

Medicina regenerativa cardiovascular en la encrucijada. Es urgente basar los ensayos clínicos sobre terapia celular en datos sólidos obtenidos en animales experimentales relevantes para los humanos

Bernardo Nadal-Ginard^a, Daniele Torella^{b,c} y Georgina Ellison^{a,c}

^aThe Zena and Michael A. Wiener Cardiovascular Institute. Mount Sinai School of Medicine. New York. Estados Unidos.

^bLaboratory of Molecular and Cellular Cardiology. Department of Experimental and Clinical Medicine. Magna Graecia University. Italia.

^cLaboratory of Molecular and Cellular Physiology. The Research Institute for Sport & Exercise Sciences. Liverpool John Moores University. Liverpool. Reino Unido.

Hace ya 4 años que las primeras publicaciones de trabajos realizados en roedores crearon grandes expectativas sobre el potencial del trasplante de células de la médula ósea para producir una regeneración del miocardio con relevancia fisiológica. Rápidamente, en algunas publicaciones adicionales se documentó la capacidad de otras células del adulto para producir efectos semejantes.

Todas estas publicaciones fueron controvertidas desde el principio porque ninguna de ellas aclaraba los mecanismos de la diferenciación de las células trasplantadas. Es más, cada uno de estos trabajos dejaba al menos tantas preguntas abiertas como las que contestaba. A pesar de estas deficiencias, los primeros ensayos clínicos de fase I se empezaron inmediatamente sin ninguna experimentación animal adicional. En la actualidad se han publicado los resultados de más de una docena de ensayos clínicos y todavía no hay una sola evidencia convincente que documente si los protocolos utilizados pueden regenerar células miocárdicas contráctiles en el miocardio humano. Ésta es una de las principales razones por las que la controversia sobre la efectividad de este tratamiento es cada día más vitriólica. El escepticismo acerca de la efectividad e incluso del potencial de la regeneración miocárdica clínica ha llegado a un nivel que amenaza el futuro de este campo en su infancia. La situación de la regeneración miocárdica contrasta claramente con la del campo de regeneración neuronal. A pesar de la extensa y sólida documentación sobre el origen, el fenotipo y los mecanismos reguladores de las células madre neurales, los primeros ensayos clínicos apenas se han iniciado recientemente.

Para progresar en este campo es necesario distinguir entre los procedimientos necesarios para establecer una «prueba de concepto» y los que tienen el potencial de

una amplia aplicación clínica. Además, el método de implementación debe permitir una acumulación progresiva de conocimientos. Según nuestra opinión, para obtener la información requerida necesitamos: *a)* mucha más información procedente de animales cuya anatomía y fisiología sean relevantes para los humanos, incluidas la relación dosis/efecto, el modo óptimo de administración, la duración del efecto, etc., y *b)* un mejor conocimiento de los mecanismos moleculares que permiten mantener la «truncalidad frente a la diferenciación de las células madre cardíacas y/o de las células trasplantadas».

En conclusión, necesitamos entender mejor la biología del miocardio para avanzar en este campo de forma sistemática. De otra forma corremos el peligro de retrasar este campo durante décadas, como ocurrió con los primeros trasplantes de corazón y los ensayos de tratamiento genético.

Palabras clave: *Terapia celular. Medicina regenerativa. Células madre. Trasplante celular. Regeneración miocárdica*

Cardiovascular Regenerative Medicine at the Crossroads. Clinical Trials of Cellular Therapy Must Now Be Based on Reliable Experimental Data From Animals With Characteristics Similar to Human's

It is now over 4 years since early reports of murine models raised high expectations that bone marrow cell transplantation to the postischemic myocardium could produce physiologically significant myocardial regeneration. In quick succession, a flurry of publications documented the capacity of a variety of other types of adult cell to produce similar results.

These publications were all controversial from the start because none addressed the mechanisms involved in the differentiation of transplanted cells. In addition, each report raised at least as many questions as it answered. Despite these obvious weaknesses, the first phase-I

Correspondencia: Dr. B. Nadal-Ginard.
Cardiovascular Institute, Box 1030. Mount Sinai School of Medicine, 1
Gustave L. Levy Place, New York, NY 10029, USA.
Correo electrónico: bernardo.nadalginard@mssm.edu

ABREVIATURAS

CMC: células madre cardíacas.
 hCME: células madre embrionarias humanas.
 IM: infarto de miocardio.
 SNC: sistema nervioso central.

clinical trials were started immediately without any further animal experimentation. Today the results of more than a dozen trials are already in the public domain but we still do not have a single piece of solid data documenting whether any of the approaches used is capable of regenerating contractile cells in the human myocardium. This is one of the main reasons why the controversy over the effectiveness of this therapeutic approach is becoming increasingly heated. Moreover, skepticism about the efficacy, and even the feasibility, of inducing clinically relevant myocardial regeneration has increased to the point where it threatens the future of this nascent field. The present situation in myocardial generation contrasts sharply with that in neural regeneration. Although there is a solid and extensive body of knowledge on the origin, phenotype, and regulatory mechanisms of neural stem cells, the first clinical trials have only recently been started.

To move this field forward it is necessary to distinguish between the procedures needed to establish «proof-of-concept» and those that have the potential for widespread clinical application. In addition, the technique must be implemented in such a way that it continues to add to existing knowledge. It is our belief that, if the necessary information is to be acquired, we need: a) significantly more extensive experimental data from animals whose anatomical and physiological characteristics are similar to human's, including data on, for example, dose-effect relationships, the best form of administration, and the duration of therapeutic responses; and b) better understanding of the molecular mechanisms that determine whether cardiac stem cells and transplanted cells will either remain as stem cells or differentiate.

In summary, if we are to progress systematically in this area, we need better understanding of myocardial biology. Without it, we run the risk of holding back the field for decades, as happened with the first human heart transplants and with trials of gene therapy.

Key words: Cellular therapy. Regenerative medicine. Stem cells. Cell transplantation. Myocardial regeneration.

Full English text available from: www.revespcardiol.org

INTRODUCCIÓN

A pesar del enorme progreso durante los últimos 50 años en el tratamiento de muchas enfermedades, incluidas las cardiovasculares, la realidad es que en muchos casos los tratamientos disponibles son solamente

paliativos. Sin embargo, debido a que estos tratamientos son efectivos para resolver procesos agudos que en el pasado eran mortales, a menudo extienden la vida del enfermo a costa de dejar como secuela una enfermedad crónica. Estas secuelas crónicas, particularmente en el sistema cardiovascular, con frecuencia no tienen tratamiento efectivo, y para restaurar una función cardíaca compatible con una vida aceptable la única alternativa viable es el trasplante cardíaco. Por desgracia, esta alternativa tiene grandes limitaciones, tanto desde el punto de vista logístico y económico como psicológico y biológico, que disminuyen su utilidad y disponibilidad.

Con el continuo incremento de la vida media y el envejecimiento progresivo de la población en los países avanzados, estamos viviendo una epidemia cada vez más importante de enfermedades crónicas cuyo tratamiento absorbe una fracción creciente de los recursos humanos y del presupuesto sanitario. En muchos casos, esta enorme inversión de recursos sanitarios produce resultados muy desalentadores cuando se mide su efecto sobre la calidad y la duración de la vida útil. A pesar de ello, las demandas de servicios médicos avanzados siguen aumentando y amenazan a todos los sistemas nacionales de salud, cuyas alternativas oscilan entre la imposición de racionamiento a los medios sanitarios mediante la utilización de diferentes subterfugios y la bancarrota de la salud pública. Actualmente, solamente en Estados Unidos hay más de 5 millones de pacientes postinfarto de miocardio (IM) con insuficiencia cardíaca crónica. Cada año se añade a este grupo más de medio millón de enfermos nuevos, que tienen una mortalidad de aproximadamente el 18% anual y requieren unos 30.000 millones de dólares para su tratamiento¹. El problema general de este grupo de enfermos es un déficit de células contráctiles miocárdicas funcionales y de una circulación coronaria adecuada para nutrirlos. Uno de los grandes retos de la investigación cardiovascular de la última década ha sido encontrar un método que permita reemplazar las células que se han perdido a consecuencia del infarto para así poder prevenir o revertir el proceso de remodelado cardíaco patológico, que provoca la insuficiencia cardíaca de estos pacientes². Por desgracia, hasta hace poco tiempo todos los intentos de trasplante celular en el miocardio estaban condenados al fracaso a priori debido a que no se conocía la existencia de células con las propiedades adecuadas.

Dada la situación aquí resumida, que no es significativamente diferente para otras áreas de la medicina, tales como las enfermedades degenerativas del sistema nervioso central (SNC), la diabetes, etc., no es extraño que el aislamiento de células madre embrionarias humanas (hCME) en 1998^{3,4}—con su capacidad de crecimiento ilimitado y su potencial para formar todas o la mayoría de las células del cuerpo— fuera recibido con gran interés por la comunidad médico-científica y

por la sociedad en general. Tanto la prensa general como la científica despertaron la atención y la imaginación general al anunciar un nuevo paraíso con una fuente inexorable de reemplazamientos celulares, de tejidos y órganos para el tratamiento de todo tipo de enfermedades congénitas y degenerativas que serían asequibles a todo el mundo. Además, nos prometían que esta revolución en progreso no produciría los desastres descritos por A. Huxley en su obra *Un Mundo Feliz*, sino que nos permitiría dejar atrás el mundo de la medicina paliativa en el que vivimos para entrar en la nueva era de la «medicina regenerativa». Esta visión optimista y distribuida universalmente dejaba la impresión de que estábamos a sólo unos pasos de alcanzar la «fuente de la eterna juventud».

CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS Y DEL ADULTO: EFECTO PERNICIOSO DE LA POLÍTICA CUANDO INTERFIERE CON LA CIENCIA

Debido a que hasta ahora el desarrollo de células hCME requiere la destrucción de embriones humanos, rápidamente surgió un grupo totalmente opuesto a su producción y uso, dirigido por la iglesia católica, grupos protestantes conservadores y varios gobiernos nacionales encabezados por el de Estados Unidos. Esta controversia, que sigue viva en muchos países, ha impuesto severas trabas y limitaciones a la producción y experimentación con las hCME. Como difícilmente hay algo más atractivo que lo que adquiere el carácter de «fruta prohibida», los obstáculos al uso de hCME han aumentado su encanto y el potencial médico subjetivo de estas células. Es una idea generalmente aceptada que las fuerzas político-religiosas opuestas a la generación y uso de hCME están retrasando el desarrollo de tratamientos para enfermedades tan dispares como la enfermedad de Alzheimer, la diabetes, la sección de médula dorsal, etc.

Aunque no hay duda de que, a través de la historia, la politización de la ciencia ha tenido consecuencias nefastas para ésta, y el caso de las hCME no será una excepción, es también evidente que hay un nivel de agitación, exageración, frustración, falta de equilibrio y análisis crítico en ambos campos de la controversia, incluidos los grupos de la comunidad biomédica. Este estado de inquietud y lucha sin cuartel entre ambos campos es desproporcionado para los asuntos en juego. Para restaurar el equilibrio y el sentido común en la discusión sería conveniente que los antagonistas recordaran que las CME de ratón han estado disponibles desde 1981^{5,6} —más de una década antes del aislamiento de las hCME— y en ningún momento ha habido limitación alguna en su producción o uso. A pesar de ello y del hecho de que la experimentación en ratones es mucho más sencilla que en humanos y no tiene las barreras inmunológicas que afectan a las hCME, hasta ahora

no hay ni una sola enfermedad crónica en el ratón que haya sido curada mediante el trasplante de CME. Por otro lado, los contrarios al uso de hCME deberían recordar los nefastos pronósticos que se hicieron contra el uso del ADN, la anticoncepción y la fertilización in vitro, que resultaron equivocados. Además, hay pruebas tangibles de que la terapia celular con células madre del adulto ha sido una de las historias más brillantes de la medicina del siglo xx, como se ha demostrado con los trasplantes de médula ósea, entre otros.

El uso de células madre del adulto no despierta las luchas filosóficas, políticas y religiosas desencadenadas por las hCME y, por lo tanto, su uso no es controvertido. Por ello, la mayor parte de la atención pública, biomédica y política se ha dedicado a las hCME, con el resultado de que las características y el potencial de las células madre del adulto han sido casi ignoradas. Hay una gran discrepancia entre el potencial a corto y a medio plazo de las dos clases de células madre y el grado de su visibilidad en la esfera social, política y científica. Esto no significa que las CME, tanto humanas como de animales experimentales, no tengan un valor y un potencial extraordinarios. Está claro que estas células son insustituibles para estudiar los mecanismos genéticos reguladores del desarrollo humano normal y patológico, y también cómo estos mecanismos son modificados por el medio ambiente. Las CME son un método único para estudiar el mecanismo de acción y los efectos secundarios de ciertos fármacos. Sin embargo, su potencial como agentes terapéuticos, si es que lo tienen, pertenece a un futuro muy lejano. Por otro lado, el uso terapéutico de las células madre adultas es una realidad diaria en la mayoría de los centros médicos y su importancia clínica aumentará de forma desmedida en los próximos años.

Entre las causas de la gran discrepancia entre el punto de vista expresado anteriormente, por una parte, y el consenso prevalente en la literatura científica y la prensa general, por otra, sobresalen los conflictos de interés de muchos grupos de presión científicos, biomédicos, políticos y religiosos identificados con agendas muy limitadas en ambos lados de la polémica. Esta situación se hace más crítica debido a la feroz competición por las limitadas ayudas a la investigación y la atención de los medios de comunicación. Por añadidura, la discusión sobre los méritos relativos de las células embrionarias y adultas se está llevando a cabo con argumentos obsoletos que han permanecido congelados durante la última década y han contribuido a aumentar la confusión y la desinformación de la sociedad en general⁷.

Los diferentes grupos de presión se han apropiado de esta disciplina naciente y la han convertido en un subrogado de problemas más amplios en las batallas socioideológicas. La posición animista de la extrema derecha religiosa, su oposición al aborto e incluso a la fertilización in vitro ha encontrado un excelente pre-

texto en su enfrentamiento al uso de embriones humanos para la producción de líneas hCME –incluso de embriones abandonados, congelados durante años y destinados a ser destruidos–. Para prevenir que se los tache de anticientíficos y retrógrados, estos grupos se han convertido en los más activos proponentes del uso de células madre adultas «en vez de» hCME como base para el desarrollo de la medicina regenerativa y han organizado fuertes grupos de presión dentro del gobierno federal de Estados Unidos y de otros países. Debido al menosprecio y antagonismo de la comunidad científica a los grupos antiabortistas más estridentes, su apoyo entusiasta a la investigación y al uso de células madre adultas ha sido el «beso de la muerte» para este campo de investigación. Un segmento importante de la comunidad científica, una parte del segmento liberal de la sociedad y la mayoría de publicaciones médicas y científicas de primera línea han respondido con una reacción refleja automática pero de sentido contrario a la presión conservadora para implementar una prohibición total a la investigación con hCME y fomentar la investigación con células madre adultas.

Debido a realidades políticas específicas de Estados Unidos, la comunidad científica «progresista» se ha inquietado ante la posibilidad de que avances en la biología de las células madre del adulto puedan ser utilizados por los grupos conservadores para restringir todavía más la investigación sobre las hCME, lo que podría llevar a una prohibición completa de su uso. Para evitar esta posibilidad, muchos de los investigadores más prestigiosos y con más visibilidad en este campo, junto con varias de las publicaciones biomédicas de más influencia, han adoptado una política permisiva, pero no declarada, de disminuir la visibilidad de la investigación con células madre adultas y, al mismo tiempo, dar máxima visibilidad a los resultados con hCME⁸. Esta actitud desafortunada y miope por parte de un sector importante de la *intelligentsia* ha distorsionado todavía más la investigación y el debate público, ha creado expectativas irrealistas sobre el potencial de las hCME y ha afectado a la distribución de los recursos sociales para la investigación. Mientras que en Estados Unidos prácticamente cada Estado de la unión ha respondido al bloqueo de fondos federales para investigar con hCME con la creación de un programa público de investigación con estas células, la investigación con células madre adultas languidece en su sombra⁹. Ahora, otras naciones a través del mundo están imitando sin reflexión la distorsionada política científica de Estados Unidos con respecto al uso de células madre para el desarrollo de la medicina¹⁰.

El estado de la discusión pública sobre células madre contrasta profundamente con la realidad biológica y médica. Como se mencionó anteriormente, en el calor de la discusión es fácil olvidar que la terapia con células madre del adulto ha sido uno de los grandes

éxitos de la medicina en la segunda mitad del siglo xx. A partir del primer trasplante de médula ósea realizado por Thomas en 1956 para tratar a un enfermo en estado terminal de leucemia¹¹, multitud de enfermos se han beneficiado de esta terapia¹². Trasplantes de médula ósea, tanto autólogos como heterólogos, son ahora procedimientos sistemáticos en muchos centros hospitalarios¹². En la década de los ochenta, injertos de piel autólogos cultivados in vitro a partir de queratinocitos (células madre de la piel) derivados del propio paciente empezaron a utilizarse clínicamente¹³. Con independencia de su impacto directo sobre los pacientes, estos procedimientos fueron facilitados por la revolución que ocurrió contemporáneamente en el campo de la inmunología (y a su vez la facilitaron) y que ha impactado fuertemente en la mayoría de las especialidades médicas.

Hasta hace poco, el factor que ha limitado más seriamente la expansión de estos progresos en el uso de células madre del adulto, tanto en investigación como en el campo clínico, ha sido una falta de conocimiento general sobre los mecanismos de homeostasis celular de la mayoría de los tejidos y órganos del adulto. Hasta mediados de la última década del siglo xx, el punto de vista prevalente, tanto en medicina como en biología, era que, a pesar de que algunos tejidos como la médula ósea, la piel y el epitelio intestinal muestran una robusta capacidad de autorregeneración, esta capacidad es una excepción limitada a un pequeño grupo de tejidos. El paradigma reinante era que la mayoría de tejidos y órganos del adulto, o se renuevan muy lentamente (como la pared endotelial del sistema vascular) o no tienen ninguna capacidad de autorregeneración (como el corazón y el SNC). Era prácticamente un dogma de fe que a partir del período posnatal la mayoría de los tejidos no contenía células funcionales con capacidad de producir la autorregeneración del parénquima del tejido (células madre). Un resultado ineludible de este paradigma fue la aceptación del concepto de que en la mayoría de órganos del adulto, el número y la función de sus células parenquimatosas presentaban una disminución continua y progresiva desde la infancia hasta la muerte. La consecuencia lógica de este punto de vista fue que, con la excepción de los 3 tejidos con evidente capacidad de autorregeneración nombrados anteriormente, todas las intervenciones terapéuticas orientadas a tratar un déficit en el número de células parenquimatosas funcionales de cualquier otro órgano por necesidad tenían que ser paliativas y dirigidas a proteger y/o mejorar la función de las células sobrevivientes en el órgano. Retornar el órgano/tejido al *status quo* anterior hubiera requerido el trasplante de células idénticas donadas por otro individuo o el trasplante de células capaces de diferenciarse en el tipo celular cuyo déficit se tenía que cubrir. Ya que la segunda opción no era factible porque se pensaba que no existía el tipo de células necesarias para la

mayoría de los tejidos, el trasplante de órganos y células heterólogas se aceptó como la única solución práctica disponible. De hecho, y a pesar de los múltiples problemas y desventajas del trasplante heterólogo de células y órganos, su práctica se ha convertido en la intervención «de excelencia» para varias especialidades médicas. A pesar del éxito aparente de este tipo de intervenciones, la falta de donantes, el alto coste y los efectos secundarios de la inmunodepresión han limitado esta terapia a una fracción minúscula de los pacientes que requieren tratamiento. En esta situación, no es sorprendente la recepción entusiasta con la que se recibió el descubrimiento de hCME multipotentes^{4,5,14-16} con capacidad de diferenciarse en la mayoría, si no en todos los tipos celulares del organismo y que, por lo tanto, abrían la posibilidad de una fuente inagotable de células y órganos de repuesto.

REEVALUACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE DEL ADULTO

De una forma casi inadvertida, ya que no ha llamado la atención de los medios de comunicación y no ha sido un actor en las luchas culturales de los últimos 15 años, el paradigma vigente sobre la homeostasis celular de los tejidos adultos ha sido continuamente revaluado. De manera paulatina se han acumulado evidencias incontrovertibles de que las células parenquimatosas de la gran mayoría de los tejidos, si no de todos, están en un proceso continuo de autorrenovación, con células que mueren continuamente al mismo tiempo que otras están naciendo. Una vez que este concepto de autorrenovación celular continua en el adulto fue entendido y aceptado como un aspecto generalizado y central para la homeostasis de los órganos y del organismo, aceptar que para poder preservar la masa celular era esencial que hubiera un grupo específico de células capaces de regenerar las células parenquimatosas de cada órgano fue un paso lógico. Obviamente, la adopción de este concepto fue seguida rápidamente del descubrimiento de células madre en cada uno de los órganos/tejidos del adulto¹⁷⁻²⁹. A comienzos de la década de los noventa, sólo 2 órganos quedaban sin premio en la lotería de las células madre adultas. Estos 2 órganos, el corazón y el SNC, se convirtieron en los estandartes de los tejidos constituidos por células posmitóticas y carentes de toda capacidad de autorrenovación.

En 1988 se describió la formación de nuevas neuronas en el cerebro de aves adultas³⁰, y en 1992, en el ratón^{31,32}. La neurogénesis en el hipocampo humano adulto fue publicada en 1998³³. Así pues, durante esta década, el corazón quedó segregado del resto del organismo como el único órgano sin capacidad de autorrenovación celular. Sorprendentemente, esta situación peculiar del corazón con respecto a la homeostasis del resto del cuerpo fue admitida sin argumentos por la comunidad de investigadores cardiovasculares, que

continuaron aceptando el paradigma vigente y defendiendo el excepcionalismo de la biología celular cardíaca. Es decir, continuaron tratando al corazón como un órgano posmitótico sin capacidad intrínseca de regeneración en el que ni la muerte ni la nueva formación de miocitos desempeñaban ningún papel en la homeostasis celular cardíaca y, por lo tanto, ambos fenómenos podían ser completamente ignorados. Los fundamentos de este concepto tan engranado en el mundo de la cardiología han sido principalmente dos: *a)* el concepto de que todos los miocitos del corazón fueron formados durante el desarrollo fetal o la vida posnatal temprana y en el adulto todos están terminalmente diferenciados y sin capacidad de reentrar en el ciclo celular; como consecuencia, todos los cardiomiocitos tienen la misma edad cronológica del organismo³⁴, y *b)* el corazón adulto no tiene capacidad regenerativa intrínseca de sus células parenquimatosas porque carece de una población de células madre capaces de producir nuevos miocitos. Aunque parezca increíble, estos 2 conceptos, que demostraron ser incorrectos para el resto de órganos, incluido el SNC, continúan siendo la base de todas las terapias en uso para el tratamiento de la cardiopatía isquémica, la insuficiencia cardíaca y de todos los ensayos clínicos de terapia celular ya realizados o en progreso. Afortunadamente, el papel del corazón como único paria al que no le tocaron células madre en la lotería de la evolución no persistió durante mucho tiempo y nuestro primer hallazgo de células madre con capacidad regenerativa en el corazón adulto publicado en 2003³⁵ fue rápidamente confirmado por varios grupos independientes³⁶⁻⁴¹.

En un ambiente neutral desde el punto de vista social y científico hubiera sido lógico esperar que la identificación de la capacidad de autorregeneración en todos los tejidos/órganos del adulto, junto con la noción de que la homeostasis celular requiere un proceso continuo de renovación celular a lo largo de la vida del organismo, habría sido suficiente para revalorar las expectativas para las células madre embrionarias y del adulto. Tal revaloración, de haber ocurrido, hubiera fomentado la investigación con los 2 tipos de células madre en caminos paralelos pero estrechamente interconectados. De esta manera, descubrimientos en un tipo celular recíprocamente hubieran avanzado la investigación en el otro. Por desgracia, ésta no ha sido la evolución de esta disciplina. Es más, la investigación ha imitado a grandes rasgos el tono de la polémica pública y, como resultado, se ha desarrollado un cierto antagonismo entre algunos investigadores de un campo contra los del otro. Por añadidura, la discusión en el ambiente público y en los círculos políticos sigue basándose en los mismos argumentos usados durante los últimos 15 años, cuando se pensaba que el potencial regenerativo de las células madre embrionarias no sólo era ilimitado sino que, además, sería fácil de aplicar

clínicamente. En cambio, el potencial de las células madre del adulto no existía para muchos de los tejidos (ya que no las tenían) o era considerado como una curiosidad biológica y no como un elemento esencial para la homeostasis fisiológica del órgano. Es evidente que estos argumentos no solamente están pasados de moda, sino que no representan ni la realidad biológica ni la médica⁴².

La situación actual ha sido y continúa siendo perjudicial para el campo naciente de la medicina regenerativa y es importante que cambie cuanto antes. Para salir de esta situación negativa y autodestructiva es urgente que se elimine la política de la discusión científica y volvamos a discutir la ciencia por sus méritos propios y no porque encajen o dejen de encajar con ciertas filosofías. Para que ello ocurra será necesario levantar seriamente el nivel y la calidad de la discusión y, al mismo tiempo, progresar lo más rápidamente posible en entender la biología de los 2 tipos de células madre. Una vez tengamos más información a nuestro alcance, será el momento de valorar el mérito relativo de los 2 tipos celulares en relación con objetivos médicos concretos, ya que es posible que cada tipo celular tenga una utilidad óptima diferente.

UN NUEVO MODELO DE HOMEOSTASIS CELULAR CARDIACA

Es un hecho incontrovertible que, al contrario que las afirmaciones basadas en una mala interpretación de los datos⁴³ y en datos claramente erróneos⁴⁴, los miocitos del miocardio adulto son células posmitóticas y terminalmente diferenciadas^{45,46}. A pesar de ello, tampoco hay duda de que el corazón tiene una potente capacidad de regeneración, tanto en condiciones normales como en reacción a diversos estímulos fisiológicos y/o patológicos^{47,48}. La base de esta capacidad regenerativa es un pequeño número de células distribuidas a través de las aurículas y los ventrículos del corazón adulto, incluido el humano, que tienen el fenotipo, el comportamiento y el potencial regenerativo de células madre cardiacas (CMC) *bona fide*³⁵. Estas células son clonables, se autorrenuevan y son multipotentes, ya que dan origen a miocitos, endotelio y músculo liso vascular, y tienen una capacidad de expansión prácticamente ilimitada^{35,38}. La progenie de una sola CMC, inyectada en el borde de un infarto, es capaz de regenerar el miocardio perdido a consecuencia de un infarto masivo³⁵. Como promedio, el miocardio contiene una CMC para cada 1 10³ miocitos, una concentración similar a la de las células madre hematopoyéticas en la médula ósea⁴⁹. En el miocardio adulto normal, la mayoría de las CMC están inactivas y fuera del ciclo celular, con sólo un 2-3% en proceso de replicación y diferenciación para reemplazar a los miocitos y las células vasculares perdidas debido al desgaste normal del mio-

cardio. Sin embargo, en respuesta a un estrés fisiológico o patológico (hipoxia, ejercicio, sobrecarga de trabajo, daño celular, etc.), la mayoría de las CMC (> 95%) se activan rápidamente (Ellison et al, comunicación personal), se multiplican y diferencian en miocitos y células vasculares^{47,48,50}. Esta activación de las CMC puede reparar eficientemente daño miocárdico difuso extenso y microlesiones (Ellison et al, comunicación personal), pero no pérdidas segmentarias severas, como ocurre en el IM.

La identificación de las CMC ha permitido una interpretación correcta de la existencia de una población de miocitos en proceso de replicación celular en el miocardio adulto^{43,44} que hasta recientemente se había malinterpretado^{43,44}. Al mismo tiempo, estas células han permitido demostrar que la muerte de miocitos y su nueva formación son las 2 caras de la moneda de la homeostasis cardíaca en la que las CMC desempeñan un papel esencial e irremplazable⁵⁰. Los miocitos en proceso de replicación presentes en el miocardio adulto, más abundantes en el corazón con estrés^{47,48}, son miocitos recién nacidos a través de la diferenciación de las CMC. Es ahora evidente que la continua regeneración de miocitos y células vasculares a lo largo de la vida del individuo es un requerimiento para la homeostasis cardíaca y para mantener su capacidad de respuesta a diferentes estímulos fisiológicos y patológicos.

Una objeción levantada frecuentemente por los escépticos a este nuevo concepto del miocardio es el hecho de que si el miocardio contiene células con capacidad regenerativa es incongruente que un IM evolucione hacia la cicatriz en vez de regenerar nuevo miocardio contráctil. Lo que se olvida es que la obstrucción de una arteria principal de cualquier órgano, independientemente de su abundancia en células madre (p. ej., piel, médula ósea, intestino, etc.) en general evoluciona hacia la cicatrización y no hacia la regeneración. Es muy probable que este comportamiento sea debido a que durante la evolución de organismos con una vida media larga, la selección de las células madre del adulto fue necesaria no para regenerar lesiones segmentarias catastróficas agudas, sino para reparar lesiones menores y regenerar las células perdidas debido al desgaste normal a través del tiempo. Sin la existencia de este proceso reparativo no hubiera sido posible mantener la función de la mayoría de órganos durante una vida de duración normal.

El punto de vista expresado aquí, además de cancelar el excepcionalismo biológico que se había otorgado al corazón y de colocarlo de nuevo en el contexto del resto de órganos con capacidad regenerativa, ha abierto nuevas oportunidades para el tratamiento de procesos secundarios a la pérdida de masa contráctil miocárdica. Esto es así porque mientras el miocardio era considerado como un tejido sin capacidad regenerativa, la única alternativa clínica para tratar la pérdida de

miocitos había sido mantener o mejorar la función de los miocitos sobrevivientes o el reemplazamiento de la masa contráctil perdida mediante el trasplante cardiaco. Con la identificación de la capacidad regenerativa del miocardio mediante CMC, que pueden ser aisladas y amplificadas *in vitro*³⁵ o estimuladas *in vivo*⁵¹⁻⁵², es razonable investigar métodos que permitan explotar este potencial regenerativo para inducir la regeneración miocárdica con células autólogas sin necesidad de trasplante celular.

REGENERACIÓN MIOCÁRDICA MEDIANTE TRASPLANTE CELULAR: UNA CONTROVERSIA DE LARGA DURACIÓN QUE PODRÍA Y DEBERÍA HABERSE EVITADO

A mediados de la década de los noventa era ya aparente que la insuficiencia cardiaca crónica post-IM estaba alcanzando proporciones epidémicas y se estaba convirtiendo en un problema de salud pública serio que no podría ser aliviado mediante trasplante cardiaco, debido a la escasez de donantes, su coste prohibitivo y la seriedad de los efectos secundarios⁵³. Debido a que el miocardio era visto como un tejido sin ningún potencial regenerativo, la búsqueda de células con capacidad de diferenciarse en o funcionar como miocitos se aceleró. En consecuencia, diferentes tipos celulares, incluidos los mioblastos esqueléticos⁵⁴⁻⁵⁷, los cardiomiocitos fetales^{58,59} y los miocitos derivados de células ES⁶⁰ fueron trasplantados en el miocardio de animales experimentales. Seguidamente, y a pesar de los resultados marginales obtenidos en animales, se empezaron ensayos clínicos con mioblastos esqueléticos⁶¹. Durante esta época de fervor en busca de un reemplazamiento para los miocitos perdidos a consecuencia del IM, varios grupos publicaron que células derivadas de la médula ósea, y más específicamente las células hematopoyéticas, eran multipotentes y, por lo tanto, capaces de diferenciarse en una gran variedad de tipos celulares no sanguíneos⁶²⁻⁶⁶. Al mismo tiempo, y antes de que algunos de estos hallazgos fueran cuestionados⁶⁷⁻⁶⁹, nosotros ya habíamos demostrado que en el humano había células con potencial miogénico que anidaban en el corazón a través de la circulación y se diferenciaban en miocitos y células vasculares⁷⁰. Basados en estos datos, con el grupo de Anversa decidimos comprobar si células de la médula ósea enriquecidas en células hematopoyéticas eran capaces de regenerar el miocardio post-IM del ratón. Sorprendentemente, los resultados fueron positivos. Las células trasplantadas no sólo restauraron el número de miocitos perdidos en el infarto, sino que mejoraron la función ventricular^{71,72}. Estos resultados, aunque preliminares, despertaron gran interés y esperanza en el potencial de las células de la médula ósea trasplantadas o movilizadas

a la zona infartada para regenerar el miocardio postisquémico⁷³⁻⁸⁰.

A pesar del interés despertado por estas publicaciones, la realidad indiscutible es que todas ellas⁷¹⁻⁸⁰ eran estudios preliminares e incompletos que no contenían la información necesaria para justificar el inicio de ensayos clínicos. Para empezar, ninguna de estos trabajos identificó específicamente el tipo celular causante de la regeneración miocárdica. Por lo tanto, cuando otros investigadores fueron incapaces de reproducir los resultados⁸¹⁻⁸⁴, fue imposible determinar si la causa de la discrepancia era técnica o biológica. Además, ninguno de estos trabajos estableció una relación dosis-efecto, una forma y una pauta de administración óptima o un efecto y un destino a largo plazo de las células trasplantadas. Por añadidura, ninguna de estas publicaciones investigó el mecanismo causante de la diferenciación miocárdica de las células trasplantadas.

A la falta de información sólida sobre la identidad de las células regenerantes y sobre la biología del proceso mismo se sumaba una serie de preguntas prácticas importantes cuya respuesta era necesaria para poder planear un ensayo clínico crítico que no pusiera en riesgo innecesario a los pacientes. Entre las incógnitas pendientes de resolver estaba determinar si los métodos que parecían efectivos en la regeneración del miocardio del ratón eran directamente aplicables a un organismo miles de veces más grande, como es el humano, independientemente de que el proceso biológico involucrado fuera similar o idéntico. El miocardio ventricular del ratón pesa unos 70 mg y tiene un grosor de aproximadamente 1 mm. Para regenerar un infarto que ha destruido el 30% de la masa ventricular se requiere la producción de unos 20 mg de miocardio en una capa muscular delgada. El ventrículo izquierdo de la mayoría de pacientes con IM pesa más o menos 500 g y tiene un espesor > 1 cm. Para regenerar el 30% del ventrículo se requiere la formación de unos 150 g de una pared muscular gruesa con múltiples arterias, arteriolas y capilares. Esta tarea es 7.000 veces mayor y cualitativamente más compleja que la regeneración del ratón. Por ello, las múltiples incógnitas que los experimentos en el ratón habían dejado sin resolver pronosticaban un largo período de trabajo experimental antes de que la terapia celular con células de la médula ósea, ya sea mediante trasplante o mediante su movilización con citocinas, estuviera en condiciones de entrar en ensayos clínicos.

Contrariamente a la predicción anterior y a pesar de las deficiencias de los datos en animales, el primer ensayo clínico de trasplante miocárdico de células derivadas de la médula ósea empezó inmediatamente después de la publicación de los primeros datos en el ratón^{85,86} sin haber realizado ninguna experimentación animal adicional. Es llamativo que los resultados de este ensayo fueron aceptados para su publicación al

día siguiente de su sumisión y fueron publicados menos de 6 meses después de la aparición de los resultados en el ratón⁸⁵. No hay duda que éste fue y sigue siendo la traslación más rápida de un protocolo experimental del ratón al humano en la historia de la medicina moderna. Las consecuencias de este apresuramiento deberían servir de advertencia acerca del peligro inherente a empezar protocolos experimentales en humanos antes de haber obtenido la información preclínica necesaria para poder planear un ensayo clínico crítico. Por si esta secuencia no hubiera sido lo suficientemente desafortunada, la publicación del grupo de Strauer⁸⁵ fue interpretada por muchos cardiólogos como el pistoletazo de salida para una estampida de ensayos clínicos en los que se utilizaran protocolos diversos para trasplantar diferentes tipos y mezclas de células en el miocardio humano sin ninguna forma de validación experimental en animales. Así pues, a los ensayos clínicos ya altamente cuestionables del trasplante de miocitos esqueléticos iniciados anteriormente por Menasché⁶¹ sin estar validados por experimentación animal se sumaron múltiples grupos que trasplantaban células de la médula ósea. Estos ensayos captaron la atención pública y, debido al optimismo de los investigadores, crearon expectativas exorbitantes en los candidatos potenciales y el público en general. Esta falta de cautela en la carrera hacia la implementación clínica hace recordar la sensatez de Clemenceau, el primer ministro de Francia durante la Primera Guerra Mundial, quien dijo que «la guerra es demasiado importante para dejarla en mano de los generales». Tal vez sea el momento de considerar que la decisión de empezar ensayos clínicos es demasiado importante para dejarla en mano de los clínicos que quieren llevarlos a cabo.

En este momento, los resultados de más de una docena de ensayos clínicos en fase I realizados con el objetivo de producir la regeneración miocárdica post-IM o para tratar insuficiencia cardíaca mediante el trasplante de células de la médula ósea autólogas ya están publicados⁸⁵⁻¹⁰⁶ y docenas más están en progreso a través del mundo. Como cabía esperar, dado lo relatado anteriormente, los resultados disponibles, incluso interpretados bajo una luz positiva, son inconsistentes, confusos, controvertidos y no convincentes. El único resultado común entre los diferentes grupos es que, a pesar de las grandes diferencias entre los protocolos utilizados, el trasplante de células de la médula ósea en el postinfarto y en la insuficiencia cardíaca crónica es factible y seguro, al menos a término medio, en manos de cardiólogos intervencionistas y cirujanos experimentados⁸⁵⁻¹⁰⁷. Por desgracia, debido a que cada grupo ha utilizado y continúa utilizando criterios diferentes para la selección de pacientes, la preparación y la selección de células, el método y el tiempo postinfarto de trasplante, el criterio y los parámetros utilizados para la determinación de resultados, etc., es impos-

sible comparar resultados entre los diferentes grupos. Es preocupante el hecho de que, aunque la mayoría de los grupos detecta una mejora en la fracción de eyección de los pacientes tratados en comparación con la del grupo placebo (cuando lo hay), las diferencias en la evolución de la fracción de eyección de los diferentes grupos placebo es mayor que la mejoría detectada en los grupos tratados. En este sentido, vale la pena notar que, en general, los grupos que detectan una mayor mejoría en la función ventricular de los tratados son a los que detectan una menor evolución positiva en los controles, y viceversa. Estos resultados levantan sospechas, tanto acerca de la validez de las mejorías que se anuncian como de los métodos utilizados para valorar los resultados del trasplante celular. En este sentido, es interesante que en el ensayo de seguimiento más largo, el incremento modesto en la fracción de eyección detectada a los 6 meses postrasplante ha desaparecido a los 18 meses debido a que el grupo placebo ha mejorado más que el tratado¹⁰⁸. Todavía más inquietante es el hecho de que, a pesar de que todos los ensayos clínicos llevados a cabo hasta ahora han sido de fase I y, por lo tanto, diseñados para probar la seguridad y la reproducibilidad del protocolo, la mayoría de las publicaciones ponen su énfasis en la efectividad aparente del procedimiento⁸⁵⁻¹⁰⁶.

A pesar de que los resultados de los ensayos clínicos en general se han presentado con un sesgo positivo y de los comentarios explosivos y mal informados de algunos individuos periféricos al desarrollo de esta disciplina¹⁰⁹, cada día está más claro que por lo menos los métodos de trasplante en humanos utilizados hasta ahora no producen los resultados «milagrosos» que originalmente se observaron en los ratones. Es más, varios ensayos no han logrado detectar ningún efecto atribuible a las células trasplantadas^{98,105,106}, aunque estos ensayos adolecen de defectos similares a los que encuentran resultados positivos. Por ello, es sorprendente que, enfrentados a esta realidad sobria y confusa, muchos de los investigadores clínicos que trabajan en este campo intenten ignorar que la regeneración miocárdica clínica ha llegado a un estado de crisis antes de salir de los ensayos de fase I¹⁰⁷. En lugar de reevaluar la situación presente y sus causas, intentar obtener la información necesaria que permita explorar la causa de la disparidad entre los resultados esperados y los obtenidos, y modificar los protocolos clínicos basados en información relevante, la mayoría de los «líderes» en este campo intentan ignorar la realidad. Muchos de los investigadores que hace 4 años, intrépidamente y sin ningún dato experimental propio, iniciaron ensayos clínicos prematuros están ahora esgrimiendo interpretaciones alternativas para explicar los resultados marginales que están obteniendo y, al mismo tiempo, justificar la inclusión de enfermos en el mismo tipo de protocolos^{95,104,110}, a veces avalados por sociedades internacionales de prestigio¹⁰⁷. El nuevo objetivo de moda para los trasplantes clínicos

no es la «regeneración», sino el efecto «paracrino» de las células trasplantadas sobre el miocardio sobreviviente con o sin «neovascularización» de la cicatriz⁹⁵ o incluso el trasplante de nuevas mitocondrias en los miocitos dañados¹¹¹. Como es ya común en este campo, estas explicaciones alternativas se publican en revistas internacionales de calidad sin ningún dato experimental o evidencia clínica que apoye la hipótesis expuesta. De forma similar, ensayos clínicos en enfermos en lista de espera para trasplante, mal diseñados porque son incapaces de determinar el destino de las células trasplantadas, se presentan como modelos de investigación clínica¹¹¹.

La situación actual es seria y amenaza el futuro de este campo. Después de haber trasplantado células de la médula ósea en más de 1.000 pacientes todavía no hay un solo dato sólido que demuestre si los protocolos utilizados son capaces de producir regeneración en el corazón humano. Además, no hay datos en animales que puedan servir de guía y ayudar a aclarar la confusión, debido a que hasta ahora todos los datos experimentales a favor de la regeneración han sido obtenidos únicamente en el ratón^{71,72,112} y aun éstos han sido retados por algunos investigadores⁸¹⁻⁸⁴. Aunque es improbable, la posibilidad de que la plasticidad de las células de la médula ósea para convertirse en células miocárdicas fuera en realidad una propiedad limitada a los roedores ni siquiera se ha explorado.

La falta de información experimental sólida sobre un tópico de tanta visibilidad y de tanta importancia clínica representa un fallo y es una responsabilidad tanto de los investigadores básicos como de los clínicos. Con pocas excepciones^{92,95}, los investigadores clínicos no han realizado ensayos preclínicos de los protocolos y del tipo de células que están trasplantando en humanos. Por su lado, los investigadores básicos han consumido mucha de su energía y recursos debatiendo aquello de «si son galgos o podencos» inmiscuidos en 2 discusiones totalmente irrelevantes, tanto para la investigación básica sobre regeneración como para su aplicación clínica: *a*) si la «fusión» de las células trasplantadas con los miocitos sobrevivientes podía explicar la «regeneración» detectada en los ratones¹¹³, olvidándose que, por definición, la fusión celular no puede explicar la formación de una sola nueva célula, y *b*) si las técnicas inmunohistopatológicas con marcaje de ADN son adecuadas para identificar la formación de nuevos miocitos^{83,84,114-117}. Al mismo tiempo que estas discusiones han paralizado la investigación sobre regeneración miocárdica, se han publicado cientos de artículos que han utilizado las mismas técnicas para estudiar la regeneración de otros tejidos, incluido el SNC^{33,118}.

Una de las consecuencias de estas luchas internas ha sido que esta disciplina, durante los pasados 4 años no ha generado información nueva respecto a la identificación de las células con capacidad regenerativa mio-

cárdica ni acerca de las bases biológicas de los putativos efectos benéficos observados en los ratones y, posiblemente, en humanos. Mientras tanto, el número de ensayos clínicos continúa proliferando como si los datos preclínicos que justifican la aplicación de estos procedimientos en humanos fuera un asunto totalmente resuelto.

Las células utilizadas para producir regeneración miocárdica en el ratón fueron seleccionadas por la expresión de c-kit, el receptor de membrana para el factor de células madre (SCF, *stem cell factor*), una proteína expresada en las células madre hematopoyéticas y en una pequeña fracción de otras células de la médula ósea y de otros tejidos. Sin embargo, en los ensayos clínicos, cuando no se utiliza toda la fracción mononuclear de la médula ósea, las células trasplantadas se seleccionan sobre la base de la expresión de CD133, un antígeno de función desconocida expresado en células madre hematopoyéticas y endoteliales, entre otras. Sin embargo, no hay una sola publicación que haya demostrado capacidad de regeneración miocárdica mediante el uso ya sea de la fracción mononuclear o células CD133^{pos} en animales o en humanos. A pesar de que hay varias publicaciones que sugieren que, por lo menos en el ratón, las células madre hematopoyéticas no tienen capacidad regenerativa cardíaca⁸¹⁻⁸⁴ y que lo más probable es que esta capacidad esté limitada a un tipo celular con características de células madre mesenquimatosas provenientes de la estroma de la médula ósea^{76,80,119}, los ensayos clínicos con médula ósea continúan planeándose con el objetivo de trasplantar el máximo número posible de células madre hematopoyéticas dentro del miocardio.

Dejando de lado el hecho de que todavía no conocemos la identidad precisa de las células de la médula con capacidad regenerativa cardíaca, la realidad es que todavía no hay una sola publicación avalada que haya demostrado la posibilidad de regenerar anatómica y funcionalmente un miocardio con la masa y el grosor del corazón humano, hecho que no es extrapolable de la información obtenida en el ratón, como ya hemos discutido anteriormente. Asumiendo que sea posible efectuar la reparación del miocardio humano, no hay ninguna información acerca del tipo y el número de células necesarias para ello, sobre cuál es la ruta y la pauta de administración más eficiente, etc. Dado el estado de este campo, no es sorprendente que, a pesar de la enorme inversión en recursos materiales y humanos efectuada en los ensayos clínicos de regeneración miocárdica, todavía no ha sido posible demostrar que se haya salvado o siquiera extendido la vida de una sola persona. Por lo tanto, el argumento esgrimido por algunos investigadores clínicos y defendido por un consenso adoptado por la Sociedad Europea de Cardiología¹⁰⁷ de que la gravedad de condición clínica tratada justifica los heterodoxos métodos utilizados hasta ahora es difícilmente convincente.

LOS ENSAYOS CLÍNICOS DE TRASPLANTE CELULAR PUBLICADOS Y LOS QUE ESTÁN AHORA EN PROGRESO NO ESTÁN EXPLORANDO LA REGENERACIÓN DEL MIOCARDIO

Incluso si dejamos de lado el reto arquitectónico de la masa, el grosor, la complejidad del sistema vascular, los tipos y la organización de las fibras del miocardio humano en comparación con el del ratón, los ensayos clínicos tienen otros defectos importantes, aparte de la identidad de las células regenerativas. Aceptando como un hecho demostrado que las células con capacidad regenerativa son células de la médula ósea con características de células madre que están incluidas en las células trasplantadas, y haciendo las extrapolaciones más conservadoras de los datos obtenidos en el ratón y las más optimistas sobre la abundancia de células madre en la médula ósea, los pacientes que han recibido el número más alto de células⁹¹, como máximo podrían haber regenerado entre 1 y 5 g de miocardio (en realidad, cantidades mucho menores). El problema es mucho más serio en el caso de los trasplantes de mioblastos esqueléticos, donde como máximo se pueden producir miligramos de tejido⁶¹. Además, es una realidad indiscutible que ninguno de los métodos disponibles para medir la función ventricular, ya sea invasivos o no, tiene la sensibilidad necesaria para medir la contribución funcional de 5 g de miocardio. Así pues, ninguno de los protocolos clínicos trasplanta suficientes células para que estas células o sus descendientes puedan tener un efecto directo detectable sobre la función cardíaca, aunque sobrevivan y aniden eficazmente, se multipliquen de 1 a 1.000 y se diferencien completamente en tejido cardíaco. Ello supone que, aunque los resultados funcionales positivos modestos y transitorios publicados hasta ahora fueran reales, *no pueden* ser consecuencia de la regeneración miocárdica directamente producida por las células trasplantadas. Los efectos positivos sobre la función ventricular de los trasplantes celulares llevados a cabo hasta ahora, si es que son reales, por necesidad tienen que ser debidos a un efecto paracrino de las células trasplantadas sobre los miocitos y células madre del miocardio sobreviviente. Muy recientemente se han obtenido datos experimentales en apoyo de esta hipótesis^{120,121}.

LLAMADA PARA UNA MORATORIA EN LOS ENSAYOS CLÍNICOS DE TRASPLANTE CELULAR EN EL MIOCARDIO

Debido a la situación caótica en la que actualmente se encuentra el campo de la regeneración miocárdica mediante el trasplante celular, no es de extrañar que la controversia acerca de la efectividad de esta modalidad terapéutica sea cada vez más vitriólica y lleva camino de continuar acentuándose. Como era predecible,

el escepticismo acerca del potencial e incluso acerca de la factibilidad de producir regeneración cardíaca con relevancia fisiológica ha ido aumentando paulatinamente hasta haber alcanzado un nivel que amenaza con destruir el futuro de esta disciplina en sus orígenes. Tristemente, tanto los investigadores clínicos como los básicos en este campo hemos contribuido al desarrollo de esta situación y tenemos que aceptar nuestra cuota de responsabilidad. No había ninguna necesidad de que la regeneración miocárdica como disciplina científica y/o clínica se desarrollara de forma tan indisciplinada e irresponsable. Otras especialidades que han enfrentado problemas de tan o más difícil solución que los del miocardio han demostrado que es posible seguir un curso más sensato y más productivo. Como muestra, basta comparar el estado de confusión de la regeneración cardíaca mediante trasplante celular con el campo de regeneración neuronal del SNC. A pesar de su inicio más precoz y de haber generado información más extensa y profunda sobre el origen, la biología y el potencial regenerativo de las células madre neuronales fetales y adultas obtenida en múltiples experimentos con diferentes modelos animales, incluidos primates, el primer ensayo clínico en fase I con células madre neuronales acaba de ser aprobado por la Food and Drug Administration para el tratamiento de la enfermedad de Bates (una enfermedad del grupo de lipofuscinoses ceroides neurales)¹²². Si la terapia celular cardiovascular hubiera evolucionado con una cautela similar, es probable que hoy nos encontrásemos en una situación más favorable.

Ya que tanto los investigadores clínicos como los básicos somos igualmente responsables de la confusión y el caos actual, es urgente que tomemos las decisiones necesarias para enderezar y enfocar la investigación sobre el uso de células madre para la regeneración miocárdica y su aplicación clínica de la forma más productiva posible y sin crear riesgos innecesarios para los pacientes. Afortunadamente, una de las características más atractivas y positivas del proceso científico es que, dándole suficiente tiempo, siempre autocorrigue tanto los excesos realizados como las faltas por omisión. El reto para la comunidad médico-científica es identificar las correcciones necesarias para no perder oportunidades y, al mismo tiempo, evitar afectar adversamente a los pacientes. Como hemos señalado de forma repetida, en el caso de la terapia miocárdica con células de la médula ósea, no conocemos la identidad de las células con potencial regenerador. Por lo tanto, independientemente de cuán detallados y cuidadosos sean los protocolos clínicos utilizados, es imposible conocer el número o la condición de las células efectivas trasplantadas. En consecuencia, *no es posible evaluar los resultados de una terapia cuando se desconoce la identidad del agente terapéutico y la dosis administrada*, especialmente si los resultados obtenidos son marginales o negativos,

como es el caso aquí discutido. Sin esta información, los cambios efectuados en los protocolos para mejorar los resultados no son más que disparos a ciegas. Por ello, es extraño y preocupante que, dadas las deficiencias de nuestros conocimientos y el tono de la controversia actual, los órganos reguladores tanto hospitalarios como de la sanidad pública continúen aprobando nuevos ensayos clínicos cuya probabilidad de producir resultados convincentes es mínima.

Debido a que los protocolos utilizados, particularmente en los ensayos aleatorizados, son invasivos y no inocuos para individuos sin posibilidad de beneficio (extracción de médula ósea con anestesia o sedación general, inyección intracoronaria pocos días después del infarto, tanto en el grupo control como en el tratado, etc.) nuestra opinión es que ha llegado el momento de revalorar exhaustivamente tanto la información básica como el proceso más adecuado para aplicar esta información a la clínica. Para ello sugerimos la *adopción de una moratoria en el inicio de nuevos ensayos clínicos sobre trasplante celular en el miocardio* hasta que se haya generado la información necesaria en modelos animales relevantes para la condición humana que permita diseñar ensayos clínicos que, además de ser seguros para los pacientes, generen resultados interpretables, tanto si son positivos como negativos. La información obtenida con ensayos así diseñados permitirá, a su vez, la modificación racional de los protocolos para llegar paulatinamente a la optimización de los resultados.

Para ser productiva, la moratoria en los ensayos clínicos aquí sugerida debe ser utilizada para poder responder a un mínimo de preguntas cuya respuesta es necesaria para poder diseñar protocolos clínicos racionales. Entre estas preguntas están:

1. ¿Es la capacidad de diferenciación de las células de la médula ósea en células miocárdicas una propiedad limitada a los roedores o es compartida con otras especies, incluida la humana?
2. ¿Cuál es la identidad de las células de la médula ósea capaces de generar células miocárdicas?
3. ¿Cuál es el destino a corto y largo plazo de las células trasplantadas en el miocardio de animales grandes?
4. ¿Es posible obtener un número suficiente de células autólogas con capacidad terapéutica para producir directamente resultados fisiológicos cuantificables en un corazón de tamaño similar al humano?
5. ¿Cuál es mecanismo de acción de las células trasplantadas, una contribución directa a la masa contráctil o un efecto paracrino sobre el miocardio sobreviviente?
6. ¿Cuál es la ruta de administración más efectiva?
7. ¿Cuáles son el momento y la pauta óptima de administración: administración en el postinfarto agudo, subagudo o crónica?

8. ¿Cuál es la duración del efecto beneficioso detectable sobre la función ventricular de animales grandes?

9. ¿Cuál es el mejor predictor de un efecto clínico positivo?

Cuando estas respuestas estén en nuestro poder estaremos en mejor posición para revalorar el potencial de esta nueva putativa modalidad terapéutica. Sin embargo, debemos recordar que, aunque las respuestas fueran a favor del desarrollo clínico, este tipo de terapia todavía tiene que salvar 3 obstáculos importantes que frenarán su aplicación amplia: *a)* está basada en un concepto obsoleto y equívoco de la homeostasis celular del miocardio y su regeneración; *b)* será difícil determinar el destino de las células trasplantadas a largo plazo en el contexto de la longevidad de la vida humana, y *c)* el procedimiento es muy caro en recursos humanos y materiales y, por lo tanto, estará a disposición de una fracción muy pequeña de la población candidata al tratamiento regenerativo miocárdico.

¿CUÁL ES EL FUTURO DEL TRASPLANTE CELULAR MIOCÁRDICO?

Lenta pero inexorablemente, la comunidad cardiovascular tanto investigadora como clínica empieza a aceptar que el miocardio adulto tiene una capacidad regenerativa intrínseca significativa basada en la presencia de células madre miocárdicas capaces de regenerar miocitos y microvasculatura. Sin embargo, estos conceptos no han sido incorporados todavía en los protocolos diseñados para regenerar el déficit de miocitos producido por la cardiopatía isquémica. Todos los protocolos clínicos sin excepción se basan en el concepto del miocardio como tejido constituido por células posmitóticas diferenciadas, carente de células madre y, por lo tanto, sin ninguna capacidad regenerativa intrínseca. En consecuencia, la regeneración se intenta con el trasplante al miocardio de células exógenas pero con capacidad contráctil (miocitos esqueléticos) o células con el potencial de convertirse en células miocárdicas (médula ósea). Este desfase entre los conocimientos básicos y los protocolos clínicos es debido en gran parte al corto período de desarrollo de este campo, y cabe esperar que se corrija en un plazo de tiempo relativamente corto. Con la información disponible sobre la biología de las células madre cardiacas y extrapolando la información sobre otros órganos, es difícil no ser optimistas acerca del futuro de la investigación sobre la regeneración miocárdica y su potencial para revolucionar la medicina cardiovascular.

Una vez resueltos los problemas del trasplante celular discutidos aquí, es probable que este tipo de terapia sirva de puente hacia un modelo terapéutico diferente. En un futuro próximo debemos completar el desarrollo de métodos, hasta ahora limitados al laboratorio experimental, para producir regeneración en el corazón hu-

mano mediante la utilización de su capacidad regenerativa intrínseca y sin tener que emplear el trasplante celular en general y de células extrínsecas al corazón en particular¹²³⁻¹²⁶. Sin embargo, debemos hacer hincapié en que, a pesar de un futuro prometedor con estas nuevas posibilidades, antes de empezar ensayos clínicos con estos nuevos métodos debemos contestar a una serie de preguntas similares a las enunciadas anteriormente para la terapia celular. Además, una vez contestadas estas preguntas, los primeros ensayos clínicos deben llevarse a cabo en enfermos con insuficiencia cardíaca terminal en lista de espera para el trasplante cardíaco, para así minimizar los riesgos y, al mismo tiempo, asegurarnos de que podremos documentar los efectos de la terapia de una forma directa y detallada.

Éste es un momento adecuado para recordar que en investigación clínica, así como en la vida en general, cuanta más prisa tengamos, menos debemos correr. No podemos ni debemos olvidarnos del efecto negativo sobre el trasplante ocasionado por Barnard¹²⁷ y los problemas más recientes de la terapia genética¹²⁸⁻¹³¹. En ambos casos, el avance de la respectiva disciplina médica se retrasó durante años debido a que la aplicación clínica se inició antes de obtener la información experimental necesaria. Si absorbemos estas lecciones históricas y actuamos con responsabilidad y cautela, esta nueva disciplina de regeneración miocárdica, basada en un conocimiento profundo de la biología de las células madre del corazón, nos ofrece la oportunidad de prevenir la aparición de la insuficiencia cardíaca y poder alterar de forma radical su pronóstico una vez que aparezca en una importante fracción de enfermos con miocardiopatía isquémica.

BIBLIOGRAFÍA

- American Heart Association. Heart Disease and Stroke Statistics: 2005 Update. Dallas: American Heart Association; 2005.
- Dib N, Taylor DA, Diethrich EB. Stem cell therapy and tissue engineering for cardiovascular repair: from basic research to clinical applications. New York: Springer; 2006.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282:1145-7.
- Shambloot MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:13726-31.
- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature*. 1981;292:154-6.
- Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981;78:7634-8.
- Vogel G. Stem cell research: studies cast doubt on plasticity of adult cells. *Science*. 2002;295:1989-91.
- Vogel G. Stem cell policy: can adult stem cells suffice? *Science*. 2001;292:1820-2.
- Holden C. California's proposition 71 launches stem cell gold rush. *Science*. 2004;306:1111.
- Vogel G. Swedish research: new stem cell fund raises hackles. *Science*. 2002;298:517.
- Thomas ED, Lochte HL Jr, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med*. 1957;257:491-6.
- Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med*. 2006;354:1813-26.
- Gallico GG 3rd, O'Connor NE, Compton CC, Kehinde O, Green H. Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N Engl J Med*. 1984;311:448-51.
- Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol*. 2000;18:399-404.
- Mayhall EA, Paffett-Lugassy N, Zon LI. The clinical potential of stem cells. *Curr Opin Cell Biol*. 2004;16:713-20.
- Pera MF, Trounson AO. Human embryonic stem cells: prospects for development. *Development*. 2004;131:5515-25.
- Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*. 1988;241:58-62.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284:143-7.
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002;418:41-9.
- Alonso L, Fuchs E. Stem cells of the skin epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:11830-5.
- Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabe-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, et al. 2001. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol*. 2001;3:778-84.
- Mauro A. Satellite cells of muscle skeletal fibers. *J Biophys Biochem Cytol*. 1961;9:493-5.
- Polesskaya A, Seale P, Rudnicki MA. Wnt signaling induces the myogenic specification of resident CD45+ adult stem cells during muscle regeneration. *Cell*. 2003;113:841-52.
- Jankowski RJ, Deasy BM, Huard J. Muscle-derived stem cells. *Gene Ther*. 2002;9:642-7.
- Parker MH, Seale P, Rudnicki MA. Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis. *Nat Rev Genet*. 2003;4:497-507.
- Bjerknes M, Cheng H. Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors. *Gastroenterology*. 1999;116:7-14.
- Forbes S, Vig P, Poulsom R, Thomas H, Alison M. Hepatic stem cells. *J Pathol*. 2002;197:510-8.
- Bonner-Weir S, Sharma A. Pancreatic stem cells. *J Pathol*. 2002;197:519-26.
- Hu Y, Zhang Z, Torsney E, Afzal AR, Davison F, Metzler B, et al. Abundant progenitor cells in the adventitia contribute to atherosclerosis of vein grafts in ApoE-deficient mice. *J Clin Invest*. 2004;113:1258-65.
- Álvarez-Buylla A, Nottebohm F. Migration of young neurons in adult avian brain. *Nature*. 1988;335:353-4.
- Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*. 1992;255:1707.
- Richards LJ, Kilpatrick TJ, Bartlett PF. De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:8591-5.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*. 1998;4:1313-7.
- Oh H, Wang SC, Prahara A, Sano M, Moravec CS, Taffet GE, et al. Telomere attrition and Chk2 activation in human heart failure. *PNAS*. 2003;100:5378-83.
- Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 2003;114:763-76.

36. Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:12313-8.
37. Martin CM, Meeson AP, Robertson SM. Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, *Abcg2*, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart. *Dev Biol*. 2004;265:262-75.
38. Messina E, De Angelis L, Frati G. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res*. 2004;95:911-21.
39. Matsuura K, Nagai T, Nishigaki N. Adult cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes. *J Biol Chem*. 2004;279:11384-91.
40. Laugwitz KL, Moretti A, Lam J. Postnatal *Isl1*+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature*. 2005;433:647-53.
41. Pfister O, Mouquet F, Jain M, Summer R, Helmes M, Fine A, et al. CD31- but Not CD31+ cardiac side population cells exhibit functional cardiomyogenic differentiation. *Circ Res*. 2005;97:52-61.
42. Normile D. South Korea Picks up the Pieces. *Science*. 2006;312:1298-9.
43. Romyantsev PP. Interrelations of the proliferation and differentiation processes during cardiac myogenesis and regeneration. *Int Rev Cytol*. 1977;51:186-273.
44. Anversa P, Kajstura J. Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *Circ Res*. 1998;83:1-14.
45. Nadal-Ginard B. Commitment, fusion and biochemical differentiation of a myogenic cell line in the absence of DNA synthesis. *Cell*. 1978;15:855-64.
46. Tam SK, Gu W, Mahdavi V, Nadal-Ginard B. Cardiac myocyte terminal differentiation. Potential for cardiac regeneration. *Ann NY Acad Sci*. 1995;752:72-9.
47. Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan SM, Finato N, Bussani R, et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2001;344:1750-7.
48. Urbanek K, Quaini F, Tasca G, Torella D, Castaldo C, Nadal-Ginard B, et al. Intense myocyte formation from cardiac stem cells in human cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:10440-5.
49. Morrison SJ, Uchida N, Weissman IL. The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1995;11:35-71.
50. Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P. Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res*. 2003;92:139-50.
51. Torella DT, Urbanek K, Rota M, Whang B, Nurzynska D, Baker M, et al. Cardiac stem cells regenerate the infarcted heart, restoring function and long-term survival in Mice. *Circ*. 2004;110 Suppl III:170.
52. Urbanek K, Rota M, Cascapera S, Bearzi C, Nascimbene A, De Angelis A, et al. Cardiac stem cells possess growth factor-receptor systems that after activation regenerate the infarcted myocardium, improving ventricular function and long-term survival. *Circ Res*. 2005;97:663-73.
53. Al-khaldi A, Robbins RC. New directions in cardiac transplantation. *Annu Rev Med*. 2006;57:455-71.
54. Koh GY, Klug MG, Soonpaa MH, Field LJ. Differentiation and long-term survival of c2c12 myoblast grafts in heart. *J Clin Invest*. 1993;92:1548-54.
55. Chiu RC-J, Zibaitis A, Kao RL. Cellular cardiomyoplasty: myocardial regeneration with satellite cell implantation. *Ann Thorac Surg*. 1995;60:12-8.
56. Murry CE, Wiseman RW, Schwartz SM. Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis. *J Clin Invest*. 1996;98:2512-23.
57. Taylor DA. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med*. 1998;4:929-33.
58. Soonpaa MH, Koh GY, Klug MG. Formation of nascent intercalated discs between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium. *Science*. 1994;264:98-101.
59. Reinecke H, Zhang M, Bartosek T, Murry CE. Survival, integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts: a study in normal and injured rat hearts. *Circulation*. 1999;100:193-202.
60. Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest*. 1996;98:216-24.
61. Menasché P. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet*. 2001;357:279-80.
62. Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science*. 2000;290:1775-9.
63. Lagasse E, Connors H, Al Dhalimy M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med*. 2000;6: 229-34.
64. LaBarge MA, Blau HM. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell*. 2002;111:589-601.
65. Doyonnas R, LaBarge MA, Sacco A, Charlton C, Blau HM. Hematopoietic contribution to skeletal muscle regeneration by myelomonocytic precursors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;101:13507-12.
66. Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood*. 2003;102:3483-93.
67. Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*. 2002;416:542-5.
68. Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, Weissman IL. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science*. 2002;297:2256-9.
69. Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell*. 2004;116:639-48.
70. Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, Finato N, Beltrami CA, Nadal-Ginard B, et al. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med*. 2002;346:5-15.
71. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001;410:701-5.
72. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:10344-9.
73. Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest*. 2001;107:1395-402.
74. Condorelli G, Borello U, De Angelis L, Latronico M, Sirabella D, Coletta M, et al. Cardiomyocytes induce endothelial cells to trans-differentiate into cardiac muscle: Implications for myocardium regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:10733-8.
75. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*. 2002;105:93-8.
76. Mangi AA, Noiseux N, Kong D. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat Med*. 2003;9:1195-201.
77. Badorff C, Brandes RP, Popp R, Rupp S, Urbich C, Aicher A, et al. Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. *Circulation*. 2003;107:1024-32.
78. Kawada H, Fujita J, Kinjo K, Matsuzaki Y, Tsuma M, Miyatake H, et al. Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood*. 2004;104:3581-7.
79. Botta R, Gao E, Stassi G, Bonci D, Pelosi E, Zwas D, et al. Heart infarct in NOD-SCID mice: therapeutic vasculogenesis by transplantation of human CD34+ cells and low dose CD34+KDR+ cells. *FASEB J*. 2004;18:1392-4.

80. Yoon YS, Wecker A, Heyd L, Park JS, Tkebuchava T, Kusano K, et al. Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. *J Clin Invest*. 2005;115:326-38.
81. Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature*. 2004;428:668-73.
82. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature*. 2004;428:664-8.
83. Chien KR. Stem cells: lost in translation. *Nature*. 2004;428:607-8.
84. Nygren JM, Jovinge S, Breitbach M. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med*. 2004;10:494-501.
85. Strauer BE. Myocardial regeneration after intracoronary transplantation of human autologous stem cells following acute myocardial infarction [in German]. *Dtsch Med Wschr*. 2001;126:932-8.
86. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernandez A, Sorg RV, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation*. 2002;106:1913-8.
87. Kuethe F, Richartz BM, Sayer HG, Kasper C, Werner GS, Hoffman K, et al. Lack of regeneration of myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans with large anterior myocardial infarctions. *Int J Cardiol*. 2004;97:123-7.
88. 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.
89. Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, et al. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet*. 2003;361:45-6.
90. Galinanes M, Loubani M, Davies J, Chin D, Pasi J, Bell PR. Autotransplantation of unmanipulated bone marrow into scarred myocardium is safe and enhances cardiac function in humans. *Cell Transplant*. 2004;13:7-13.
91. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet*. 2004;364:141-8.
92. Fernández-Avilés F, San Román JA, García-Frade J, Fernández ME, Penarrubia MJ, De la Fuente L, et al. Experimental and clinical regenerative capability of human bone marrow cells after myocardial infarction. *Circ Res*. 2004;95:742-8.
93. Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, Silva SA, Sousa AL, Silva GV, et al. Improved exercise capacity and ischemia 6 and 12 months after transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic cardiomyopathy. *Circulation*. 2004;110 Suppl 1:213-8.
94. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, et al. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*. 2002;106:3009-17.
95. Schachinger V, Assmus B, Britten MB, Honold J, Lehmann R, Teupe C, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction Final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44:1690-9.
96. 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 9:178-83.
97. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Bartsch T, Schannwell C, Antke C, et al. Regeneration of human infarcted heart muscle by intracoronary autologous bone marrow cell transplantation in chronic coronary artery disease: the IACT Study. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46:1651-8.
98. Janssens S, Dubois C, Bogaert J, Theunissen K, Deroose C, Desmet W, et al. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet*. 2006;367:113-21.
99. Fuchs S, Satler LF, Kornowski R, Okubagzi P, Weisz G, Baffour R, et al. Catheter-based autologous bone marrow myocardial injection in no-option patients with advanced coronary artery disease: a feasibility study. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41:1721-4.
100. Fuchs S, Kornowski R, Weisz G, Satler LF, Smits PC, Okubagzi P, et al. Safety and feasibility of transendocardial autologous bone marrow cell transplantation in patients with advanced heart disease. *Am J Cardiol*. 2006;97:823-9.
101. Briguori C, Reimers B, Sarais C, Napodano M, Pascotto P, Azzarello G, et al. Direct intramyocardial percutaneous delivery of autologous bone marrow in patients with refractory myocardial angina. *Am Heart J*. 2006;151:674-80.
102. Erbs S, Linke A, Adams V, Lenk K, Thiele H, Diederich KW, et al. Transplantation of blood-derived progenitor cells after recanalization of chronic coronary artery occlusion: first randomized and placebo-controlled study. *Circ Res*. 2005;97:756-62.
103. Patel AN, Geffner L, Vina RF, Saslavsky J, Urschel HC Jr, Kormos R, et al. Surgical treatment for congestive heart failure with autologous adult stem cell transplantation: a prospective randomized study. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2005;130:1631-8.
104. Schachinger V, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM. Bone-marrow-derived progenitor cell therapy in need of proof of concept: design of the REPAIR-AMI trial. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2006;3 Suppl 1:23-8.
105. Lunde K, Solheim S, Aakhus S. Autologous stem cell transplantation in acute myocardial infarction: the ASTAMI randomized controlled trial. Intracoronary transplantation of autologous mononuclear bone marrow cells, study design and safety aspects. *Scand Cardiovasc J*. 2005;39:150-8.
106. Cleland JCF, Freemantle N, Coletta AP, Clark AL. Clinical trials update from the American Heart Association: REPAIR-AMI, ASTAMI, JELIS, MEGA, REVIVE-II, SURVIVE, and PROACTIVE. *Eur J Heart Fail*. 2006;8:105-10.
107. Bartunek J, Dimmeler S, Drexler H, Fernández-Avilés F, Galinanes M, Janssens S, et al. 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*. 2006. En prensa.
108. Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, Steffens J, Lippolt P, Fichtner S, et al. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (BOne marrow transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial. *Circulation*. 2006;113:1287-94.
109. Bolli R, Njeid H, Dawn B. Bone marrow cell-mediated cardiac regeneration: a veritable revolution. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46:1659-61.
110. Schaefer A, Meyer GP, Fuchs M, Klein G, Kaplan M, Wollert KC, et al. Impact of intracoronary bone marrow cell transfer on diastolic function in patients after acute myocardial infarction: results from the BOOST trial. *Eur Heart J*. 2006;27:929-35.
111. Mack GS. Trial set to test how stem cells heal a broken heart. *Nat Med*. 2006;12:483.
112. Kajstura J, Rota M, Whang B, Cascapera S, Hosoda T, Bearzi C, et al. Bone marrow cells differentiate in cardiac cell lineages after infarction independently of cell fusion. *Circ Res*. 2005;91:127-37.
113. Álvarez-Dolado M, Pardal R, García-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, et al. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature*. 2003;425:968-73.

114. Jackson KA, Snyder DS, Goodell MA. Skeletal muscle fiber-specific green autofluorescence: potential for stem cell engraftment artifacts. *Stem Cells*. 2004;22:180-7.
115. Taylor DA, Hruban R, Rodríguez ER, Goldschmidt-Clermont PJ. Cardiac chimerism as a mechanism for self-repair: does it happen and if so to what degree? *Circulation*. 2002;106:2-4.
116. Murry CE, Field LJ, Menasche P. Cell-based cardiac repair: reflections at the 10-year point. *Circulation*. 2005;112:3174-83.
117. Pearson H. Stem-cell tagging shows flaws. *Nature*. 2006;439:519.
118. Wurmser AE, Nakashima K, Summers RG, Toni N, D'Amour KA, Lie DC, et al. Cell fusion-independent differentiation of neural stem cells to the endothelial lineage. *Nature*. 2004;430:350-6.
119. Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res*. 2004;95:9-20.
120. Kubal CH, Sheth K, Nadal-Ginard B, Galiñanes M. Bone marrow cells have a potent anti-ischemic effect against myocardial cell death in man. *J Thoracic Surg*. 2006. En prensa.
121. Uemura R, Xu M, Ahmad N, Ashraf M. Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodeling of ischemic heart through paracrine signaling. *Circ Res*. 2006;98:1414-21.
122. Taupin P. HuCNS-SC (StemCells). *Curr Opin Mol Ther*. 2006;8:156-63.
123. Ellison GM, Torella D, Ibanez B, Méndez-Ferrer S, Fernández F, Pérez-Martínez C, et al. Activation of cardiac stem-progenitor cells by intramyocardial injection of growth factors regenerate the infarcted pig heart. *Circulation Suppl*. 2005. En prensa.
124. Torella D, Ellison GM, Nadal-Ginard B, Indolfi C. Cardiac stem and progenitor cell biology for regenerative medicine. *Trends Cardiovasc Med*. 2005;15:229-36.
125. Torella D, Ellison GM, Mendez-Ferrer S, Ibanez B, Nadal-Ginard B. Resident human cardiac stem cells: role in cardiac cellular homeostasis and potential for myocardial regeneration. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2006;3 Suppl 1:8-13.
126. Mendez-Ferrer S, Ellison GM, Torella D, Nadal-Ginard B. Resident progenitors and bone marrow stem cells in myocardial renewal and repair. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2006;3 Suppl 1:83-9.
127. Barnard CN. The operation. A human cardiac transplant: an interim report of a successful operation performed at Groote Schuur Hospital, cape Town. *S Afr Med J*. 1967;41:1271-4.
128. McNeish I, Seckl MJ. Gene therapy approaches for cancer. En: Brooks G, editor. *Gene therapy: the use of DNA as a drug*. London: Pharmaceutical Press; 2002.
129. McNeish IA, Bell SJ, Lemoine NR. Gene therap progress and prospects: cancer gene therapy using tumour suppressor genes. *Gene Ther*. 2004;11:497-503.
130. Zolotukhin S. Production of recombinant adeno-associated virus vectors. *Hum Gene Ther*. 2005;16:551-7.
131. Carter BJ. Adeno-associated virus vectors in clinical trials. *Hum Gene Ther*. 2005;16:541-50.