

9. Reparación cardiaca con células madre

ANA SÁNCHEZ GARCÍA Y JAVIER GARCÍA-SANCHO

RESUMEN

A pesar de muchos retrocesos y decepciones, naturales durante el establecimiento de cualquier terapia nueva, la cardiología regenerativa ofrece un enorme potencial terapéutico. Las células de la médula ósea (CMO) y las células madre mesenquimales (CMM) han sido, por ahora, las más utilizadas en los ensayos clínicos. Las primeras tienen la ventaja de su archicomprobada seguridad, pero los datos recientes sugieren que las CMM podrían tener mayor plasticidad. Las células del estroma de la médula ósea están en la intersección entre estas dos categorías. Los ensayos clínicos con CMO han mostrado resultados terapéuticos relativamente modestos y sería conveniente revisar protocolos y diseños para aumentar la eficacia. Es esencial obtener más información acerca de los mecanismos para llevar a cabo modificaciones racionales del diseño, y esto requiere aumentar la investigación básica asociada a los ensayos clínicos. La experimentación en animales grandes, más próximos al modelo humano, sería de gran ayuda para refinar los protocolos. Por otro lado, los modelos *in vitro* son muy útiles para probar rápida y simultáneamente un gran número de modificaciones sistemáticas. Las células madre residentes cardíacas (CMRC) han despertado grandes expectativas y la puesta a punto de fármacos capaces de activar, movilizar y estimular las CMRC para generar cardiomiocitos *in situ*, así como la expansión de la CMRC *in vitro* son dos objetivos claros. Algunas poblaciones de progenitores cardíacos podrían también rellenarse con CMO circulantes. Las células madre embrionarias (CME) necesitarán más tiempo para entrar en la terapéutica, pero la investigación con

CME es igualmente importante y debe servir de fuente de inspiración para la medicina regenerativa. La producción de células pluripotentes inducidas (iPS) abre una vía completamente nueva, que acerca las células madre adultas y embrionarias. La investigación con distintos tipos de células madre no es antitética, sino complementaria.

Palabras clave: células de la médula ósea, regeneración cardiaca, terapia celular, células madre, diferenciación, transdiferenciación.

ABSTRACT

Despite drawbacks and deceptions, which are connatural to the implementation of any new therapy, regenerative cardiology offers a promising therapeutic potential. Bone marrow cells (BMC) and mesenchymal stem cells (MSC) are the cells most often used in human trials. The first ones have the advantage of biosecurity, although recent research suggests that plasticity of MSC may be larger. Stromal bone marrow cells are at the intersection. Clinical assays with BMC have shown only modest therapeutic results, and it may be the time to revise protocols and designs to look for improvements. Getting insight into the mechanisms would be most important for rational modifications of the design, and this may require more basic research associated to clinical trials. Animal work in models closer to humans would be most helpful for refining protocols, and simplified in vitro models should be most useful for testing putative protocols as they allow quick and controlled screening of many variants. Recently discovered cardiac stem cells (CSC) add new expectancies. Drugs to awake, mobilize and stimulate CSC, to generate cardiomyocytes in situ or expansion of CSC in vitro two of the most obvious goals. Some cardiac progenitor pools can also be refilled by circulating BMC. Embryonic stem cells (ESC) will need more time to enter into therapeutics, but investigation on ESC is equally important and should inspire regenerative medicine. Recently discovered induced pluripotent stem cells (iPS cells), in which nuclear reprogramming of the nucleus dedifferentiates adult cells to PS cells are most promising to circumvent some of the problems posed by ESC. Research on different types of stem cells is not antithetical, but complementary.

«¡Despierta corazón, despierta!
Ya has dormido suficiente; ¡Despierta!»

WILLIAM SHAKESPEARE.
La Tempestad. Acto 1. Escena 2.

¿ES INMORTAL NUESTRO CORAZÓN?

Es muy importante que reconozcamos la capacidad regenerativa del corazón pues, de lo contrario, tras una lesión destructiva del tejido cardíaco nuestros esfuerzos se limitarían a intentar preservar lo que sobrevivió después de un accidente isquémico, sin tan siquiera pensar en otras posibilidades terapéuticas. Sabemos hoy que en el ratón, el número de células que entran en el ciclo mitótico cada día, medidas con bromodeoxiuridina, es el mismo que el de las células que entran en apoptosis: entre el 0,25 y el 1 % de la población total de cardiomiocitos. Esto representa una renovación total del tejido cardíaco del ratón en menos de un año (1). En el caso del corazón humano, con cifras de recambio en torno al 0.06%, la renovación total ocurriría en 4-5 años (2). Otras estimaciones del recambio cardíaco, oscilan entre 0.0005 y 3% (3).

Sin embargo, es bien conocido que después de un infarto agudo de miocardio (IAM) el parénquima cardíaco no regenera espontáneamente. Durante el denominado *remodelado cardíaco* la lesión es substituida por una cicatriz de tejido fibroso, sugiriendo que el potencial de las células madre residentes cardíacas (CMRC) no es suficiente para una reposición significativa del tejido lesionado.

REPARACIÓN CARDIACA POR CÉLULAS DE LA MEDULA ÓSEA

El interés en la regeneración cardíaca y su aplicación clínica arrancó en 2001 cuando Orlic y colaboradores (4) demostraron que células Lin-negativas y *ckit*-positivas procedentes de médula ósea (MO), eran capaces de reparar infartos agudos de miocardio en ratón, reponiendo «de novo» tanto el músculo como los vasos, y logrando una notable recuperación funcional en 9 días.

La novedosa hipótesis en la que se sustentaban tales hallazgos era la generación de cardiomiocitos, endotelio y músculo liso a partir de progenitores de MO. La plasticidad de células madre adultas está en un momento de intenso debate, que a veces supera el terreno científico, por lo que el lector interesado debe examinar revisiones recientes en este campo (2, 5-9). Es bien conocido que infartos de miocardio agudos de gran extensión, conducen casi indefectiblemente a la insuficiencia cardíaca en cinco años. Por otra parte, la eficacia y seguridad de las células progenitoras de médula ósea ya ha sido extensamente probada en el tratamiento de enfermedades hematológicas en los últimos 50 años. No es de extrañar, por tanto, que los intentos de tratar el IAM en los pacientes con células progenitoras de médula ósea no se hiciesen esperar. Los resultados del primer ensayo clínico fueron publicados un año después del artículo de Orlic (10), y en la actualidad han sido ya tratados más de mil pacientes. Los resultados obtenidos en varios ensayos y metaanálisis se resumen en la Tabla 1 (10-21). Como puede verse, la factibilidad y seguridad de los ensayos está demostrada, pero la eficacia es modesta. Por ejemplo, en la fracción de eyección algunos autores muestran una mejora del 5-6%, mientras que otros no ven mejoría alguna. La misma ligera mejoría se puede aplicar a otros parámetros estudiados. Parece claro, pues, que existen diferencias con los magníficos resultados previamente obtenidos en roedores. Este punto debería ser tomado en consideración antes de iniciar nuevos ensayos (22, 23).

Por otra parte, las diferencias en el diseño, la selección, el origen celular, dosis, vía y momento de aplicación hacen que los resultados sean difíciles de comparar. Pero el principal problema es que no tenemos una idea clara de la interpretación a nivel celular de los resultados obtenidos, ya que solamente en algunos casos se han llevado a cabo ensayos celulares básicos en paralelo (12, 13). Los resultados iniciales fueron interpretados en términos de transdiferenciación de las células de la MO a cardiomiocitos y capilares, como en el ratón. Sin embargo, otras hipótesis como la angiogénica y la paracrina han cobrado gran fuerza en la actualidad. En el primer caso, los precursores de células endoteliales producirían capilares que ayudarían a preservar más cardiomiocitos en la zona de penumbra. En el segundo, las células infundidas producirían factores tróficos que evitarían la muerte celular y/o estimularían la proliferación de las células madre residentes (2, 3, 5, 8).

REPARACIÓN CARDIACA CON CÉLULAS MADRE

TABLA 1. *Ensayos clínicos de regeneración cardiaca.*

<i>Estudio</i>	<i>Diseño</i>	<i>Núm. Cels.</i>	<i>Núm. Pacientes (Seguimiento)</i>	<i>FE</i>	<i>Otros resultados</i>
Strauer y col., 2002 (10)	CMO (F)	1-3x10 ⁷	10 (3 meses)	NS	Disminución tamaño infarto. Mejora volumen/contracción, volumen sistólico final, contractilidad y movilidad de la pared
TOPCARE-AMI, Assmus y col., 2002 (11)	CMO (F) CircPg	2.5x10 ⁸ 8x10 ⁷	9 and 11 (4 meses)	+8%	Mejora viabilidad miocárdica, volumen sistólico final y movilidad de la pared. Resultados similares al año en (30+29 pacientes) (Schachinger y col., 2004 (12))
TECAM, Fernandez-Aviles y col., 2004 (13)	CMO (F)	8*10 ⁷	20 (6 meses)	+6%	Mejora volumen sistólico final y función regional. Aumento del grosor de la pared infartada
BOOST, Wollert y col., 2004 (14); Meyer y col., 2006 (15)	CMO (T) Aleatorizado	2.5x10 ⁹	30 (6 meses)	+6% NS	Recuperación más rápida con CMO?
Janssens y col., 2006 (16)	CMO (F) Aleatorizado, doble ciego	3x10 ⁸	33 (3 meses)	NS	Disminución tamaño infarto. Mejora de función regional
ASTAMI, Lunde y col., 2006 (17)	BMC (F) Aleatorizado	7*10 ⁷	47 (6 meses)	NS	No diferencias en el tamaño del infarto.
REPAIR-AMI, Schachinger y col., 2006 (18)	BMC (F) Aleatorizado, doble ciego	2.4*10 ⁸	101 (4 meses)	5.5%	El placebo aumento la FE 3%. Mejores resultados en pacientes con mayor caída de la FE. Reducción de eventos clínicos adversos a los 12 meses

Mejores resultados en pacientes con mayor caída de la FE

Reducción de eventos clínicos adversos a los 12 meses

La administración fue, en todos los casos, intracoronaria.

FE, Fracción de eyección; CMO, Células de la médula ósea. CircPg, progenitores circulantes obtenidos

por aféresis; (T), CMO totales sin fraccionar; (F), CMO separadas en ficoll. NS: No significativo

Resultados similares se obtuvieron en los meta-análisis de Abdel-Latif y col., 2007(19), Assmus y col., 2006 (20) y Martín-Rendon y col., 2008 (21)

CÉLULAS MADRE RESIDENTES

Otra frontera en el campo de la regeneración cardíaca ha sido la identificación de células madre *residentes* cardíacas (CMRC). La caracterización y clonación de las CMRC en el corazón adulto son muy recientes (2, 5, 6, 24-26).

La Figura 1 resume algunas características de CMRC y de los progenitores. Las CMRC se encuentran en nichos específicos diseminados en el espesor de la pared cardíaca (27). En muchos casos expresan varios marcadores de células madre, como el c-Kit. (El receptor del factor de crecimiento de células madre o SCF, de *Stem Cell Factor*), el antígeno 1 de célula madre (Sca-1) o la glicoproteína P (también llamada MDR-1, de *Multi-Drug Resistance*), o incluso todos ellos. Las CMRC pueden realizar división asimétrica, lo que asegura la auto-renovación. Son células multipotenciales, capaces de originar progenitores cardíacos (PgC) comprometidos a cada uno de los linajes cardíacos, cardiomiocitos, células del músculo liso y células endoteliales (Figura 1).

Los progenitores cardíacos tienen la capacidad de proliferar y convertirse en precursores (PrC) y, finalmente, en células diferenciadas. Se cree que el factor que define la tasa de expansión para las CMRC de ratón ronda el 1000x. La cantidad de cardiomiocitos nuevos producidos diariamente en el corazón humano ha sido cuantificada en aproximadamente 5×10^6 , pero podría verse incrementado unas 100 veces tras un IAM. Este incremento se debe por un lado al crecimiento en el número de CMRC y a un aumento en la frecuencia del ciclo celular. Las CMRC también aumentan durante la hipertrofia cardíaca inducida por la estenosis aórtica (28).

Recientemente se han caracterizado otras progenitoras cardíacas llamadas de la población colateral (SPC, de *side-population cells*) por su capacidad para excluir el tinte vital Hoechst 3342 (29). Las SPC son capaces de transformarse en cardiomiocitos si existe interacción (que no implica fusión celular) con cardiomiocitos adultos. Las SPC pueden ser derivadas de las células de la médula ósea (CMO) (30) (ver más adelante). Finalmente, hemos de tener en cuenta las células isl-1. Estas células, que expresan el gen homeobox islet-1 (isl-1) están también presentes en el corazón adulto, aunque en un pequeño número y restringidas al lado derecho (31). Muy recientemente han despertado gran interés las células

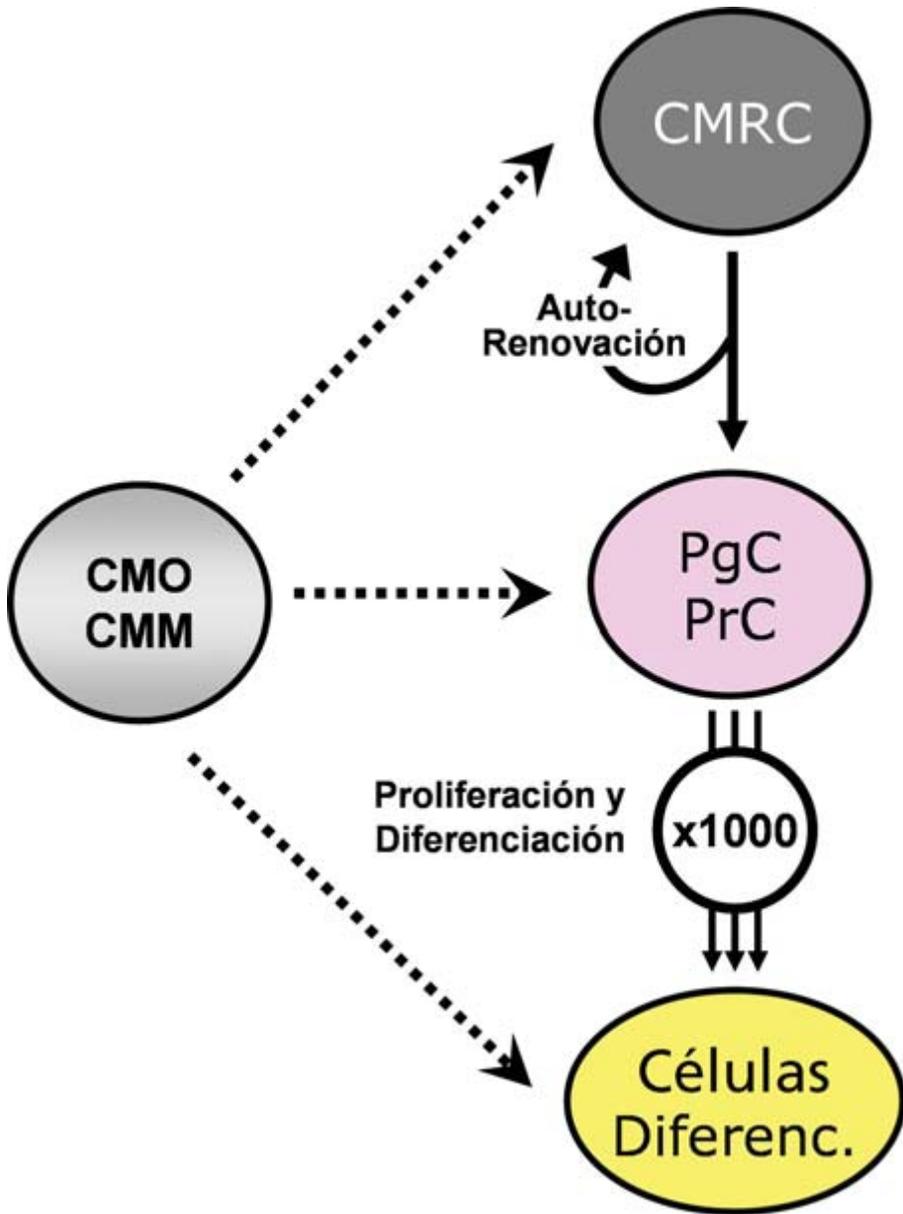


FIGURA 1. **Células madre cardíacas Intrínsecas y extrínsecas.** CMRC, *Célula Madre Residente Cardíaca* (Positiva para *c-kit*, *Sca-1* and *MDR-1+*); PgC, *Progenitores Cardíacos* (Comprometidos); PrC, *Precursores Cardíacos*; CMO, *Células de la Médula Ósea*; CMM, *Células Madre Mesenquimales*; Las *Células Diferenciadas* incluyen *cardiomiocitos*, *células de músculo liso*, *células endoteliales*.

derivadas del proepicardio. Estas células, que permanecen latentes es la cavidad pericárdica después del nacimiento, serían una excelente fuente de progenitores comprometidos en el adulto (32). El proepicardio embrionario es el responsable de la formación del sistema coronario y parte del miocardio y, por tanto, un linaje estratégico que ha merecido una atención muy especial el último año (33, 34).

EL ORIGEN DE LAS CÉLULAS MADRE RESIDENTES CARDIACAS

Está claro que las células Isl-1 son restos de los cardioblastos primitivos (35), pero el origen de otras CMRC no está resuelto en la actualidad. Podrían representar restos de células pluripotentes del período embrionario o ser la expresión de células madre extrínsecas que colonizaron el corazón llegando a través de la sangre, tal y como se indica en las flechas discontinuas de la Figura 1. Esta posibilidad fue apuntada por primera vez tras la observación de quimerismo en trasplantes en los que se utilizaron células donantes del sexo opuesto. Por ejemplo, se constató en mujeres que recibieron trasplantes de médula ósea donada por hombres, que algunos cardiomiocitos mostraban el cromosoma Y (36). Paralelamente, en varones transplantados con un corazón proveniente de una donante femenina se detectó la presencia de cardiomiocitos, células del músculo liso y, más frecuentemente, las células endoteliales que portaban cromosoma Y (8, 37). Estos resultados sugieren que las CMO pueden anidar en el corazón y producir CMRC, PgC, PrC o células diferenciadas (Figura 1). Por tanto, el origen de las nuevas células cardíacas podría ser doble, intrínseco o extrínseco. El proceso por el cual se produce la transformación de CMO a células cardíacas podría ser transdiferenciación o desdiferenciación de una célula madre comprometida o diferenciación de una célula madre pluripotencial proveniente de la médula ósea (1,2). En cualquier caso, se ha demostrado recientemente que algunas CMO son clonogénicas y tienen la capacidad de autorrenovarse y de llevar a cabo una diferenciación hacia tres linajes: cardiomiocitos, células del músculo liso y endoteliales (38). Con respecto a las SPC se ha demostrado que después de un IAM, las CMO se instalan en lugares específicos de la zona afectada del miocardio y adquieren el fenotipo PgC (30). Por otro lado, algunos estudios indepen-

dientes sobre clonación han demostrado que las células estromales adultas de médula pueden dar origen a las llamadas células cardiomiogénicas (CMG) que se diferencian a cardiomiocitos (6,39). Entre las células de MO, las células estromales, generalmente llamadas células mesenquimales tienen una mayor plasticidad para producir células diferenciadas que otros tipos celulares provenientes de médula ósea (5). Las células madre mesenquimales (CMM) se pueden obtener de otros tejidos además de la médula ósea (40).

LA CUESTIÓN DE LA CANTIDAD

Una cuestión sumamente importante es la cantidad de células madre que se necesitan para alcanzar una mejoría significativa en la recuperación de las lesiones isquémicas de corazón. Cuando extrapolamos los datos de ratón al ser humano hay un problema de tamaño, ya que el corazón de ratón pesa aproximadamente 0,07 gramos y el humano unos 350, lo que da una relación de 1 a 5000. Las dimensiones de los cardiomiocitos humanos adultos son $141 \times 19 \mu\text{m}$ (41), que corresponde a un peso celular de 41×10^{-6} mg. Un corazón adulto contendría por tanto $8,5 \times 10^9$ cardiomiocitos y un infarto extenso podría matar aproximadamente 3×10^9 . En la acelerada tasa de producción de cardiomiocitos observada tras un IAM (aproximadamente 5×10^8 al día) el parénquima destruido podría regenerarse en una o dos semanas (2,42). Está claro que esto no pasa de forma espontánea después del IAM, quizás porque las células madre de la zona infartada mueren y/o porque las que se encuentran lejos no migran de modo eficiente al área dañada (2,26). Es importante señalar también que las CMRC se tornan mucho menos activas con el paso del tiempo y habitualmente los pacientes con IAM son de edad avanzada.

¿Podría ser cuantitativamente importante la contribución de CMO en los ensayos clínicos de regeneración cardiaca? En la mayoría de los ensayos se han aplicado de cien a trescientos millones, de los cuales tan sólo se retienen de 1 al 3%, en la zona del infarto (43). Esto nos deja con solo 4×10^6 células. Las células inyectadas deberían expandirse por lo tanto 750 veces para reponer las 3×10^9 que se han perdido en un infarto grande. Este valor está justo por debajo del límite máximo de expansión propuesto en la Figura 1. Este valor ideal de 1000x está extrapolado de

los datos obtenidos en el ratón y corresponde a 10 divisiones, pero sólo tres más incrementarían el límite de expansión en un orden de magnitud.

¿CUAL ES LA LLAMADA PARA LAS CÉLULAS MADRE?

Debe existir algún mensajero que haga a las células residentes dividirse o que promueva el anidamiento de las circulantes hacia el tejido lesionado (6,30). En el corazón de ratón, las células de medula ósea inyectadas se acumulan selectivamente en el área lesionada (4, 13). En el corazón de pollo en desarrollo, las CMO inyectadas también se dirigen a la lesión (44). El mensajero debería ser similar en todos los tejidos y ser liberado por las células dañadas. En estudios muy elegantes, Lin y colaboradores (45) estudiaron el anidamiento a largo plazo de células marcadas genéticamente en ratones hembra receptores que habían sido sometidos a experimentos de isquemia-reperfusión renal unilateral. Las células de medula ósea solo anidaron en el riñón afectado. Citoquinas como el factor estimulador de colonias (G-SCF) o el factor de crecimiento de células madre (SCF de *Stem Cell Factor*), movilizan progenitores de la medula ósea, contribuyendo a la reparación cardíaca (2). El factor estimulador de colonias G-CSF también estimula la migración y diferenciación a cardiomiocitos de células cardiomiogénicas derivadas de células estromales. Los extractos de células embrionarias, ricos en factores de crecimiento, podrían ser también medios condicionados adecuados, ya que en presencia de células embrionarias, las células madre adultas ven favorecida su plasticidad (46). Las células embrionarias (CME) son una fuente muy atractiva para la generación de cardiomiocitos, pero no existen métodos para lograr su diferenciación selectiva. Por otro lado, los problemas éticos y de bioseguridad deben resolverse antes de pasar al uso clínico (6,47). Especial mención requieren las recientemente descubiertas células madre pluripotentes inducidas (iPS). Se obtienen induciendo la desdiferenciación de una célula adulta, generalmente conseguida forzando la expresión de 2-4 genes utilizando virus (48, 49). Las iPS adquieren muchas de las características de las células embrionarias (50) (ver capítulo 3), pero tienen exactamente el mismo material genético que el donante, por lo que podrían reimplantarse en él sin generar respuestas inmunológicas. Pueden formar, sin embargo, teratomas, por lo que su bioseguridad debe ser estudiada y mejorada antes

pasar al uso clínico (51). El uso de virus es también un problema en este sentido, pero se están diseñando procedimientos alternativos para inducir la expresión de los genes de interés (52), lo que facilitaría la admisión de este procedimiento para su uso terapéutico. Las iPS son, en realidad, un caso particular de la *reprogramación nuclear*, un concepto introducido hace tiempo, pero que no había sido fácil de materializar (53). En la misma categoría conceptual podrían incluirse también los procesos de *transdiferenciación* (54). La investigación en iPS es una de las más activas actualmente.

CONCLUSIONES

A pesar de muchos retrocesos y decepciones, que son naturales durante el establecimiento de una nueva terapia, la cardiología regenerativa ofrece un enorme potencial terapéutico. Las CMO y las CMM han sido las más frecuentemente utilizadas en los ensayos clínicos en humanos. Las CMO tienen a su favor la experiencia previa de 50 años de uso terapéutico para las enfermedades hematológicas, que han probado exhaustivamente su bioseguridad. Las CMM parecen tener un mayor potencial plástico, pero su bioseguridad a largo plazo no ha sido probada en detalle. Las células estromales de médula ósea están en la intersección de los dos tipos celulares escritos. Los resultados de los ensayos clínicos han sido relativamente modestos. Es tiempo quizá de revisar los protocolos y diseños para mejorar los resultados. El conocimiento de los mecanismos de acción sería muy útil para guiar modificaciones racionales del diseño terapéutico, y esto requeriría aumentar el componente de investigación básica asociada a los ensayos clínicos. La experimentación animal en modelos más próximos al ser humano sería muy necesaria para refinar los protocolos clínicos. Por otro lado, el uso de modelos *in vitro* es muy útil, ya que permite probar rápidamente modificaciones sistemáticas de diferentes variables y posibles mejoras (44). La combinación de la información obtenida en diferentes modelos, *in vitro*, animales y humanos, facilitará la traslación a la clínica. Las células madre residentes del corazón, descubiertas recientemente, abren nuevas esperanzas y expectativas. Los fármacos capaces de *despertar* a las células madre residentes, y de movilizarlas para formar tejido contráctil *in situ*, o la expansión celular *in vitro*, seguida de la inyección en

el área dañada, son dos de los objetivos más obvios (2, 26). Debe recordarse que algunas poblaciones de progenitores cardiacos, como la de células colaterales (SPC) o las células cardiomiogénicas (CMG) pueden rellenarse a partir de células circulantes procedentes de la médula ósea (30,39). Las células embrionarias humanas requerirán más tiempo para entrar en el arsenal terapéutico, pero esto no quiere decir que sean menos interesantes como objeto de investigación. Por el contrario, el estudio de la proliferación y diferenciación de las CME debe ser la fuente de inspiración de la Medicina Regenerativa. La producción de células pluripotentes inducidas (iPS) (51) abre una vía completamente nueva, que acerca las células madre adultas y embrionarias. La investigación con distintos tipos de células madre no es antitética, sino complementaria.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la ayuda de la Red de Terapia Celular del Instituto de Salud Carlos III (RD/006/10), del Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS. PI060480) y del Centro en Red de Medicina Regenerativa de Castilla y León.

LISTA DE ABREVIATURAS (POR ORDEN ALFABÉTICO)

CME, Células Madre Embrionarias; CMG, Células Cardiomiogénicas; CMM, Células Madre Mesenquimales; CMO, Células de la Médula Ósea; CMRC, Células Madre Residentes Cardiacas; G-SCF, Factor estimulante de colonias granulocíticas; IAM, Infarto Agudo de Miocardio; iPS, Células madre pluripotentes inducidas; MO, Médula Ósea; PgC, Progenitores Cardiacos; PrC, Precursores Cardiacos; SCF, Factor de crecimiento de células madres (*Stem Cell Factor*); SPC, Células de la población colateral (*Side Population Cells*).

BIBLIOGRAFÍA

1. Sanchez A, Garcia-Sancho J (2005) Progenitor Cells for Cardiac Regeneration. En: N. Dib N, Taylor DA and Diethrich EB (eds.) *Stem cell therapy and tissue engineering for cardiovascular repair*. New York: Springer, pp. 121-134

2. Anversa P, Kajstura J, Leri A y Bolli R (2006) Life and death of cardiac stem cells: a paradigm shift in cardiac biology. *Circulation* **113**, 1451-1463.
3. Rubart M y Field LJ (2006) Cardiac regeneration: repopulating the heart. *Annu Rev Physiol* **68**, 29-49
4. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A y Anversa P (2001) Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* **410**, 701-705.
5. Balsam LB y Robbins RC (2005) Haematopoietic stem cells and repair of the ischaemic heart. *Clin Sci (Lond)* **109**, 483-492.
6. Fukuda K (2005) Progress in myocardial regeneration and cell transplantation. *Circ J* **69**, 1431-1446.
7. Murry CE, Field LJ y Menasche P (2005) Cell-based cardiac repair: reflections at the 10-year point. *Circulation* **112**, 3174-3183.
8. Murry CE, Reinecke H y Pabon LM (2006) Regeneration gaps: observations on stem cells and cardiac repair. *J Am Coll Cardiol* **47**, 1777-1785.
9. Dawn B y Bolli R (2005) Adult bone marrow-derived cells: regenerative potential, plasticity, and tissue commitment. *Basic Res Cardiol* **100**, 494-503.
10. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G y Wernet P (2002) Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* **106**, 1913-1918.
11. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, Grunwald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmeler S y Zeiher AM (2002) Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* **106**, 3009-3017.
12. Schachinger V, Assmus B, Britten M. B, Honold J, Lehmann R, Teupe C, Abolmaali N. D, Vogl T. J, Hofmann W. K, Martin H, Dimmeler S y Zeiher A. M. (2004) Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. *J Am Coll Cardiol* **44**, 1690-1699.
13. Fernandez-Aviles F, San Roman J. A, Garcia-Frade J, Fernandez M. E, Penarrubia M. J, de la F. L Gomez-Bueno M, Cantalapiedra A, Fernandez J, Gutierrez O, Sanchez P. L Hernandez C, Sanz R, Garcia-Sancho J y Sanchez A. (2004) Experimental and clinical regenerative capability of human bone marrow cells after myocardial infarction. *Circ Res* **95**, 742-748.
14. 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 y Drexler H. (2004) Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* **364**, 141-148.
15. Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, Steffens J, Lippolt P, Fichtner S, Hecker H, Schaefer A, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A y Drexler, H (2006) Intraco-

- ronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (Bone marrow transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial. *Circulation* **113**, 1287-1294.
16. Lanssens S, Dubois C, Bogaert J, Theunissen K, Deroose C, Desmet W, Kalantzi M, Herbots L, Sinnaeve P, Dens J, Maertens J, Rademakers F, Dymarkowski S, Gheysens O, Van Cleemput J, Bormans G, Nuyts J, Belmans A, Mortelmans L, Boogaerts M y Van de W F (2006) Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* **367**, 113-121.
 17. Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T, Endresen K, Ilebekk A, Mangschau A, Fjeld JG, Smith HJ, Taraldsrud E, Grogaard HK, Bjornerheim R, Brekke M, Muller C, Hopp E, Ragnarsson A, Brinchmann JE y Forfang K (2006) Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* **355**, 1199-1209.
 18. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Suselbeck T, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S y Zeiher AM (2006) Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* **355**, 1210-1221.
 19. Abdel-Latif A, Bolli R, Tleyjeh IM, Montori VM, Perin EC, Hornung CA, Zuba-Surma EK, Al Mallah M y Dawn B (2007) Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med* **167**, 989-997.
 20. Assmus B, Honold J, Schachinger V, Britten MB, Fischer-Rasokat U, Lehmann R, Teupe C, Pistorius K, Martin H, Abolmaali ND, Tonn T, Dimmeler S y Zeiher AM (2006) Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *N Engl J Med* **355**, 1222-1232.
 21. Martin-Rendon E, Brunskill SJ, Hyde CJ, Stanworth SJ, Mathur A y Watt SM (2008) Autologous bone marrow stem cells to treat acute myocardial infarction: a systematic review. *Eur Heart J* **29**, 1807-1818.
 22. Rosenzweig A (2006) Cardiac cell therapy—mixed results from mixed cells. *N Engl J Med* **355**, 1274-1277.
 23. Bartunek J, Dimmeler S, Drexler H, Fernandez-Aviles F, Galinanes M, Janssens S, Martin J, Mathur A, Menasche P, Priori S, Strauer B, Tendera M, Wijns W y Zeiher A (2006) The consensus of the task force of the European Society of Cardiology concerning the clinical investigation of the use of autologous adult stem cells for repair of the heart. *Eur Heart J* **27**, 1338-1340.
 24. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B y Anversa P (2003) Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* **114**, 763-776.
 25. Urbanek K, Torella D, Sheikh F, De Angelis A, Nurzynska D, Silvestri F, Beltrami CA, Bussani R, Beltrami AP, Quaini F, Bolli R, Leri A, Kajstura J y Anversa P (2005) Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 8692-8697.

26. Torella D, Ellison GM, Nadal-Ginard B y Indolfi C (2005) Cardiac stem and progenitor cell biology for regenerative medicine. *Trends Cardiovasc Med* **15**, 229-236.
27. Urbanek K, Cesselli D, Rota M, Nascimbene A, De Angelis A, Hosoda T, Bearzi C, Boni A, Bolli R, Kajstura J, Anversa P y Leri A (2006) Stem cell niches in the adult mouse heart. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 9226-9231.
28. Urbanek K, Quaini F, Tasca G, Torella D, Castaldo C, Nadal-Ginard B, Leri A, Kajstura J, Quaini E y Anversa P (2003) Intense myocyte formation from cardiac stem cells in human cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 10440-10445.
29. Pfister O, Mouquet F, Jain M, Summer R, Helmes M, Fine A, Colucci WS y Liao R (2005) CD31- but Not CD31+ cardiac side population cells exhibit functional cardiomyogenic differentiation. *Circ Res* **97**, 52-61.
30. Mouquet F, Pfister O, Jain M, Oikonomopoulos A, Ngoy S, Summer R, Fine A y Liao R (2005) Restoration of cardiac progenitor cells after myocardial infarction by self-proliferation and selective homing of bone marrow-derived stem cells. *Circ Res* **97**, 1090-1092.
31. Laugwitz KL, Moretti A, Lam J, Gruber P, Chen Y, Woodard S, Lin L Z, Cai CL, Lu, MM, Reth, M, Platoshyn, O, Yuan, JX, Evans S y Chien KR (2005) Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature* **433**, 647-653.
32. Pombal MA, Carmona R, Megias M, Ruiz A, Perez-Pomares JM y Muñoz-Chapuli R (2008) Epicardial development in lamprey supports an evolutionary origin of the vertebrate epicardium from an ancestral pronephric external glomerulus. *Evol Dev* **10**, 210-216.
33. Zhou B, Ma Q, Rajagopal S, Wu SM, Domian I, Rivera-Feliciano J, Jiang D, von Gise A, Ikeda S, Chien KR y Pu WT (2008) Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature* **454**, 109-113.
34. Cai C, L Martin J, C, Sun Y, Cui L, Wang L, Ouyang K, Yang L, Bu L, Liang X, Zhang X, Stallcup WB, Denton CP, McCulloch A, Chen J y Evans SM (2008) A myocardial lineage derives from Tbx18 epicardial cells. *Nature* **454**, 104-108.
35. Parmacek MS y Epstein JA (2005) Pursuing cardiac progenitors: regeneration redux. *Cell* **120**, 295-298.
36. Deb A, Wang S, Skelding KA, Miller D, Simper D y Caplice NM (2003) Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart: A study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients. *Circulation* **107**, 1247-1249.
37. Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, Finato N, Beltrami CA, Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A y Anversa P (2002) Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med* **346**, 5-15.

38. Yoon YS, Wecker A, Heyd L, Park JS, Tkebuchava T, Kusano K, Hanley A, Scadova H, Qin G, Cha DH, Johnson KL, Aikawa R, Asahara T y Losordo DW (2005) Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. *J Clin Invest* **115**, 326-338.
39. Kawada H, Fujita J, Kinjo K, Matsuzaki Y, Tsuma M, Miyatake H, Muguruma Y, Tsuboi K, Itabashi Y, Ikeda Y, Ogawa S, Okano H, Hotta T, Ando K y Fukuda K (2004) Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood* **104**, 3581-3587.
40. Zuk P. A, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P y Hedrick MH (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* **13**, 4279-4295.
41. Gerdes AM, Kellerman SE, Moore JA, Muffly KE, Clark L C, Reaves PY, Malec KB, McKeown PP y Schocken DD (1992) Structural remodeling of cardiac myocytes in patients with ischemic cardiomyopathy. *Circulation* **86**, 426-430.
42. Leri A, Kajstura J y Anversa P (2005) Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. *Physiol Rev* **85**, 1373-1416.
43. Hofmann M, Wollert KC, Meyer GP, Menke A, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Knapp WH y Drexler H (2005) Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium. *Circulation* **111**, 2198-2202.
44. Sanchez A, Fernandez ME, Rodriguez A, Fernandez J, Torre-Perez N, Hurlé JM y García-Sancho J (2006) Experimental models for cardiac regeneration. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* **3**, S29-S32.
45. Lin F, Cordes K, Li L, Hood L, Couser WG, Shankland SJ y Igarashi P (2003) Hematopoietic stem cells contribute to the regeneration of renal tubules after renal ischemia-reperfusion injury in mice. *J Am Soc Nephrol* **14**, 1188-1199.
46. Eisenberg CA, Burch JB y Eisenberg L M (2006) Bone marrow cells transdifferentiate to cardiomyocytes when introduced into the embryonic heart. *Stem Cells* **24**, 1236-1245.
47. Capi O y Gepstein L (2006) Myocardial regeneration strategies using human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *J Control Release* **116**, 211-218.
48. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K y Yamanaka S (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861-872.
49. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II y Thomson JA (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**, 1917-1920.
50. Taura D, Noguchi M, Sone M, Hosoda K, Mori E, Okada Y, Takahashi K, Homma K, Oyamada N, Inuzuka M, Sonoyama T, Ebihara K, Tamura N, Itoh

- H, Suemori H, Nakatsuji N, Okano H, Yamanaka S y Nakao K (2009) Adipogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells: Comparison with that of human embryonic stem cells. *FEBS Lett*, in press.
51. Yamanaka S (2008) Pluripotency and nuclear reprogramming. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **363**, 2079-2087.
 52. Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T y Yamanaka S (2008) Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* **322**, 949-953.
 53. Collas P (2003) Nuclear reprogramming in cell-free extracts. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358**, 1389-1395.
 54. Leri A, Kajstura J y Anversa P (2005) Identity deception: not a crime for a stem cell. *Physiology (Bethesda.)* **20**, 162-168.