	Intramyocardial injection during CABG	↑ EF, ↑ collateral flow (SPECT)
Myocardial infarction	Human	Autologous	MNC, bone marrow MNC, peripheral blood	Intracoronary balloon catheter	↓ infarct size, ↑ wall motion, ↑ contractility, ↑ myocardial perfusion
Myocardial ischemia	Human	Autologous	MNC, bone marrow	Transendocardial with NOGA mapping	↓ anginal episodes, ↑ wall thickening, ↑ wall motion, ↑ EF

GFP, green fluorescent protein; MNC, mononuclear cells; SP, side population; CABG, coronary artery by-pass grafting; EF, ejection fraction.



Ad esempio il trapianto di EPCs autologhe CD31+ ha indotto un miglioramento significativo della perfusione e della funzione di cuori di maiale ischemici<sup>15</sup>. Inoltre, la somministrazione endovenosa di cellule CD34<sup>+</sup> umane a ratti nudi ha indotto una neovascolarizzazione del miocardio ischemico 16 mentre l'impianto di cellule Lin-c-kit+ nella zona di confine del miocardio infartuato ha condotto ad una formazione di nuovi vasi ed ad un miglioramento della funzione contrattile<sup>17</sup>.

La seconda strategia potenziale riguarda l'uso di citochine capaci di mobilitare le EPCs verso la zona danneggiata. Orlic et al hanno dimostrato che la somministrazione di granulocyte-colony stimulating factor o stem cell factor-1 riduceva la mortalità e migliorava la funzione in topi con infarto miocardico<sup>18</sup>.

Nonostante diversi dati incoraggianti, i maggiori problemi riguardanti l'uso di EPCs autologhe sono correlati alla scarsità di tali cellule circolanti ed alla loro disfunzione dimostrata in pazienti affetti da cardiopatia ischemica. L'uso di cellule allogeniche estratte ad esempio dal cordone ombelicale potrebbero risolvere tale tipo di inconvenienti.

### **Riparazione e rigenerazione miocardica mediante terapia con cellule staminali**

Poiché la maggior parte dei cardiomiociti sono terminalmente differenziati, la capacità rigenerativa del miocardio infartuato è limitata. La perdita di miociti in seguito ad un infarto viene compensata dall'ipertrofia dei miociti sopravvissuti. Tale meccanismo che inizialmente serve a conservare la struttura e la funzione cardiaca, conduce successivamente a processi di maladattamento progredendo verso lo scompenso cardiaco. Il trapianto cellulare può rappresentare una strategia alternativa di riparazione del miocardio ischemico. Sono state studiate diverse fonti cellulari che includono mioblasti scheletrici, cardiomiociti fetali e neonatali, cellule staminali embrionali e cellule staminali derivate da midollo osseo adulto<sup>19</sup>. Fin ad ora però tale approccio di riparazione miocardica non si è dimostrato completamente efficace e rimangono irrisolti

molteplici problemi. Ad esempio il tempo ottimale di somministrazione delle cellule staminali dopo il danno ischemico, la fonte delle cellule, il metodo di impianto e la tolleranza immunitaria. Esistono inoltre in letteratura dati contrastanti. Ad esempio mentre Reinecke et al hanno dimostrato che mioblasti scheletrici non sono in grado di differenziarsi in cardiomiociti<sup>20</sup>, Menasché et al hanno riportato un miglioramento della funzione contrattile dopo iniezione nella cicatrice infartuale di mioblasti autologhi nel corso di intervento di by-pass aorto-coronarico<sup>21</sup>.

Allo scopo di evitare i problemi legati all'uso dei mioblasti scheletrici, diversi ricercatori hanno utilizzato miociti fetali e neonatali. Ad esempio, l'iniezione di cardiomiociti neonatali di ratto maschio, nella zona infartuata di ratti femmina effettuata una settimana dopo l'evento ischemico, migliorava significativamente la funzione contrattile<sup>22</sup>.

Le cellule staminali di origine embrionale rappresentano teoricamente una buona fonte di materiale per la riparazione miocardica. Esistono però importanti limitazioni etiche, morali e legali all'uso di cellule staminali embrionali, fetali o neonatali. L'uso di una fonte autologa che si rinnovi autonomamente sarebbe di grande aiuto per lo sviluppo di tale tipo di strategia terapeutica. Diversi gruppi hanno evidenziato su campioni autoptici che esistono a livello cardiaco progenitori cellulari di origine extracardiaca. Recentemente è stato dimostrato che pazienti con infarto miocardico acuto presentano un notevole incremento di cellule mononucleate circolanti che esprimono markers cardiaci ed endoteliali<sup>23</sup>. Beltrami et al hanno addirittura dimostrato recentemente che esistono nel miocardio clusters di cellule altamente proliferanti e capaci di differenziarsi in tutti i tipi cellulari di un cuore adulto (miocardiociti, cellule endoteliali e cellule muscolari lisce)<sup>24</sup>. Sussistono molte perplessità sulla effettiva capacità di tali clusters cellulari di una riparazione e rigenerazione miocardica a lungo termine.

Nonostante i molteplici dubbi su tale argo-

mento, sono già stati condotti alcuni trials clinici con numero limitato di pazienti. Ad esempio, Stamm et al hanno dimostrato che l'iniezione di cellule AC133<sup>+</sup> derivate dal midollo osseo, effettuata a livello di confine con la zona infartuata durante intervento chirurgico di rivascularizzazione miocardica, migliorava la funzione ventricolare sinistra 3-9 mesi dopo l'intervento chirurgico<sup>25</sup>.

### **Prospettive future**

Soprattutto durante gli ultimi dieci anni, si sono sviluppate diverse strategie di terapia genica o che coinvolgono l'uso di cellule staminali. Sebbene molte terapie si siano dimostrate efficaci in modelli animali, solo in pochi casi si è registrata una progressione verso la sperimentazione clinica con risultati inequivocabili.

Ciò può essere attribuito almeno in parte ai difetti tecnici dei vettori attualmente disponibili ed ai sistemi di rilascio degli stessi. E' indispensabile che la ricerca si indirizzi verso vettori con caratteristiche di sicurezza ed efficacia più favorevoli con una maggiore tessuto-specificità per limitare gli effetti indesiderati e possibilmente con la possibilità di intervenire temporalmente sulla "accensione" e sullo "spegnimento" dei geni di interesse.

Anche l'uso di cellule staminali nella neovascularizzazione e/o rigenerazione miocardica sta assumendo un'importanza sempre maggiore. Ciò nonostante è indispensabile procedere con cautela per comprendere a fondo la tollerabilità, il giusto timing di impianto e le condizioni cliniche che maggiormente si possono giovare di tale approccio terapeutico. Ulteriori studi sono indispensabili per comprendere i meccanismi coinvolti nella mobilitazione, integrazione e sopravvivenza delle cellule staminali progenitrici a livello della zona di impianto.

E' probabile inoltre che una terapia combinata di gene therapy e di approccio con cellule staminali possa in futuro risultare di maggiore efficacia. A tal scopo sarà necessario individuare non solo le condizioni cliniche ma anche i pazienti che maggiormente si potranno giovare dei diversi trattamenti. Lo studio dei polimorfismi genetici renderà possibile tracciare il profilo genomico del singolo paziente e la sua suscettibilità verso i diversi trattamenti.

### **Bibliografia**

1. Svensson EC, Marshall DJ, Woodard K, et al. Efficient and stable transduction of cardiomyocytes after intramyocardial injection or intracoronary perfusion with recombinant adeno-associated virus vectors. *Circulation*. Jan 19 1999;99(2):201-205.
2. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. Feb 14 1997;275(5302):964-967.
3. Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med*. Jun 2003;9(6):702-712.
4. Melo LG, Agrawal R, Zhang L, et al. Gene therapy strategy for long-term myocardial protection using adeno-associated virus-mediated delivery of heme oxygenase gene. *Circulation*. Feb 5 2002;105(5):602-607.
5. Morishita R, Sugimoto T, Aoki M, et al. In vivo transfection of cis element "decoy" against nuclear factor-kappaB binding site prevents myocardial infarction. *Nat Med*. Aug 1997;3(8):894-899.
6. Yla-Herttuala S, Alitalo K. Gene transfer as a tool to induce therapeutic vascular growth. *Nat Med*. Jun 2003;9(6):694-701.

7. Mann MJ, Gibbons GH, Kernoff RS, et al. Genetic engineering of vein grafts resistant to atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. May 9 1995;92(10):4502-4506.
8. Morishita R, Gibbons GH, Horiuchi M, et al. A gene therapy strategy using a transcription factor decoy of the E2F binding site inhibits smooth muscle proliferation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun 20 1995;92(13):5855-5859.
9. Mann MJ, Whittmore AD, Donaldson MC, et al. Ex-vivo gene therapy of human vascular bypass grafts with E2F decoy: the PREVENT single-centre, randomised, controlled trial. *Lancet*. Oct 30 1999;354(9189):1493-1498.
10. McCarthy M. Molecular decoy may keep bypass grafts open. *Lancet*. Nov 17 2001;358(9294):1703.
11. Losordo DW, Vale PR, Hendel RC, et al. Phase 1/2 placebo-controlled, double-blind, dose-escalating trial of myocardial vascular endothelial growth factor 2 gene transfer by catheter delivery in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation*. Apr 30 2002;105(17):2012-2018.
12. Vale PR, Losordo DW, Milliken CE, et al. Randomized, single-blind, placebo-controlled pilot study of catheter-based myocardial gene transfer for therapeutic angiogenesis using left ventricular electromechanical mapping in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation*. May 1 2001;103(17):2138-2143.
13. Grines CL, Watkins MW, Helmer G, et al. Angiogenic Gene Therapy (AGENT) trial in patients with stable angina pectoris. *Circulation*. Mar 19 2002;105(11):1291-1297.
14. Grines CL, Watkins MW, Mahmarian JJ, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of Ad5FGF-4 gene therapy and its effect on myocardial perfusion in patients with stable angina. *J Am Coll Cardiol*. Oct 15 2003;42(8):1339-1347.
15. Kawamoto A, Tkebuchava T, Yamaguchi J, et al. Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circulation*. Jan 28 2003;107(3):461-468.
16. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med*. Apr 2001;7(4):430-436.
17. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. Apr 5 2001;410(6829):701-705.
18. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug 28 2001;98(18):10344-10349.
19. Reffelmann T, Kloner RA. Cellular cardiomyoplasty--cardiomyocytes, skeletal myoblasts, or stem cells for regenerating myocardium and treatment of heart failure? *Cardiovasc Res*. May 1 2003;58(2):358-368.
20. Reinecke H, Poppa V, Murry CE. Skeletal muscle stem cells do not transdifferentiate into cardiomyocytes after cardiac grafting. *J Mol Cell Cardiol*. Feb 2002;34(2):241-249.
21. Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, et al. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet*. Jan 27 2001;357(9252):279-280.
22. Muller-Ehmsen J, Peterson KL, Kedes L, et al. Rebuilding a damaged heart: long-term survival of transplanted neonatal rat cardiomyocytes after myocardial infarction and effect on cardiac function. *Circulation*. Apr 9 2002;105(14):1720-1726.
23. Wojakowski W, Tendera M, Michalowska A, et al. Mobilization of CD34/CXCR4<sup>+</sup>, CD34/CD117<sup>+</sup>, c-met<sup>+</sup> stem cells, and mononuclear cells expressing early cardiac, muscle, and endothelial markers into peripheral blood in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*. Nov 16 2004;110(20):3213-3220.

24. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. Sep 19 2003;114(6):763-776.
25. Tse HF, Kwong YL, Chan JK, et al. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet*. Jan 4 2003;361(9351):47-49.
26. Melo LG, Pachori AS, Kong D, et al. Molecular and cell-based therapies for protection, rescue, and repair of ischemic myocardium: reasons for cautious optimism. *Circulation*. May 25 2004;109(20):2386-2393.