

Medicina cardiovascular traslacional (IX)

Fundamentos de la terapia celular para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares: no hay una célula adecuada para todo

Doris A. Taylor y Matthew J. Robertson

Centro de Reparación Cardiovascular. Universidad de Minnesota. Minneapolis. Minnesota. Estados Unidos.

La enfermedad cardiovascular constituye una serie de entidades patológicas que tienen tratamientos médicos diferentes. La terapia celular es un enfoque del siglo XXI para abordar el tratamiento de la enfermedad cardiovascular y se aplica en todo el mundo. Sin embargo, no se ha abordado de manera adecuada la definición de la mejor población celular a utilizar ni las mejores condiciones de tratamiento. Sería ingenuo creer que se pueda encontrar un tratamiento único (ni siquiera con células madre) que permita tratar todo el espectro de las enfermedades cardiovasculares.

Describimos el espectro de la cardiopatía isquémica, los posibles usos de células para su tratamiento adecuado y las cuestiones básicas que hay que abordar al contemplar la terapia celular cardiovascular. El objetivo clínico es la regeneración cardíaca y vascular, pero todavía está por determinar si las células pueden conseguir estos efectos. La elección de la célula correcta, la ventana terapéutica ideal y el paciente «adecuado» también son cuestiones abiertas al debate. Este artículo se ha diseñado para aportar una perspectiva respecto a las fases inicial, media y avanzada de la enfermedad cardiovascular y describir cómo podrían usarse las células de un modo diferenciado para el tratamiento de cada fase.

Palabras clave: Células madre. Terapia celular cardíaca. Regeneración de órganos. Reparación endógena.

The Basics of Cell Therapy to Treat Cardiovascular Disease: One Cell Does Not Fit All

Cardiovascular disease represents a continuum of disease entities whose medical treatments differ. Cell therapy is a 21st century approach to treating cardiovascular disease and is being applied worldwide. However, no concerted approach exists for defining the best cell population(s) to use, or the best treatment conditions. It is naïve to believe that a single treatment—even a stem cell—can be found to treat the entire spectrum of cardiovascular disease.

We describe the continuum of ischemic heart disease, the potential uses of cells for treating this continuum, and the basic issues that must be considered when contemplating cardiovascular cell therapy. The clinical goal is cardiac and vascular regeneration. Whether cells can deliver this remains to be determined. The correct cell, the ideal therapeutic window, and the «right» patient likewise are open to debate. This article is designed to provide insights into the early, middle, and later stages of cardiovascular disease and how cells might be used differently for treatment at each stage.

Key words: Stem cells. Cardiac cell therapy. Organ regeneration. Endogenous repair.

Full English text available from: www.revespcardiol.org

Sección patrocinada por el Laboratorio Dr. Esteve

INTRODUCCIÓN

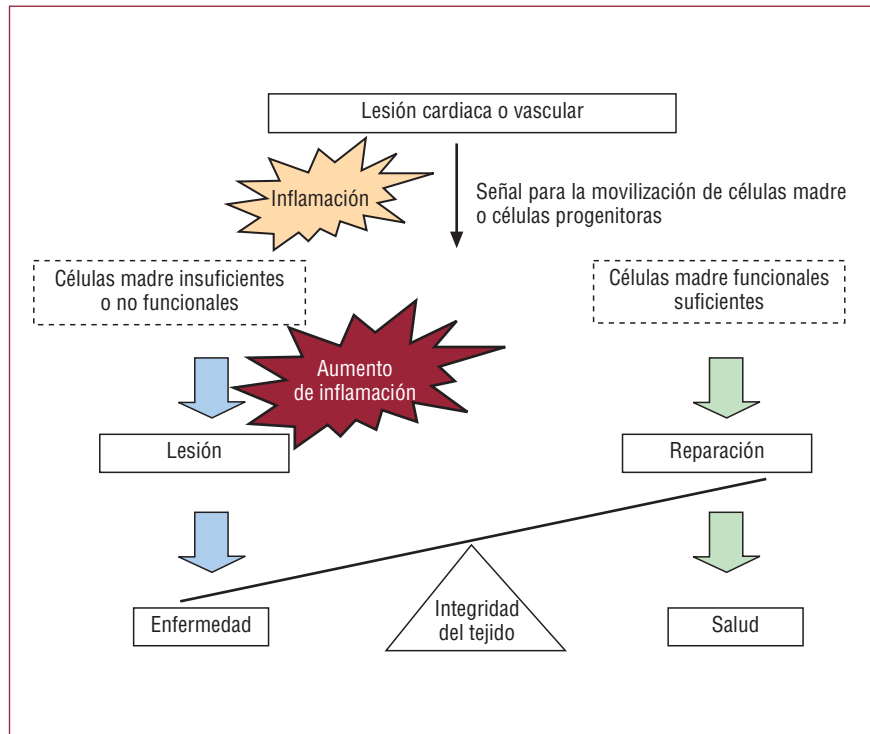
Por primera vez, la enfermedad cardiovascular (ECV) supera a la infección y el cáncer como primera causa de muerte en la mayor parte del

mundo¹. Además, la incidencia de la ECV a una edad más temprana (30-50 años) aumenta² a medida que se incrementa la prevalencia de los factores de riesgo de ECV (p. ej., hipertensión, obesidad y diabetes mellitus tipo 2)³⁻⁵. Así, se han observado signos tempranos de aterosclerosis en individuos de tan solo 18 años de edad⁶. Además, este aumento se complica por el incremento del número de pacientes que sobreviven a episodios cardiovasculares agudos, lo que ha llevado a un aumento asociado de la prevalencia de la enfermedad en su fase más avanzada, incluida la insuficiencia cardíaca. La terapia celular es una estrategia nueva que se está aplicando al tratamiento del conjunto de las ECV, con unas características comunes, pero también con unos aspectos específicos de cada fase que es preciso tener en cuenta. Al inicio del curso

Este trabajo ha sido financiado en parte por la subvención del NIH/NHLBI concedida a D.A.T. (R01-063346), la subvención de la Minnesota Partnership for Biotechnology and Medical Genomics concedida a la Dra. Taylor, y financiación de la Medtronic Foundation al Centro de Reparación Cardiovascular, Universidad de Minnesota. La Dra. Taylor ocupa la Cátedra Medtronic Bakken y dirige el Centro de Reparación Cardiovascular, Universidad de Minnesota.

Correspondencia: Dra. Doris A. Taylor.
Director, Center for Cardiovascular Repair. University of Minnesota.
312 Church Street SE. Minneapolis MN 55455. Estados Unidos.

Fig. 1. La integridad tisular refleja un equilibrio entre lesión y reparación. Cuando se produce una lesión del tejido, se liberan quimiocinas/citocinas inflamatorias al medio tisular circundante y a la circulación que fomentan un reclutamiento de células madre y células progenitoras hacia el lugar de la lesión. Si estas células fomentan la reparación, la inflamación se reduce y, por lo tanto, se restablece la integridad tisular. Sin embargo, cuando el número de células progenitoras disminuye o estas células no son funcionales, la reparación fracasa. En ese caso, el equilibrio se decanta hacia la lesión y la inflamación aumenta y produce secuelas negativas de la respuesta inflamatoria y la lesión tisular. La terapia celular debe diseñarse para proporcionar las células apropiadas en la ventana temporal adecuada y en una dosis suficiente para restablecer el potencial de reparación. Ante una enfermedad crónica como la angina refractaria o la enfermedad aterosclerótica sistémica, esto puede requerir una administración repetida durante meses o años. En el caso de una lesión aguda devastadora, esto puede exigir el empleo de una única dosis alta poco después de la lesión. Al tratar una lesión de órganos finales, las células solas pueden no ser suficientes y puede ser necesario el empleo de parches o tejidos obtenidos mediante ingeniería.



de la enfermedad, el objetivo del tratamiento es la lesión vascular; tras un infarto, el miocardio o la circulación dañados; al iniciarse la insuficiencia cardíaca, pasa a serlo todo el tejido u órgano (fig. 1).

¿POR QUÉ UNA TERAPIA CELULAR?

La reparación de tejidos y órganos ante el «desgaste» normal se produce durante gran parte de la vida, pero parece reducirse con la edad y culmina con la aparición de enfermedades crónicas como las ECV. Este proceso de reparación es un equilibrio permanente entre la lesión y la reparación del tejido, que se mantiene gracias a una delicada interacción entre señales proinflamatorias y antiinflamatorias y células madre o progenitoras endógenas⁷. A edades más tempranas, cuando es habitual que los factores de riesgo sean menores, existen células suficientes para compensar las pequeñas agresiones sufridas y mantener la reparación. Con la edad y la enfermedad crónica, se produce un fallo de la capacidad de reparación, debido en parte a que disminuye el número y la función de las células madre/progenitoras y a que éstas pierden la capacidad de hacer frente a las mayores demandas de reparación existentes⁷⁻¹⁰. Ante episodios devastadores como un traumatismo agudo, un infarto agudo de miocardio, etc., no hay suficientes células o éstas no pueden movilizarse en número suficiente cuando se necesita que compensen una lesión masiva. En estos casos, la terapia celular o el aporte de células

madre/progenitoras en el lugar de la lesión constituyen un enfoque terapéutico novedoso, diseñado para resolver este fallo de la reparación endógena.

BIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS MADRE Y ENFERMEDAD CARDIACA

Las células madre son «células maestras no especializadas (no diferenciadas)»¹¹ que conservan la capacidad de dividirse y dar origen a células hijas (es decir, autorrenovarse), pero también de adquirir un «compromiso» de dar lugar a un determinado tipo celular (compromiso de línea celular) y finalmente «diferenciarse» o madurar a lo largo de esa línea celular para reemplazar las células que mueren o se pierden (fig. 2). Las células madre se definen habitualmente como células pluripotenciales (pueden dar origen a todos los tipos de células del organismo) o multipotenciales (pueden dar origen a múltiples tipos de células, pero no a todos), que pueden replicarse de manera indefinida. Las células progenitoras son células madre que han empezado a madurar *in vivo* o *in vitro*, capaces de replicarse un número limitado de veces y es característico que tengan menos flexibilidad en cuanto a compromiso y maduración. En la literatura hematológica, una célula madre se define de forma rigurosa como una única célula capaz de reemplazar todos los componentes de la médula ósea y la sangre. En el campo de la medicina regenerativa, esta definición ha dejado de ser tan estricta y los términos célula madre

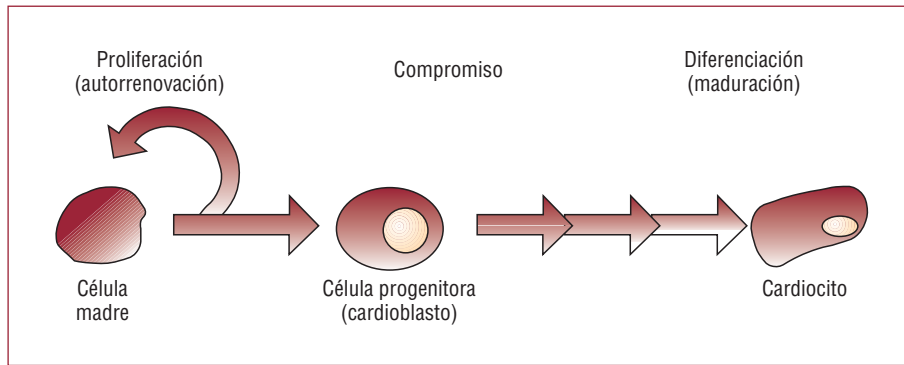


Fig. 2. Diferenciación de células madre. Las células madre sufren un proceso de maduración que comporta el compromiso para diferenciarse hacia una determinada línea celular (en este caso, cardíaca) seguido de la diferenciación o maduración a lo largo de esa línea. Las células madre son capaces de autorrenovarse de manera indefinida, mientras que las células progenitoras tienen una capacidad de división celular finita.

y célula progenitora se utilizan a menudo de manera intercambiable. Lo habitual es que la terapia celular se realice con células madre multipotenciales o células progenitoras (es decir, antes de que se produzca el compromiso o la diferenciación), en una fase en la que pueden diferenciarse siguiendo múltiples líneas celulares y dar lugar a diferentes tipos de células según las necesidades. Para la terapia celular cardiovascular, se ha utilizado la médula ósea, el músculo esquelético, la grasa, el corazón y el cordón umbilical como fuentes de células madre o progenitoras del adulto no comprometidas. Lo ideal es que las células madre puedan convertirse en cardiocitos e integrarse en el tejido circundante del huésped. Los datos de varios laboratorios indican que es factible, aunque parece que se trata de un hecho muy poco frecuente¹². Sin embargo, tal como han indicado Wang et al¹³, los datos existentes indican también que, cuando se inyectan en un corazón dañado o que ha sufrido un infarto, las células madre pueden desarrollar características cicatrizales. Y en el caso de las células madres pluripotenciales embrionarias o humanas, pueden incluso formar tumores benignos. El conocimiento de este fenómeno y la forma de empezar a controlarlo constituyen un campo de investigación activa en el que se deberá profundizar antes de que las células madre indiferenciadas pasen a ser de por sí un objetivo plausible para la reparación clínica del miocardio.

PREVENCIÓN O REVERSIÓN DE LA ECV (ATEROSCLEROSIS) INICIAL

La terapia celular se ha utilizado principalmente en el ámbito clínico para tratar a pacientes que han sufrido un infarto agudo de miocardio (IAM) o insuficiencia cardíaca. Proponemos que en estos supuestos puede estar justificada la evaluación y la intervención más tempranas. Mediante la evaluación de la capacidad de reparación celular endógena de un individuo, o la falta de ella, es posible imaginar una oportunidad única para el diagnós-

tico precoz y la prevención a tiempo de las consecuencias de la aterosclerosis. De igual modo, las intervenciones de terapia celular tempranas ante un fallo de la reparación podrían reducir el riesgo de progresión hacia una ECV clínica. Estas afirmaciones se basan tanto en datos preclínicos como en los datos clínicos iniciales (véase en la fig. 3 una propuesta de pauta de tratamiento según la enfermedad).

En un modelo de la aterosclerosis en ratones *knockout* para ApoE, hemos demostrado anteriormente que la progresión de la enfermedad aterosclerótica está ligada a la obsolescencia de las células endógenas que normalmente reparan y rejuvenecen las arterias¹⁰. Además, también demostramos que el tratamiento repetido con células progenitoras (CP) derivadas de la médula ósea de ratones jóvenes sin aterosclerosis prevenía la progresión de esta enfermedad en los animales receptores, mientras que el tratamiento con células de médula ósea procedentes de ratones de mayor edad con aterosclerosis era mucho menos eficaz. En estudios más recientes, hemos descrito diferencias en función del sexo en cuanto a esta capacidad de reparación por parte de células endógenas⁹. En esos estudios, determinamos la capacidad de las células mononucleares de médula ósea (CMN-MO) de revertir la carga de placa existente tras una aportación crónica correspondiente o no al mismo sexo. Solamente las células femeninas infundidas por vía intravenosa en receptores machos ApoE^{-/-} reducían de manera significativa la carga de placa. Esta respuesta estaba correlacionada con un aumento de tres poblaciones celulares principales (CD34, CD45, AC133/CD34) en la médula ósea, pero no con el colesterol total en suero. La reducción de la carga de placa se asociaba, además, a aumentos del tipo Th1 (proinflamatorio), disminuciones del tipo Th2 (antiinflamatorio) y cambios de las citocinas hemopoyéticas/reguladoras en sangre periférica. Este papel de las citocinas hemopoyéticas/reguladoras y de tipo Th2 en el proceso reparador no se había identificado anteriormente. Sin embargo, según estos datos, plan-

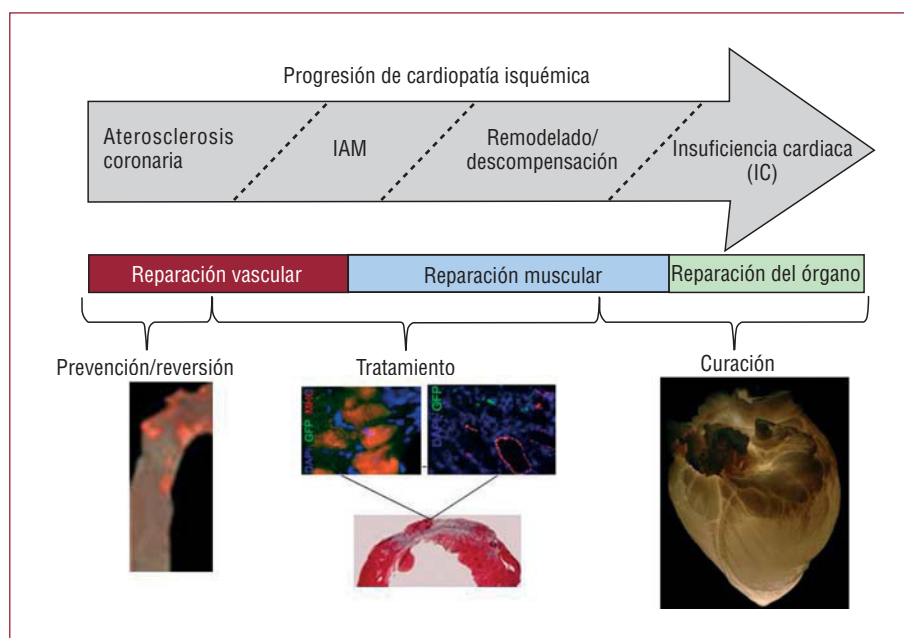


Fig. 3. Objetivos de la terapia celular en la enfermedad cardiovascular.

teamos la hipótesis de que la reparación vascular mediante células requiere un grado de inflamación para reclutar las células reparadoras procedentes de la médula ósea que producen la digestión de las lesiones causadas por placa de ateroma (presumiblemente por la acción de los macrófagos), la anidación de células progenitoras endoteliales (CPE) y la generación de un nuevo endotelio. Esto indicaría que se necesita un conocimiento más detallado del papel de la inflamación en la aterogénesis y que la atenuación del proceso inflamatorio en la fase inicial (mediante la inhibición de las citocinas de tipo Th1 a través de un antagonismo directo o de un antagonismo inespecífico) podría tener, de hecho, consecuencias nocivas para el reclutamiento de las células necesarias para la reparación vascular. Es de destacar que las células de médula ósea femeninas secretaron una cantidad de factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), un factor del que se sabe que fomenta la movilización de las células madre y origina su salida de la médula ósea, aproximadamente 4 veces superior a lo observado con las células masculinas. Además, las concentraciones de G-CSF endógeno en ratones hembras ApoE^{-/-} fueron el doble que las de los ratones machos. Estas diferencias en función del sexo en la capacidad de reparación vascular mediada por CP no sólo empiezan a explicar por qué la ECV aparece antes en los varones (al fallar la reparación), sino que también pueden tener repercusiones en el uso de las células autólogas en los ensayos clínicos, por cuanto las células femeninas superan ampliamente a las masculinas en sus resultados. En resumen, las cé-

lulas de origen medular parecen desempeñar un papel en el mantenimiento de la salud vascular. Con la edad, se produce una disminución de poblaciones específicas de células progenitoras reparadoras que puede explicar la acumulación de riesgo y la rápida progresión de la aterosclerosis en los individuos a partir de una determinada edad. Si estos resultados se verifican clínicamente (los datos preliminares de que disponemos reproducen los resultados preclínicos de una diferencia en la pérdida celular en función del sexo), la reposición celular en una fase temprana de la enfermedad cardiovascular podría pasar a ser una opción terapéutica con amplias repercusiones para reducir todos los aspectos de la ECV. Está justificado un examen más detenido de las diferencias entre los sexos, en cuanto a las células madre y células progenitoras presentes en la médula ósea y la sangre periférica y en la capacidad de prevención y tratamiento de la enfermedad a través de las células. Aunque sólo se ha estudiado a un reducido número de pacientes con aterosclerosis avanzada (sin infarto agudo de miocardio [IAM] ni insuficiencia cardíaca)^{14,15}, las CMN-MO redujeron sustancialmente los episodios semanales de angina en pacientes con angina resistente al tratamiento en mayor medida que la administración de ranolazina, un nuevo fármaco antianginoso¹⁶. Y la mejora sintomática estuvo correlacionada con un aumento de la perfusión miocárdica. Esto indica que hay un futuro prometedor en el uso de CMN-MO para la prevención o el tratamiento de la ECV temprana e incluso, posiblemente, la asintomática.

TRATAMIENTO DE LA LESIÓN MIOCÁRDICA AGUDA

Dado que el miocardio del adulto carece de una reserva considerable de células madre o células progenitoras, no puede llevar a cabo una regeneración efectiva de los miocardiocitos tras una lesión devastadora como la que produce un IAM. De hecho, tras un IAM, el miocardio dañado presenta habitualmente una cicatrización con escara fibrosa no contráctil. Si el infarto es lo bastante grande, el resto del miocardio acaba sufriendo una descompensación que conduce a la insuficiencia cardíaca. Las actuales opciones de tratamiento para el IAM y la posterior insuficiencia cardíaca incluyen el tratamiento médico, el trasplante cardíaco, los dispositivos mecánicos de ayuda circulatoria ventricular izquierda y otros intentos experimentales (corazones artificiales), que tienen en todos los casos limitaciones específicas. A la vista de la poca eficacia y las comorbilidades de estas opciones de tratamiento en el momento actual, son necesarias otras estrategias terapéuticas alternativas a largo plazo. De este modo, el aporte de células capaces de producir una reparación cardíaca surge en este contexto como una nueva opción terapéutica (fig. 3).

INTENTAR RECONSTRUIR EL MIOCARDIO: ELECCIÓN DE LOS TIPOS CELULARES

Cuando el miocardio ha sufrido un accidente isquémico, mueren tanto células musculares cardíacas como células vasculares. Por consiguiente, la reparación debe incluir no sólo nuevo músculo cardíaco, sino también vasos sanguíneos capaces de aportar oxígeno y nutrientes al tejido muscular naciente. Se ha estudiado el papel de las células angiogénicas y miogénicas tanto en el ámbito preclínico como en el clínico.

Cardiocytes

A primera vista, los miocitos cardíacos podrían parecer el objetivo ideal para la reparación del músculo cardíaco. Sin embargo, hay varios obstáculos importantes que impiden el uso de estas células *in vivo*. En primer lugar, para que los cardiocytes se puedan utilizar clínicamente en el trasplante celular, es preciso disponer con facilidad de un elevado número de células; lo cual es improbable, dado que en la actualidad los cardiocytes maduros no son capaces de replicarse en un grado significativo *in vitro* o *in vivo*. En segundo lugar, para que los cardiocytes sobrevivan, necesitan disponer de una irrigación vascular muy superior a la que se pueda obtener en el infarto. Por último, para que los cardiocytes contribuyan de manera importante a la función mio-

cárdica, deben migrar e incorporarse a la cicatriz y luego alinearse de una forma que les permita un acoplamiento eléctrico y mecánico con el resto del miocardio. En la actualidad, los datos que indican que esto es posible con miocardiocytes maduros son escasos o nulos.

Mioblastos de músculo esquelético

El músculo esquelético del adulto contiene una población de células inmaduras capaces de reparar las lesiones sufridas por el músculo durante toda la vida. Estas células progenitoras de origen muscular, denominadas mioblastos, fueron el primer tipo celular que se utilizó para la reparación funcional del miocardio¹⁷. Las ventajas de los mioblastos de músculo esquelético frente a las células de músculo cardíaco para la reparación cardíaca radican en su capacidad para crecer en cultivo hasta alcanzar cantidades elevadas *in vitro*, su capacidad de continuar replicándose *in vivo* y su relativa resistencia a la isquemia, que hace que aumente su potencial de supervivencia en regiones hipóxicas como la del miocardio que ha sufrido un infarto. Aunque se ha propuesto el uso de mioblastos en una fase relativamente temprana tras el IAM, su aplicación clínica actual se centra fundamentalmente en el corazón con una cicatrización crónica, en el que la disfunción del ventrículo izquierdo (VI) y la fracción de eyección (FE) baja respaldan la necesidad de formación de músculo nuevo. Más adelante se comenta con mayor detalle su uso como opción terapéutica para el corazón en insuficiencia.

Médula ósea

Se ha producido un gran entusiasmo clínico por el empleo de un aspirado de médula ósea que contiene un «cóctel» de células madre o progenitoras para acelerar la reparación cardíaca tras un IAM. Esto ha llevado al tratamiento de más de 1.000 pacientes con células de médula ósea en estudios clínicos de fases I y II. Nuestro grupo ha realizado una revisión de estos ensayos en otra publicación¹⁸ y aquí se resumen los resultados y las enseñanzas obtenidas. Los ensayos realizados hasta la fecha se han centrado en el empleo de CMN-MO, células progenitoras endoteliales (CPE) o células mesenquimatosas o de estroma de médula ósea (CME), y la mayor parte de los pacientes han sido tratados después de un IAM. Tres metaanálisis recientes señalan que las CMN-MO aportan un efecto beneficioso estadísticamente significativo aunque pequeño (desde el punto de vista clínico) cuando se administran después de un IAM¹⁹⁻²¹. Sin embargo, al examinar detalladamente los diversos estudios, los resultados son discrepantes. Todavía no se ha resuelto

si estas discrepancias corresponden a diferencias en el contexto de la enfermedad, la población de pacientes, el tipo y la dosis de las células, las manipulaciones de éstas u otros factores.

Las diferencias clínicas parecen desempeñar un papel importante en esas discrepancias. Por ejemplo, las CMN-MO administradas en un IAM tratado con reperfusión o implantación de *stents* no aportaron un efecto tan beneficioso. Aunque en algunos estudios se observó una reducción del tamaño del infarto, no hubo mejoría funcional²². Esta ausencia de efecto podría deberse a que el restablecimiento rápido del flujo coronario pudiera hacer innecesaria la reparación mediante células. La evidencia respalda esta posibilidad e indica que incluso cuando la reperfusión y la implantación de *stents* no se aplicaron de manera uniforme las CMN-MO y otras subpoblaciones de células procedentes de la médula ósea (CPE AC133+ y CME) mejoraron la viabilidad del miocardio, el movimiento de la pared, el flujo coronario y la FE ventricular izquierda (FEVI). Sin embargo, no todas las fracciones medulares produjeron iguales efectos beneficiosos; en estos estudios, varios pacientes presentaron reestenosis o la aparición de lesiones *de novo* tras la aplicación de CPE AC133+²³. Estos datos indican que el éxito de las células de médula ósea probablemente resida en la administración de células no fraccionadas, que permiten que se produzcan las interacciones célula-célula y célula-tejido *in vivo* que no se dan, en cambio, cuando se administra una población celular aislada. En otras palabras, dado que las CMN-MO no fraccionadas tienen progenitores maduros e inmaduros y poblaciones celulares todavía no definidas, es probable que una combinación de estas células sea la mejor elección para los tipos complejos de reparación vascular y del músculo cardíaco necesarios tras un IAM.

Células madre mesenquimatosas

El hueso contiene también una población de células de «estroma» medular que aportan apoyo y anclaje para las células hemopoyéticas maduras. Cuando se estableció que estas células mesenquimatosas eran multipotenciales, nació una nueva población de células madre para la reparación cardíaca: las células madre mesenquimatosas de la médula ósea. Por su propia naturaleza, estas células madre multipotenciales deben responder a su microentorno y desarrollar el fenotipo correspondiente. Esto indica que, en el miocardio normal, las células madre de médula ósea podrían convertirse en cardiocitos e integrarse en el tejido circundante del huésped. Los datos de varios laboratorios indican que esta posibilidad es factible, aunque parece tratarse de un hecho muy poco frecuente¹². Pero, como

han demostrado Wang et al¹³, otros datos indican que, inyectadas en el corazón dañado o que ha sufrido un infarto, las células madre mesenquimatosas de la médula ósea pueden desarrollar características cicatrizales. No obstante, los datos recientes presentados por Hare et al²⁴ apuntan a que las CME pueden aportar un efecto beneficioso en el contexto del IAM incluso tras la infusión intravenosa y una acumulación mínima en el miocardio. Este fenómeno se ha atribuido en parte a un efecto antiinflamatorio de las células mesenquimatosas a través de influencias paracrinas. El conocimiento de este efecto paracrino no local de las células (y el impacto en el equilibrio inflamatorio que se ha descrito antes) y los primeros pasos para su control son un campo de investigación activa que podría ser el objetivo más plausible para el tratamiento de reparación miocárdica.

Otras células de origen tisular

Además del músculo esquelético, la médula ósea y la sangre periférica, se han propuesto múltiples tejidos como reservas de células madre del adulto y, por lo tanto, posibles fuentes para el aislamiento de células destinadas a la reparación cardíaca. Entre estos tejidos se encuentran el tejido adiposo (en el que es fácil obtener una población de células mesenquimatosas), el hígado adulto (que contiene un número significativo de células regenerativas) y, naturalmente, el corazón.

Células madre cardíacas

Actualmente se han aislado al menos cuatro poblaciones de células indiferenciadas (que expresan c-kit, MRD-1, isl-1 o sca-1 y carecen de expresión de marcadores hemopoyéticos) a partir de corazones neonatales y corazones que fallan como consecuencia de un infarto agudo²⁵⁻²⁷. Es interesante señalar que el número de estas células aumentó tras el IAM, pero fue muy bajo en los corazones en insuficiencia cardíaca, lo que indica un papel significativo de dichas células en los fenómenos de reparación continua que terminan por ser insuficientes en la insuficiencia cardíaca. En nuestro laboratorio hemos aislado una población SSEA+ de células progenitoras cardíacas no comprometidas (CPCNC) en corazón de rata, tanto neonatales como adultos, y hemos observado que estas células podían expandirse *in vitro*, dar lugar a muchas de las poblaciones de células madre descritas anteriormente y diferenciarse hacia las vías celulares de los miocitos cardíacos, el músculo liso o el endotelio²⁸. Esto indicaría que el miocardio del adulto contiene una población de células progenitoras que es dinámica y da lugar a una plétora de tipos celulares *in vivo*, in-

cluidos los componentes muscular y vascular. Esta capacidad de las células madre de origen cardiaco de dar origen a lo que parece ser un miocardio maduro y vasos sanguíneos es prometedora, a pesar de que las posibilidades de obtención y expansión de estas poblaciones de CP de origen cardiaco continúan siendo limitadas (lo cual reduce su potencial actual de aplicación clínica). Recientemente, Messina et al²⁹ han superado en parte este problema desarrollando métodos para obtener células miogénicas a partir de biopsias cardíacas en el adulto. Nosotros hemos demostrado que las células SSEA+ *in vitro* se pueden expandir hasta cantidades suficientes para la reparación cardíaca²⁸. La posibilidad de obtener, aislar y expandir células madre cardíacas y su potente capacidad de reparación del músculo cardíaco indica que la movilización endógena o el aporte de estas células progenitoras de origen cardiaco puede ser una estrategia atractiva en el futuro.

TRATAMIENTO DE LA INSUFICIENCIA CARDIACA

A pesar de los muchos años de esfuerzos para reducir la fisiopatología del remodelado, hasta un 50% de los pacientes que han sufrido un IAM terminan desarrollando insuficiencia cardíaca sintomática a los 7 años⁷. Por lo tanto, hay una clara necesidad insatisfecha de desarrollar tratamientos que mejoren la calidad de vida en los pacientes con insuficiencia cardíaca al tiempo que reduzcan las hospitalizaciones y, en última instancia, la mortalidad. Como el remodelado lleva a una fibrosis considerable y a una pérdida de células contráctiles en todo el miocardio, con lo que las células restantes no son capaces de satisfacer las demandas de contracción, la sustitución de las células que se pierden o mueren por otras nuevas es una opción terapéutica lógica tanto para los médicos como para los pacientes. Tras iniciar en 1998 la demostración de una mejora funcional del VI y un efecto antirremodelado después de un trasplante de mioblastos de músculo esquelético (MBME) en un modelo de conejo¹⁷, se ha publicado ya la aplicación clínica de las MBME en aproximadamente 250 pacientes, experiencia que nosotros hemos revisado en otra publicación³⁰. Los datos obtenidos indican una relación entre el deterioro de la contractilidad en la situación basal y la mejora funcional del VI con el empleo de MBME. Concretamente, en pacientes con un valor basal de FEVI < 25%, o de entre el 25 y el 30%, la mejora media de la FEVI fue de aproximadamente un 7-8%. La única excepción fue la de un estudio de Chachques et al³¹, en el que la media de FEVI mejoró del 28 al 52% en un plazo de 14 ± 5 meses. Cuando el valor basal de la FE era de un 30-40%, la

contractilidad en el seguimiento mejoró de un 9 a un 19%. Por último, en los pacientes que presentaban una contractilidad tan solo débilmente anormal (FEVI > 40%), no se observó ningún beneficio funcional significativo. A pesar de este efecto diverso en la FE, la administración de MBME mejoró significativamente los síntomas de insuficiencia cardíaca de los pacientes (en general, alrededor de una clase funcional de la New York Heart Association), aunque es preciso reconocer que el número de estudios controlados es reducido. El primer estudio controlado con placebo y aleatorizado (el Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy Trial) se publicó en 2008³². De forma resumida, se trata de un estudio internacional de 97 pacientes con insuficiencia cardíaca que presentaban una FEVI de un 15-35%, con antecedentes de IAM y con al menos dos segmentos contiguos con grave deterioro funcional. Se aplicaron MBME en el miocardio no revascularizado en el momento de practicar un *bypass* utilizando 30 inyecciones. Las variables de valoración principales fueron el cambio de la FEVI a los 6 meses y la recuperación de la función segmentaria del VI. Las variables de valoración principal de seguridad fueron los acontecimientos adversos cardíacos mayores y las tasas de arritmia a 30 días y a 6 meses. A pesar de que no hubo diferencias en las variables de valoración principal en comparación con placebo, el estudio puso de manifiesto varias cuestiones importantes. En primer lugar, es posible realizar un ensayo multicéntrico del tratamiento con MBME utilizando células expandidas (conservando la viabilidad celular). En segundo lugar, la aplicación de múltiples inyecciones de células en el VI es factible en múltiples centros y con múltiples operadores. Por último, el trasplante de MBME a dosis altas se asoció a una reducción significativa de los volúmenes telesistólico y telediastólico del VI en comparación con placebo, lo cual indica que los tratamientos celulares ejercen efectos antirremodelado de probable importancia a largo plazo. Estos datos apuntan a que, ante una lesión grave de las células musculares del miocardio, puede obtenerse un efecto beneficioso funcional significativo que supere el observado con otros tipos de células hasta la fecha. Es de destacar la evidencia preclínica que indica que los mioblastos del miocardio del corazón en insuficiencia pueden formar nuevo músculo y, lo que es muy importante, reclutar o atraer vasos de nueva formación hacia la zona de remuscularización.

A pesar de que las investigaciones de los MBME en la insuficiencia cardíaca precedieron a los estudios de las CMN-MO en el IAM, los progresos del tratamiento basado en MBME no han sido igual de rápidos. Esto probablemente refleje motivos tanto

clínicos como no clínicos. Desde el punto de vista clínico, el tratamiento con MBME ha comportado algunas dificultades específicas en cuanto a seguridad y eficacia. Dado que fue el primer tipo celular utilizado clínicamente, se aplicó a pacientes con insuficiencia cardíaca inestable en estado muy grave, con escaso conocimiento de la forma de actuar de las células. En esos primeros estudios en la insuficiencia cardíaca, no controlados, se observó arritmogénesis en algunos de los receptores de las células³⁰. La administración conjunta de amiodarona redujo drásticamente la incidencia de arritmias tras el trasplante de MBME, pero no restableció el entusiasmo por los estudios del MBME debido a los problemas de seguridad asociados al uso de amiodarona a largo plazo¹⁸. En este contexto, las MBME pueden verse afectadas por algunas de las dificultades que tienen las CMN-MO tras un IAM. De manera muy similar a lo que ocurre en el IAM, no conocemos bien el medio inflamatorio de la insuficiencia cardíaca crónica. Tampoco conocemos toda la gama de citocinas/quimiocinas que secretan los MBME. Inspirándonos en nuestro trabajo sobre la aterosclerosis comentado antes, proponemos que la interacción del medio inflamatorio del paciente con el de las células puede determinar la seguridad y la eficacia de la terapia celular. Hemos demostrado que el lugar en el que se colocan las células (en cuanto a centro o periferia de la cicatriz), y no las células en sí, puede ser un factor crucial determinante de la seguridad y la eficacia de los MBME³³. Concretamente, una inyección directa en el centro de la cicatriz produjo un empeoramiento de la función del VI y causó efectos prorremodelado (aumento de los volúmenes telediastólico y telesistólico del VI) en un modelo del conejo. Por el contrario, la administración en la cicatriz periférica (zona del borde) mejoró los parámetros indicativos de un efecto beneficioso antirremodelado. Además, los datos de monitorización Holter indicaron una mayor prevalencia de arritmias cardíacas en los animales que recibieron MBME en el centro de la cicatriz, en comparación con los que recibieron el tratamiento en la periferia. Estos datos indican claramente que el famoso eslogan de las inmobiliarias «ubicación, ubicación, ubicación» puede aplicarse a la terapia celular con MBME en la insuficiencia cardíaca.

Se ha estudiado el uso de CMN-MO en pacientes con insuficiencia cardíaca, aunque en menor medida que el de MBME³⁰. Los principales ensayos de CMN-MO en el IAM (Transplantation Of Primary Cells And REcovery of LV Function of Patients with Heart Failure [TOPCARE-HF] y BONE marrow transfer o enhance ST-elevation infarct regeneration -2 [BOOST-2]) han aportado resultados prometedores en cuanto a que las CMN-MO

pueden tener efectos beneficiosos también en este contexto. Aunque en un número muy reducido de pacientes, la colocación dirigida de CMN-MO en las zonas isquémicas produjo la salida de varios pacientes de las listas de espera para trasplante gracias a un aumento de la tolerancia al esfuerzo³⁴. Este resultado indica que puede que se obtengan efectos beneficiosos con las CMN-MO en la insuficiencia cardíaca cuando se utiliza una colocación dirigida. Sin embargo, dado el reducido número y la baja capacidad migratoria de las CPE de origen medular que se observa en los pacientes con ECV avanzada e insuficiencia cardíaca¹², será interesante observar si las CMN-MO son capaces de mejorar la función del VI en este medio hostil. Con el empleo de nuevos estudios clínicos se podrá dar respuestas definitivas a estas preguntas.

MÁS ALLÁ DE LOS TIPOS CELULARES: OTRAS CUESTIONES

Los ensayos de terapia celular realizados hasta la fecha plantean tantas preguntas como las que responden. Tanto en los estudios realizados en el IAM como en la insuficiencia cardíaca, las enseñanzas obtenidas corresponden a tres grupos principales: *a)* los protocolos no estandarizados han producido resultados discrepantes en cohortes de pacientes similares; *b)* las características técnicas del procesado celular parecen influir en los resultados, y *c)* las células autólogas tienen limitaciones intrínsecas debido a las repercusiones de la edad y la enfermedad en su disponibilidad y su capacidad funcional.

A medida que se realicen ensayos multicéntricos a gran escala, se resolverá en gran parte la estandarización de los criterios de inclusión y exclusión. Sin embargo, varias preguntas cruciales continúan pendientes de respuesta. ¿Cuáles son las variables de valoración adecuadas en los estudios de la terapia celular? ¿Debemos avanzar hacia variables de valoración de mayor relevancia biológica que reconozcan que las células son organismos biológicos y no sustancias químicas? ¿Son las variables de valoración clínicas o las variables combinadas superiores a los marcadores indirectos sustitutivos? Lamentablemente, el éxito o el posible fracaso de los estudios clínicos en curso que no tengan en cuenta estas complejidades serán lo que dé respuesta a estas cuestiones (fig. 4).

¿LA VÍA DE ADMINISTRACIÓN INFLUYE EN LOS RESULTADOS?

Si los datos citados respecto a los mioblastos de músculo esquelético son ciertos, es muy posible que la vía de administración tenga importancia. En la actualidad se están explorando varias vías. La in-

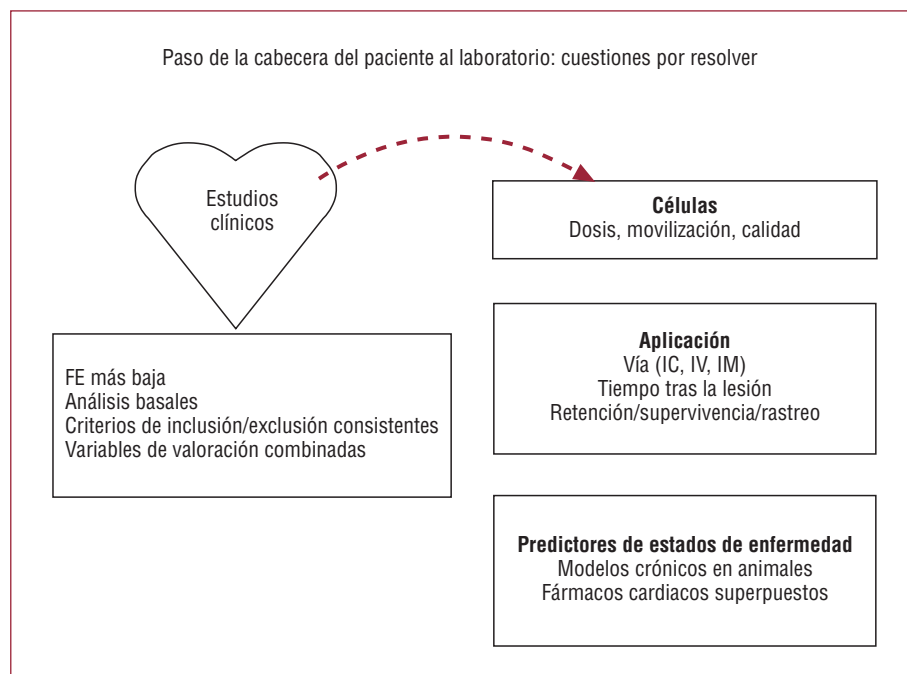


Fig. 4. Vuelta al laboratorio tras los primeros estudios clínicos: cuestiones por resolver. FE: fracción de eyección; IC: intracoronario; IM: intramiocárdico; IV: intravenoso.

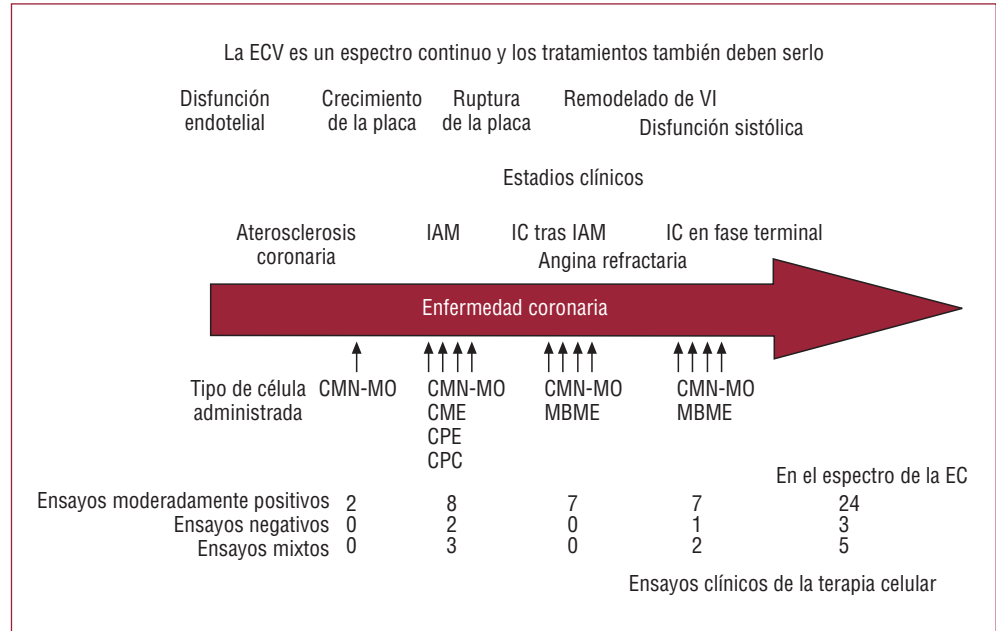
yección directa quirúrgica o toracoscópica en el miocardio cicatrizado o, más recientemente, la inyección endocárdica son aún las vías preferidas para el corazón en insuficiencia. Tras un IAM, la vía de administración principal para las células más pequeñas, como las de la fracción mononuclear de médula ósea, ha sido directamente la circulación coronaria a través del vaso reabierto o tratado con implantación de un *stent*. Tal vez la vía de administración más intrigante sea la intravenosa (i.v.). No sólo hace más llevadera la administración de las células a los pacientes en estado grave, sino que es interesante desde una perspectiva científica, puesto que la administración i.v. puede modificar las citocinas/quimiocinas circulantes de manera diferente que la inyección directa de las células en el miocardio. Es posible que esto acabe desempeñando un papel tanto en el prendimiento de las células exógenas como en la salida de las células madre/CP endógenas de la médula ósea. Recientemente nuestro grupo ha obtenido datos preliminares sobre la biodistribución de las células CD34+ administradas por vía i.v. que respaldan esta suposición. Concretamente, observamos un alojamiento inicial de las células en el hígado, los pulmones y los riñones y una migración posterior hacia el corazón y la médula ósea. Aunque queda mucho trabajo por hacer para comprender la evolución temporal del medio de citocinas/quimiocinas en el IAM y la insuficiencia cardíaca y las formas en que lo modifican diversos tipos celulares, las interacciones de las células de la médula ósea y otras (es decir, las «fabricas de citocinas») con el medio inflamatorio in-

herente a la enfermedad pueden ser el principal factor determinante de la seguridad y la eficacia de la terapia celular. En este momento, nuestro conocimiento de estas interacciones es extremadamente rudimentario. La obtención y la conservación centralizadas de muestras de médula ósea y de sangre en los ensayos de la terapia celular deberán aportar nueva luz sobre muchas de estas cuestiones y nos aproximarán a descifrar los mecanismos de la reparación endógena y la potenciación del proceso por las células de la médula ósea. Estos nuevos conocimientos nos permitirán adaptar los tipos celulares utilizados, el momento de administración y las características clínicas de los pacientes; tal vez de esta forma podamos empezar a disfrutar de todo el potencial de las células para la reparación cardíaca.

ELECCIÓN DE LA CÉLULA ADECUADA SEGÚN LA FASE DE LA ENFERMEDAD

Tal como se indica en la figura 5, se han estudiado clínicamente múltiples poblaciones de células en todo el espectro de la enfermedad cardiovascular, pero todavía no ha surgido un vencedor claro. De hecho, a pesar de las diferencias en el tipo de células y las poblaciones de pacientes, se ha observado un aumento pequeño pero cuantificable de la función cardíaca en muchos de los estudios realizados hasta la fecha (fig. 5). Sin embargo parece razonable asumir que es improbable que un solo tipo celular sea suficiente para restablecer la salud vascular en el tejido aterosclerótico y restablecer el músculo funcional integrado en el miocardio cica-

Fig. 5. La enfermedad cardiovascular es un espectro continuo de enfermedades. La terapia celular debe diseñarse para que refleje la lesión subyacente y debe adaptarse a ella. CMN-MO: células mononucleares de médula ósea; CPC: células progenitoras circulantes; CPE: células progenitoras endoteliales; EC: enfermedad coronaria; ECV: enfermedad cardiovascular; IAM: infarto agudo de miocardio; IC: insuficiencia cardíaca; MBME: mioblastos de músculo esquelético.



trizado. Por el contrario, es probable (y la evidencia inicial así lo indica) que las poblaciones de células mononucleares de la médula ósea sean capaces de producir reparación vascular, mientras que las derivadas del mesénquima de médula ósea, sangre, grasa o mioblastos de músculo esqueléticos contribuyen a la regeneración muscular.

RETOS PENDIENTES

Aún existen muchos retos pendientes si pretendemos utilizar algún tipo de células para reparar con éxito el miocardio que ha sufrido un infarto o que está fallando. La mayoría parecen sencillos, pero se ven dificultados por la extrema heterogeneidad de la ECV. Por ejemplo, los criterios para determinar el prendimiento reproducible de un número elevado de células pueden ser muy diferentes en el paciente en fase inmediatamente posterior a un infarto de miocardio y en el paciente con disfunción cardíaca en fase terminal. De igual modo, el método de administración de las células (quirúrgico o endovascular), la concentración de las células administradas y otra serie de criterios, desde la edad a las enfermedades concomitantes, son factores a tener en cuenta según aparecen nuevos datos de trasplantes de células mixtas de los estudios clínicos. Por último, los retos más significativos de la reparación celular del miocardio dañado derivarán de nuestros intentos de alcanzar algo más que la simple detención de la progresión del deterioro cardiovascular. Los datos preclínicos indican que los factores de crecimiento, los fibroblastos u otras células pueden ser capaces de retardar o incluso me-

jorar la disfunción diastólica^{35,36}. Pero si queremos mejorar la contractilidad del corazón que ha sufrido un infarto, debemos implantar células que puedan integrarse eléctricamente en el corazón y sobrevivir durante largos periodos. Esto puede requerir algo más que el simple prendimiento celular y dependería en última instancia de injertos desarrollados mediante ingeniería, en los que podamos garantizar aporte de nutrientes e irrigación sanguínea en el tejido infartado y proteger el miocardio circundante del remodelado mecánico y la descompensación secundarios a estos injertos. Aunque esto no está en la primera línea de la reparación del miocardio en la actualidad, es un campo que no puede dejarse de lado.

EL FUTURO: ¿LOS ÓRGANOS BIOARTIFICIALES BASADOS EN CÉLULAS PUEDEN RESOLVER LA ESCASEZ DE DONANTES?

El objetivo principal del tratamiento del IAM y la insuficiencia cardíaca es el restablecimiento de la función del VI. Esto puede alcanzarse durante un lapso de tiempo con el empleo de técnicas médicas orientadas a mejorar la precarga y la poscarga y mediante la inhibición de las señales que gobiernan el remodelado del resto del miocardio y culminan en el fallo de éste. Los trasplantes de células al corazón dañado tienen, cuando menos teóricamente, el potencial de restablecer la función mediante la reposición directa de las células cardíacas perdidas por lesión y enfermedad. Sin embargo, para que sean efectivas, las nuevas células deben prender en

número suficiente para impedir la formación una cicatriz fibrosa o incluso para regenerar en ella músculo cardíaco.

Otro enfoque, de magnitud mucho más ambiciosa, es el desarrollo mediante bioingeniería de un tejido cardíaco funcional (fig. 3). Esta idea de la bioingeniería cardíaca se ha expandido en los últimos 10 años. La mayoría de los estudios se basa en el empleo de un soporte artificial (hidroxiapatita, colágeno, fibrina, etc.) que se siembra con células y se cultiva en el laboratorio antes de utilizarlo como parche cardíaco. En principio, este parche podría ser un producto disponible de manera general para aplicarlo a la cicatriz con el objetivo de restablecer una contracción funcional y reducir el riesgo de formación de un aneurisma al adherirse las células del parche y generar una fuerza contráctil *in vivo*. El método mejor conocido de elaboración de parches cardíacos mediante bioingeniería es la aplicación de miocardiocitos neonatales a un gel de colágeno que luego se somete a distensión mecánica cíclica para inducir la maduración^{37,38}. A la vista de una de las principales limitaciones de la ingeniería de tejido cardíaco (la dificultad de producir un tejido cardíaco tridimensional grueso debido a la elevada demanda de perfusión de las células cardíacas), nuestro grupo ha emprendido un enfoque diferente. Dado que la naturaleza ha desarrollado un soporte que sirve de base para el corazón, nuestra hipótesis es que podríamos eliminar mediante lavado los componentes celulares del miocardio para obtener un soporte tridimensional formado por matriz extracelular cardíaca nativa en la estructura original de cuatro cámaras del corazón. De esta forma, como la matriz de los principales conductos vasculares debe permanecer en su lugar, dispondríamos de un soporte perfusible al que podamos volver a aplicar células para construir una estructura cardíaca tridimensional o incluso un corazón entero. Mediante la recelularización de la matriz miocárdica descelularizada con las células que dan lugar al corazón maduro, deberíamos poder generar una estructura miocárdica que se contraiga de forma sincrónica, responda a los fármacos y bombee en contra de una poscarga. Nuestro grupo ha conseguido alcanzar todos estos objetivos y recientemente hemos publicado la caracterización del constructo de corazón bioartificial. De forma resumida³⁹, hemos eliminado por completo las estructuras celulares (con persistencia de menos del 3% del ácido desoxirribonucleico) de un corazón de rata o de cerdo con el empleo de una descelularización con perfusión de detergente. El proceso de eliminación celular no redujo de manera significativa los glucosaminoglucanos de la matriz miocárdica. Las pruebas de resistencia a la tensión fueron similares en el corazón de rata descelularizado y en ma-

trices de cadáver. Y la matriz descelularizada tuvo un módulo tangencial significativamente superior al de la fibrina (un material utilizado por otros autores como soporte). La perfusibilidad de la matriz se demostró mediante la infusión de resina para generar moldes que mostraron la integridad estructural del árbol vascular a partir de los vasos coronarios principales y hasta los vasos de cuarto y quinto orden y mediante trasplantes heterotópicos del constructo descelularizado y la obtención de angiografías que mostraron un flujo de entrada de sangre básicamente normal. La recelularización de esta matriz se realizó mediante la infección de células neonatales en la matriz en un biorreactor. El constructo maduró durante un tiempo y a los 8-10 días se registraron contracciones razonables de los segmentos de VI recelularizados. La caracterización histológica del constructo recelularizado mostró células vivas que expresaban la proteína de cadena pesada de miosina, factor von Willebrand, células CD31+, conexina 43 y otros marcadores. Así, nos hemos aproximado un paso más a la creación de un órgano autólogo y hemos construido un instrumento para verificar hipótesis de interés en la biología del desarrollo, la fisiopatología de la enfermedad y la terapia celular. De esta forma, hemos superado en una medida razonable varias limitaciones importantes de la ingeniería de tejidos cardíacos. Evidentemente, el tiempo determinará cuál de los actuales enfoques de ingeniería se traduce en un producto clínico. Aunque los parches cardíacos parecen prometedores para un aspecto específico de la reparación cardíaca, la creación de constructos de órganos a través del enfoque de descelularización-recelularización parece poder trasladarse a otros órganos (fig. 6) como el riñón, el hígado, el páncreas y los pulmones, que se ven afectados también por la ECV.

CONCLUSIONES

La terapia celular ha surgido como un nuevo instrumento de la cardiología en la última década. Los ensayos clínicos iniciales de fase I y los primeros de fase II han aportado resultados prometedores, pero también lecciones para aprender antes de continuar avanzando. Para tener éxito en este campo, es imprescindible que alcancemos un nivel más profundo de conocimiento desde el punto de vista de los mecanismos de la reparación celular a través de todo el espectro de la ECV. Proponemos que las interacciones entre las células y el medio de citocinas específico existente durante cada estado fisiopatológico, desde la aterosclerosis coronaria hasta la insuficiencia cardíaca en fase terminal, influyen en la capacidad de las células de prender, diferenciarse y tener una función adecuada. Proponemos también

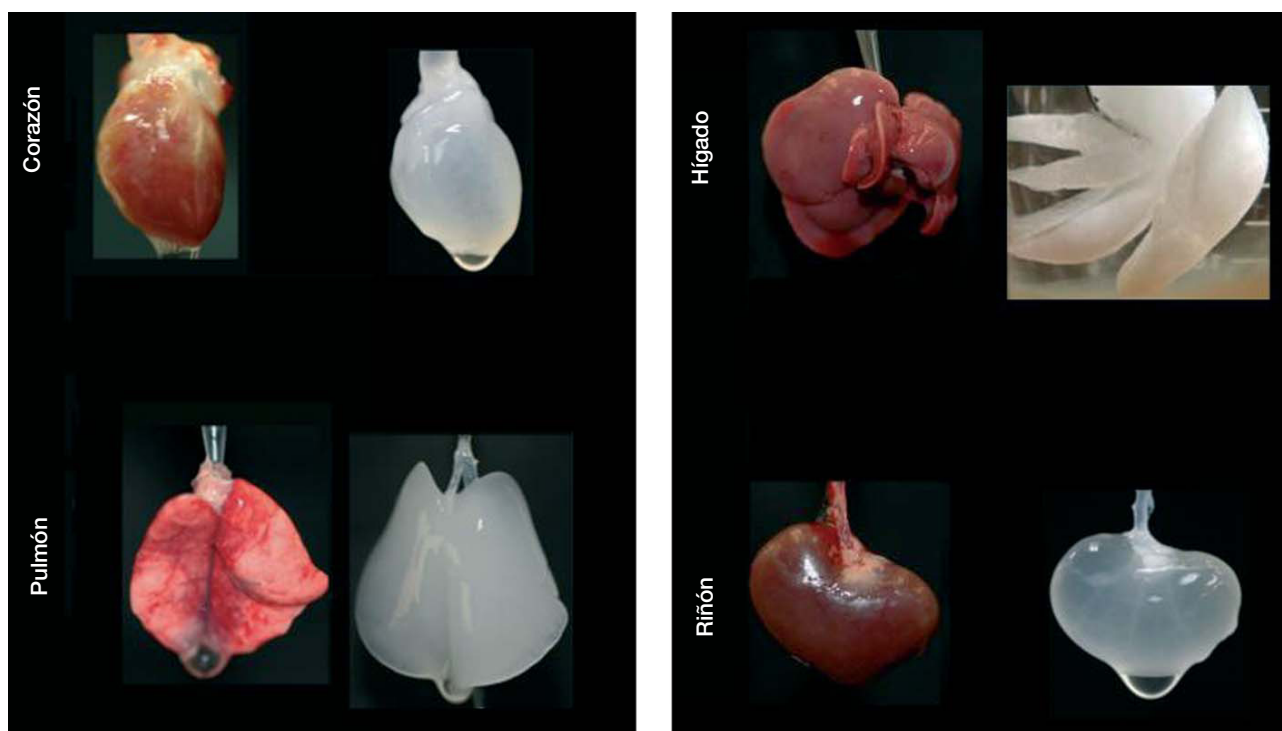


Fig. 6. El futuro de la terapia celular puede incluir la bioingeniería del órgano completo. La perfusión de estructuras de sostén descellularizadas del órgano en la rata muestra un potencial de generar soportes para una bioingeniería compleja de todo el órgano.

que, dentro de una ventana temporal, los pacientes responderán de manera diferente según su grado de lesión cardíaca o vascular. En consecuencia, deberemos definir con mayor precisión los subgrupos de pacientes y los tipos celulares que puedan ser útiles en cada uno de ellos. Esto requerirá conocer la capacidad de las poblaciones celulares de modificar la inflamación, prevenir la muerte celular de los cardiocitos o fomentar la supervivencia y su capacidad de fomentar la angiogénesis y la miogénesis tanto en el contexto agudo como en el crónico. Con el conocimiento de estos parámetros debemos ser capaces de optimizar el momento de administración de las células para poder aportar efectos antirremodelado que se mantengan y alivio sintomático. Junto con la terapia celular, la ingeniería de tejidos cardiovasculares es una nueva frontera en el tratamiento de la ECV. Aunque los éxitos obtenidos son muy preliminares, construir órganos bioartificiales parciales o completos podría llegar a ser realidad y aportar una amplia gama de soluciones en el futuro. Para continuar avanzado, el traslado de los métodos más recientes, como la descellularización-rece-lularización de perfusión, a la bioorganogénesis de otros órganos afectados por la ECV (riñones, pulmones, hígado) será de crucial importancia. A pesar de que todavía tenemos décadas de trabajo por delante, no podemos olvidar por qué nos dedicamos a buscar posibles nuevos tratamientos. Año tras año, la ECV continúa siendo una causa importante de

muerte; a medida que aumenta la edad de la población, aumenta la necesidad de tratamientos para reducir la morbimortalidad cardiovascular. Alcanzar este difícil objetivo requerirá dedicación y colaboración de científicos, clínicos y pacientes para trasladar el conocimiento de estos nuevos tratamientos del laboratorio a la cabecera del paciente y, si es necesario, volver, una vez más, de regreso al laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rosamond W, Flegal K, Friday G, Furie K, Go A, Greenlund K, et al. Heart disease and stroke statistics—2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*. 2007;115:e69-171.
2. Juonala M, Viikari J, Rasanen L, Helenius H, Pietikainen M, Raitakari O. Young adults with family history of coronary heart disease have increased arterial vulnerability to metabolic risk factors: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Arterioscl Thromb Vasc Biol*. 2006;26:1376-82.
3. Haffner SM. Can reducing peaks prevent type 2 diabetes: implication from recent diabetes prevention trials. *Intl J Clin Pract Suppl*. 2002;129:33-9.
4. Pearson TA, Blair SN, Daniels SR, Eckel RH, Fair JM, Fortmann SP, et al. AHA Guidelines for Primary Prevention of Cardiovascular Disease and Stroke: 2002 Update: consensus panel guide to comprehensive risk reduction for adult patients without coronary or other atherosclerotic vascular diseases. American Heart Association Science Advisory and Coordinating Committee. *Circulation*. 2002;106:388-91.

5. Wyatt SB, Winters KP, Dubbert PM. Overweight and obesity: prevalence, consequences, and causes of a growing public health problem. *Am J Med Sci.* 2006;331:166-74.
6. Nissen SE. Who is at risk for atherosclerotic disease? Lessons from intravascular ultrasound. *Am J Med.* 2002;112 Suppl 8A:S27-33.
7. Taylor DA, Zenovich AG. Cardiovascular cell therapy and endogenous repair. *Diabetes Obes Metab.* 2008;10 Suppl 4:5-15.
8. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med.* 2003;348:593-600.
9. Nelson WD, Zenovich AG, Ott HC, Stolen C, Caron GJ, Panoskaltis-Mortari A, et al. Sex-dependent attenuation of plaque growth after treatment with bone marrow mononuclear cells. *Circ Res.* 2007;101:1319-27.
10. Rauscher FM, Goldschmidt-Clermont PJ, Davis BH, Wang T, Gregg D, Ramaswami P, et al. Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis. *Circulation.* 2003;108:457-63.
11. Definition of stem cell. En: WebMD. San Clemente: MedicineNet; 2001:1.
12. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med.* 2005;353:999-1007.
13. Wang J-S S-TD, Chedrawy E, Eliopoulos N, Galipeau J, Chiu RC-J. Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: the importance of microenvironment for milieu dependent differentiation. *Circulation.* 2000;102 Suppl 2:683.
14. Tse H, Thammar S, Kwong Y, Rowlings P, Bellamy G, McCrohon J, et al. Safety of catheter-based intramyocardial autologous bone marrow cells implantation for therapeutic angiogenesis. *Am J Cardiol.* 2006;98:60-2.
15. Tse HF, Kwong YL, Chan JK, Lo G, Ho CL, Lau CP. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet.* 2003;361:47-9.
16. Chaitman B. Ranolazine for the treatment of chronic angina and potential use in other cardiovascular conditions. *Circulation.* 2006;113:2462-72.
17. 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;4:929-33.
18. Zenovich AG, Davis BH, Taylor DA. Comparison of intracardiac cell transplantation: autologous skeletal myoblasts versus bone marrow cells. *Handb Exp Pharmacol.* 2007;180:117-65.
19. Abdel-Latif A, Bolli R, Tleyjeh IM, Montori VM, Perin EC, Hornung CA, et al. Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med.* 2007;167:989-97.
20. Hristov M, Heussen N, Schober A, Weber C. Intracoronary infusion of autologous bone marrow cells and left ventricular function after acute myocardial infarction: a meta-analysis. *J Cell Mol Med.* 2006;10:727-33.
21. Lipinski MJ, Biondi-Zoccai GG, Abbate A, Khianey R, Sheiban I, Bartunek J, et al. Impact of intracoronary cell therapy on left ventricular function in the setting of acute myocardial infarction: a collaborative systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *J Am Coll Cardiol.* 2007;50:1761-7.
22. Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egelund T, et al. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2006;355:1199-209.
23. 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 Suppl:1178-83.
24. Schuleri KH, Amado LC, Boyle AJ, Centola M, Saliaris AP, Gutman MR, et al. Early improvement in cardiac tissue perfusion due to mesenchymal stem cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;294:H2002-11.
25. Anversa P, Nadal-Ginard B. Myocyte renewal and ventricular remodelling. *Nature.* 2002;415:240-3.
26. Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussen V, Mishina Y, et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:12313-8.
27. Urbanek K, Torella D, Sheikh F, De Angelis A, Nurzynska D, Silvestri F, et al. Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:8692-7.
28. Ott HC, Matthiesen TS, Brechtken J, Grindle S, Goh SK, Nelson W, et al. The adult human heart as a source for stem cells: repair strategies with embryonic-like progenitor cells. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2007;4 Suppl 1:S27-39.
29. Smith RR, Barile L, Cho HC, Leppo MK, Hare JM, Messina E, et al. Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens. *Circulation.* 2007;115:896-908.
30. Taylor DA, Zenovich AG. Cell therapy for left ventricular remodeling. *Curr Heart Fail Rep.* 2007;4:3-10.
31. Chachques JC, Herreros J, Trainini J, Juffe A, Rendal E, Prosper F, et al. Autologous human serum for cell culture avoids the implantation of cardioverter-defibrillators in cellular cardiomyoplasty. *Int J Cardiol.* 2004;95 Suppl 1:S29-33.
32. Menasché 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;117:1189-200.
33. McCue JD, Swingen C, Feldberg T, Caron G, Kolb A, Denucci C, et al. The real estate of myoblast cardiac transplantation: negative remodeling is associated with location. *J Heart Lung Transplant.* 2008;27:116-23.
34. Silva G, Perin E, Dohmann H, Borojevic R, Silva S, Sousa A, et al. Catheter-based transendocardial delivery of autologous bone-marrow-derived mononuclear cells in patients listed for heart transplantation. *Tex Heart Inst J.* 2004;31:214-9.
35. Jong P, Yusuf S, Rousseau MF, Ahn SA, Bangdiwala SI. Effect of enalapril on 12-year survival and life expectancy in patients with left ventricular systolic dysfunction: a follow-up study. *Lancet.* 2003;361:1843-8.
36. Schmidt-Lucke C, Rossig L, Fichtlscherer S, Vasa M, Britten M, Kamper U, et al. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation.* 2005;111:2981-7.
37. Eschenhagen T, Didie M, Munzel F, Schubert P, Schneiderbanger K, Zimmermann WH. 3D engineered heart tissue for replacement therapy. *Basic Res Cardiol.* 2002;97 Suppl 1:I146-52.
38. Zimmermann WH, Didie M, Wasmeier GH, Nixdorff U, Hess A, Melnychenko I, et al. Cardiac grafting of engineered heart tissue in syngenic rats. *Circulation.* 2002;106 Suppl 1:I151-7.
39. Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, Black LD, Kren SM, Netoff TI, et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med.* 2008;14:213-21.