

## Ingeniería tisular cardiaca

### Cardiac tissue engineering

Fernando García Muñoz, Pascual Vicente Crespo Ferrer, José Manuel García López  
Departamento de Histología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada

#### Resumen

La recuperación de la pérdida de capacidad funcional cardiaca es uno de los campos de investigación más atractivos para la ingeniería tisular y medicina regenerativa por su alta incidencia y prevalencia. En los últimos años la cardiomioplastia celular, que consiste en implantar células aisladas con capacidad regenerativa, se ha desarrollado notablemente como una herramienta clínicamente útil, aunque los resultados son cuantitativamente escasos. Debido a la baja retención de células implantadas, se han utilizado técnicas de ingeniería tisular para intentar mejorar la capacidad funcional. La ingeniería tisular *in situ*, que consiste en administrar de manera conjunta células y una matriz extracelular, ha conseguido aumentar la retención de células y mejora los resultados de la cardiomioplastia celular. La ingeniería tisular *in vitro* a nivel tisular, que se basa en construir en el laboratorio parches tridimensionales con células, matrices y señales necesarias para la construcción de un sustituto tisular que posteriormente es implantado en la zona dañada, ha mejorado las capacidades funcionales contráctiles cardiacas gracias al uso de biorreactores que intentan mimetizar el microambiente cardiaco. La ingeniería tisular *in vitro* a nivel de órgano consiste en la descelerización del órgano cardíaco y la posterior perfusión de de distintos tipos celulares para intentar repoblar el miocardio y el sistema vascular. Se ha conseguido la contracción y el acoplamiento eléctrico de cardiomiocitos, pero por el momento, la capacidad contráctil final es escasa. Otras técnicas de ingeniería tisular basadas en matrices acelulares o en constructos amatriaciales han servido de pasos intermedios hacia los avances en la ingeniería tisular *in vitro*.

#### Abstract

The recovery of cardiac functional capacity loss is one of the most attractive research fields for tissue engineering and regenerative medicine due to their high incidence and prevalence. In recent years cellular cardiomyoplasty, which involves implanting isolated cells with regenerative capacity, has developed significantly as a clinically useful tool, although the results are quantitatively scarce. Due to the low retention of implanted cells, we have used tissue engineering techniques to try to improve functional capacity. *In situ* tissue engineering, which comprises administering together extracellular matrix and cells, has managed to increase the retention of cells and enhances the performance of cellular cardiomyoplasty. *In vitro* tissue engineered at tissue level, which is based on building three dimensional patches in laboratory with cells, matrices and signals required for the construction of a replacement tissue, that is subsequently implanted into the damaged area, has improved functional capabilities by the use of bioreactors that attempt to mimic the cardiac microenvironment. Tissue engineering *in vitro* at organ level is supported by cardiac organ decellularization and subsequent infusion of different cell types to attempt to repopulate the myocardium and vascular system. Contractility and the electrical coupling of cardiomyocytes were achieved, but for the moment, the contractile capacity is scarce. Other techniques based tissue engineered acellular matrices or amatrix constructs have served as intermediate steps toward progress in tissue engineering *in vitro*.

*Palabras clave:* Ingeniería tisular cardiaca, Terapia celular, Regeneración cardiaca.

*Keywords:* Cardiac tissue engineering, Cell therapy, Cardiac regeneration.

#### INTRODUCCIÓN

Muchas enfermedades cardiovasculares, y entre ellas el infarto de miocardio (1), muestran en su etapa final insuficiencia cardíaca. Este déficit funcional es uno de los más importantes campos de investigación en la medicina regenerativa por la prevalencia e incidencia de la insuficiencia cardiaca. Cuando dicha insuficiencia progresa, el trasplante cardíaco es, a pesar de los avances realizados en las últimas décadas, la única herramienta terapéutica que permite actualmente restablecer el déficit funcional cardíaco.

Pero el trasplante cardíaco tiene también sus limitaciones, ya sea por el pobre número de donantes que facilitan el trasplante, o por las complicaciones que puede presentar este tratamiento (2).

El infarto agudo de miocardio (IAM) se produce cuando el riego sanguíneo del corazón es interrumpido a nivel arterial y se produce la isquemia de una determinada área miocárdica y la muerte de cardiomiocitos y la sustitución de células musculares cardiacas por un tejido cicatricial conjuntivo que no muestra capacidad de contracción. Lo ideal, sería revertir la obstrucción vascu-

lar lo antes posible para evitar la muerte de las células musculares cardíacas. Pero, una vez producida dicha pérdida de células, sería necesario aplicar las herramientas terapéuticas que nos puedan suministrar todo lo necesario para una correcta y eficaz reparación del daño causado y conseguir de nuevo la capacidad de contracción perdida.

La terapia celular cardíaca (cardiomioplastia celular) se ha desarrollado notablemente en las últimas dos décadas. Tiene por base la utilización de células aisladas que poseen capacidad regenerativa y que se administran en el corazón. Distintos trabajos con esta metodología han demostrado, mediante ensayos clínicos, que este procedimiento, siendo seguro, solo consigue ligeros incrementos en la recuperación de la funcionalidad del miocardio perdido al determinarse un aumento ligero en la fracción de eyección ventricular (3, 4).

En la actualidad, se están utilizando técnicas de ingeniería tisular para solucionar este problema. La ingeniería tisular cardíaca se basa en la combinación de células –con capacidad regenerativa miocárdica–, matrices y factores de regulación para conseguir una construcción similar al tejido muscular cardíaco (5). Más recientemente se están desarrollando estudios en animales de experimentación para fabricar corazones bioartificiales. Para ello en un primer paso se procede a descelularizar los corazones, pero conservando las estructuras organizativas de tejido conjuntivo cardíaco. Y en segundo lugar, repoblar las paredes de los vasos y el tejido cardíaco con células con capacidad contráctil (6).

En la presente revisión realizaremos un análisis de las aportaciones actuales de la ingeniería tisular para la recuperación funcional del tejido cardíaco alterado.

### TERAPIA CELULAR CARDIACA

La llamada cardiomioplastia celular consiste en la implantación, en zonas miocárdicas que han perdido la capacidad contráctil, de células aisladas con capacidad angiogénica y/o de regeneración miocárdica. Su objetivo fundamental es la recuperación funcional del miocardio dañado. Los factores más importantes a tener en cuenta en esta terapéutica son, en primer lugar, la selección adecuada de las células que se administran, en segundo lugar, la vía de administración de dichas células, y, finalmente, la cuantía de células a implantar.

#### Células con capacidad regenerativa

La capacidad de integración en el miocardio, la capacidad de expansión mediante técnicas de cultivos celulares y tisulares, y la capacidad de acoplamiento mediante uniones intercelulares específicas (adherentes y comunicantes) entre ellas y con las células no dañadas del miocardio, son las tres capacidades que deben poseer y desarrollar las células regenerativas utilizables en ingeniería tisular cardíaca.

Como se muestra en la Tabla 1, células de diverso origen se han utilizado, experimental o clínicamente, o se cree que tienen potencial suficiente para ser utilizadas en la cardiomioplastia celular por su capacidad regenerativa (7-13).

Los resultados obtenidos con los diferentes tipos celulares son muy variables, pero los resultados obtenidos con células progenitoras endoteliales, células mononucleares de médula ósea, células estromales mesenquimatosas (12, 13) en pacientes con IM agudo o cardiomiopatía isquémica crónica han demostrado la seguridad de dicho tratamiento y un aumento significativo de la fracción de eyección ventricular. Además, ya se están desarrollando ensayos clínicos con resultados muy esperanzadores con células madre cardíacas (14).

La acción realizada por los diversos tipos de células utilizadas en la cardiomioplastia celular se debe a una de las tres siguientes capacidades. En primer lugar, la capacidad para producir mioblastos que darán lugar a cardiomiocitos. En segundo lugar, la capacidad de angiogénesis con un aumento de la perfusión cardíaca. En tercer lugar, la capacidad de comunicación paracrina de las células o los factores de crecimiento y citoquinas administrados con las células implantadas (15).

Tipo celular	Ventajas	Inconvenientes
Mioblastos esqueléticos *	Fáciles de aislar Alta tasa de proliferación Resistentes a la hipoxia Autólogos	Gran incidencia de arritmias
Células derivadas de médula ósea * Células progenitoras endoteliales * Células madre hematopoyéticas * Células madre mesenquimales *	Autólogas Fáciles de aislar Multipotentes Baja respuesta inmunológica	Disponibilidad limitada Casos de formación de hueso o cartilago en el miocardio
Células madre derivadas de tejido adiposo *	Fáciles de aislar Elevada disponibilidad Multipotentes Baja respuesta inmunológica	Baja supervivencia
Células madre cardíacas *	Intrínsecas Multipotentes Autólogas	Baja disponibilidad
Células madre embrionarias <sup>o</sup>	Pluripotentes Fáciles de expandir	Teratogénicas Baja disponibilidad Respuesta inmune del huésped Problemas éticos
Células iPS <sup>o</sup>	Pluripotentes Fáciles de expandir Buena disponibilidad Autólogas	Potencial teratogénico Posible potencial oncogénico
Cardiomiocitos fetales <sup>o</sup>	Fenotipo de cardiomiocito	Baja disponibilidad Baja supervivencia Respuesta inmune del huésped Problemas éticos

Tabla 1. Ventajas e inconvenientes de diversos tipos de células implantables en ingeniería tisular cardíaca (Modificada de 7 y 8)

iPS: células madre pluripotentes inducidas. \* = Usadas en ensayos clínicos. <sup>o</sup> = Utilizadas en estudios experimentales.

#### Vías de administración y número de células

La vía de administración y el número de células utilizado son dos factores muy importantes en la cardiomioplastia celular. Algunas de las vías de administración más utilizadas son: inyección intramiocárdica por esternotomía y punción epicárdica, endomiocárdica o intracoronaria. La vía intracoronaria parece ser la vía que permite un mejor asentamiento de células en el miocardio (16). En relación con el número de células a administrar, este es muy variable dependiendo del tipo celular y de la vía de administración. En los últimos estudios clínicos con infusión por las arterias coronarias se utiliza una cantidad de un  $1 \times 10^6$  de células madre cardíacas para un foco de infarto (14). Para otros tipos celulares se puede llegar a valores de  $100 \times 10^6$  células para estudios con células mononucleares de médula ósea (17).

#### Estado actual de la cardiomioplastia celular

Los estudios realizados tanto en animales de experimentación como en humanos han mostrado que la cardiomioplastia celular es una técnica reproducible y útil para la recuperación de la capacidad funcional cardíaca (19). Tras años de experimentación, hemos aprendido que la utilización, como fuente celular,

de mioblastos puede inducir arritmias y no conduce al acoplamiento eléctrico con los cardiomiocitos. Igualmente, la utilización de células mononucleares de médula ósea es segura y ofrece un beneficio modesto en la función ventricular. Las especificaciones futuras de este tratamiento se están definiendo en ensayos clínicos que se desarrollan en la actualidad. En ensayos clínicos, el uso de células madre mesenquimales obtenidas de médula ósea han sido muy promotores mostrando una mejora funcional con resonancia magnética a los doce meses, aunque dichos estudios deben continuarse y profundizar en los mecanismos de acción (19). En relación con las células madre cardíacas, se están individualizando diferentes subtipos de ellas (Isl<sup>+</sup>, c-kit<sup>+</sup>, derivadas de cardioesferas, *side-population*, sca-1<sup>+</sup>, derivadas del epicardio -entre otras-) atendiendo a su origen, capacidad funcional o presencia de marcadores específicos (18). Ensayos clínicos recientes utilizando células madre cardíacas derivadas de cardioesferas han demostrado ser seguros y aumentar la capacidad funcional cardíaca y disminución del área cicatricial a los doce meses de la administración intracoronaria (14, 20).

### INGENIERÍA TISULAR CARDIACA

Esta reciente tecnología consiste en utilizar células, sustratos y señales para inducir y/o construir sustitutos de tejido cardíaco. Teniendo en cuenta las características electromecánicas y estructurales del corazón (21), los objetivos de la ingeniería celular cardíaca serán, básicamente, conseguir el acoplamiento electromecánico intercelular y obtener matrices extracelulares especializadas que permitan una contracción cardíaca y una vascularización adecuada. Por lo tanto, es una alternativa a la cardiomioplastia celular la utilización de la ingeniería celular basada en cuatro estrategias diferentes. Estas estrategias son las siguientes: a) Ingeniería tisular *in situ*, donde células y biomateriales son inyectados en las zonas cardíacas afectadas; b) Ingeniería tisular *in vitro*, donde células y biomateriales se hacen interactuar y transferirse en el laboratorio para posteriormente ser implantados; c) Ingeniería tisular sin matrices y con células -la cardiomioplastia celular vista anteriormente-; y d) Ingeniería tisular sin células y con matrices.

#### Ingeniería tisular *in situ*

Mediante esta aproximación se combina un biomaterial inyectable y células que son administrados directamente en la zona a reparar. Los biomateriales utilizados han sido, entre otros, fibrina, colágeno, matrigel, péptidos autoensamblados, quitosán, alginato e hidrogeles sintéticos o híbridos naturales/sintéticos. En algunas ocasiones se incluyen además factores de crecimiento como IGF-1. Gracias a la utilización del biomaterial se consigue una mayor retención de células en el lugar de administración y los resultados obtenidos muestran diversas mejoras funcionales dependiendo del biomaterial utilizado (15). Una desventaja de estos métodos es no tener en cuenta las características biomecánicas de los biomateriales utilizados, aunque estos permitan el flujo de nutrientes y de oxígeno o faciliten la migración y la supervivencia celular. La utilización de hidrogeles híbridos sintéticos/naturales solventa alguno de estos problemas (22-24). Otro hecho a tener en cuenta es que las células y el biomaterial inyectado pueden formar "islas" sin conexión con el resto de estructuras cardíacas vecinas (15) con lo que la recuperación funcional del área afectada no llega a ser completa.

#### Ingeniería tisular *in vitro*

Consiste en la fabricación de constructos tridimensionales de tejido cardíaco en el laboratorio que serán posteriormente implantados en el miocardio infartado. Según la complejidad y el nivel de organización se pueden distinguir dos tipos de constructos: Constructos a nivel de tejido y constructos a nivel de órgano.

##### Constructos a nivel tisular

Consiste en la obtención en el laboratorio de parches o porciones de tejido muscular cardíaco aptos para su implantación. Con ello se consigue mejorar la distribución y la homogeneidad de cardiomiocitos. Este hecho no se puede obtener, en gran medida, con la cardiomioplastia celular (25). Para conseguir estos constructos se han utilizado dos estrategias diferentes que han

consistido en emplear cardiomiocitos con capacidad contráctil (26) o utilizar células madre (25). En ambos casos la selección de célula o células a utilizar en el cultivo y la selección de la matriz-soporte sobre la que crecerán las células, es de gran importancia (27). Además, la estimulación mecánica juega un papel preponderante en el correcto desarrollo del constructo y en la formación de uniones intercelulares que conducen a la correcta transmisión de la contracción celular (28). La aplicación de fuerzas mecánicas mejora las propiedades estructurales y mecánicas de los constructos como se ha comprobado experimentalmente con cardiomiocitos neonatales encapsulados en gel de colágeno (26). Por lo tanto, las condiciones de cultivo son la pieza clave del correcto desarrollo de constructos de tejido cardíaco contráctil y para ello se deben utilizar biorreactores específicos que proporcionan las condiciones necesarias. Estos biorreactores deberían cumplir las siguientes funciones: a) Posibilitar la siembra homogénea del biomaterial con células, 2) suministrar las señales necesarias para el cultivo del constructo, y 3) mantener controladas las condiciones ambientales del cultivo (29). Ejemplos de biorreactores utilizados son los frascos con dispositivos giratorios internos, los vasos giratorios, los biorreactores de perfusión o los discos orbitales. Además, se pueden añadir pulsos eléctricos durante el cultivo (6) con lo que en su conjunto se facilitan la diferenciación y el establecimiento de uniones eléctricas y mecánicas entre los cardiomiocitos para conseguir finalmente una contractilidad adecuada del constructo. Consiguiéndose incluso una organización celular y ultraestructural similar a la organización ortotípica cardíaca con haces de células alargadas con núcleo central y miofibrillas periféricas y acoplamiento eléctrico adecuado morfológica y funcionalmente (30).

Al sobrepasar los parches construidos por ingeniería tisular un tamaño/volumen determinado que varía según los tipos celulares y matrices utilizadas, la difusión de nutrientes y de oxígeno no es suficiente para la correcta actividad celular. Aparece, por lo tanto, el problema de la necesidad de vasos que aporten y retiren las moléculas necesarias para la vida. Se conoce que la distancia crítica entre un cardiomiocito y su aporte sanguíneo es de 100µm (6). Para facilitar la formación de vasos se han utilizado citocinas de diversos tipos y factores de crecimiento, entre otros, el factor de crecimiento endotelial vascular -VEGF- (31), o como el factor de crecimiento de fibroblastos de tipo básico -bFGF- (32). Estas moléculas se añaden al cultivo para estimular células de distinto origen en su transformación hacia estructuras vasculares (33-35).

##### Constructos a nivel de órgano

La aproximación actual de la ingeniería tisular a nivel de órgano en el corazón tiene por base la utilización del andamiaje completo cardíaco tras la desceldularización del corazón. Esta estrategia parece más efectiva y más rápida, actualmente, que la obtención de corazones completos por desarrollo a partir de células, soportes y señales. La desceldularización ideal sería capaz de eliminar todos los antígenos alogénicos o xenogénico y además del contenido celular y nuclear de los tejidos preparados. Al mismo tiempo la desceldularización ideal debería mantener la composición y propiedades de la matriz extracelular y de las estructuras vasculares (36). Para obtener parches u órganos completos desceldularizados se utilizan procesos que combinan tratamientos físicos, químicos y enzimáticos que deben adecuarse al tejido u órgano a desceldularizar (37-39). En el caso concreto del corazón, se han desceldularizado corazones de rata mediante perfusión coronaria de detergentes obteniendo el andamiaje cardíaco completo de matriz extracelular y posteriormente se han repoblado con células cardíacas neonatales y con células endoteliales de aorta, manteniendo todo en condiciones de estimulación fisiológica para la correcta maduración orgánica. Además la perfusión coronaria continua, la carga pulsátil del ventrículo izquierdo y la estimulación sincronizada del ventrículo izquierdo dan lugar a la formación de un miocardio contráctil que realiza una contracción adecuada, aunque limitada a un escaso porcentaje del necesario (6). Más recientemente, se ha utilizado un modelo más próximo al humano utilizando corazón porcino para su desceldularización. Comprobándose el mantenimiento de la morfología y estructura microscópica cardíaca y la estabilidad mecánica del producto final (40). Estos métodos, pueden verse comprometidos por la necesidad del gran número de células necesarias para la repoblación del

órgano humano completo (41).

#### Ingeniería tisular con células y sin matrices

Además de lo comentado en la cardiomioplastia celular, en el laboratorio se han obtenido constructos de monocapas aptos para ser implantados. En este sentido, se han utilizado monocapas de células cardíacas (28), o múltiples capas de células mesenquimales que han conseguido favorecer la vascularización (42). Se han utilizado igualmente monocapas superpuestas de cardiomiocitos neonatales y se ha comprobado el acoplamiento eléctrico y estructural entre ellos con microscopía electrónica de transmisión (43). Debido a la falta de vascularización, el número de capas celulares se ve limitado a tres o cuatro. Por otra parte una de las mayores inconvenientes es la baja capacidad mecánica que poseen las escasas capas de células musculares que sobreviven al implante (15). Para solventar esto, se han introducido constructos con capas de colágeno intermedias, como hemos indicado en la ingeniería tisular *in vitro*. Recientemente se han desarrollado parches celulares sin matriz obtenidos con cardiomiocitos derivados de células madre embrionarias humanas, que tras su implantación han mostrado una muerte celular por falta de vascularización (44). Las técnicas de monocapas celulares han sido realmente un paso útil entre la cardiomioplastia celular y la ingeniería tisular que utiliza conjuntamente células, matrices y señales.

#### Ingeniería tisular sin células y con matrices

Los mejores sustitutos de matriz extracelular para ingeniería tisular, tal vez sean, las matrices extracelulares de tejidos vivos que se han descelularizado y procesado como indicamos en la ingeniería tisular *in vitro* de constructos a nivel de órgano. Han sido múltiples los órganos de origen elegidos para la obtención de láminas descelularizadas de matriz extracelular (7). El uso de matrices extracelulares facilita el remodelado en muchos tipos diferentes de tejidos (45, 46). En nuestro ámbito, suelen utilizarse las matrices asociadas a células de distinto tipo como hemos visto anteriormente. Pero en algunos casos se han utilizado aisladamente las matrices extracelulares o sus sustitutos sintéticos para reparaciones de la pared cardíaca (47, 48).

#### CONCLUSIONES

El desarrollo de la ingeniería tisular cardíaca y su aplicación, fundamentalmente, a la insuficiencia ventricular e infarto de miocardio han supuesto un avance muy esperanzador en el tratamiento de estas patologías, demostrando incrementos en la capacidad contráctil de zonas cardíacas. El reto actual más importante consiste básicamente en la traslación de los resultados obtenidos en animales de experimentación a la clínica humana, siendo de gran importancia las dimensiones de superficie y volumen a cubrir por los constructos. Además, existen múltiples preguntas a responder como la selección de la célula a utilizar en el constructo (células autólogas, heterólogas, embrionarias, adultas, madre –de múltiples orígenes-, diferenciadas, etc...) Igualmente deberíamos determinar con mayor precisión que sustituto de matriz extracelular es la que condiciona un mejor crecimiento y mantenimiento celular y una mejor adquisición de acoplamiento eléctrico y mecánico de las células. Otra búsqueda a realizar es la imbricación del desarrollo de vasos sanguíneos con el crecimiento de células en la matriz adecuada. Igualmente se deberán de desarrollar los biorreactores que permitan conseguir el micro-medioambiente necesario para el correcto crecimiento y diferenciación, si son necesarios, y la adecuada unión celular eléctrica y mecánica para conseguir los sustitutos tisulares cardíacos. Para ello en el futuro biorreactor se deberá proporcionar estímulo mecánico, aportes de oxígeno y nutrientes y estimulación eléctrica. Obtenido el constructo ideal, la integración del constructo con el receptor es de suma importancia. No solo por su aceptación inmunológica, sino por su acoplamiento eléctrico y mecánico con el resto de corazón. La ingeniería tisular cardíaca a nivel orgánico, se verá favorecida por el desarrollo de la ingeniería tisular a nivel de tejido, y además será necesaria una mejora muy significativa del escaso 2% de contractilidad global cardíaca obtenida en pequeños animales de experimentación. Además, si se requiere la aparición de ritmo autónomo, se deberá de desarrollar al menos

un sustituto de nódulo sinoauricular para iniciar el ritmo y un sustituto de sistema de conducción cardíaco del estímulo eléctrico para poder garantizar una contracción cardíaca ordenada y efectiva funcionalmente.

#### REFERENCIAS

1. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD; Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Universal Definition of Myocardial. Third universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J* 2012; 33(20):2551-67.
2. Almenar L, Segovia J, Crespo-Leiro MG, Palomo J, Arizón JM, González-Vilchez F, et al, on behalf of the Spanish Heart Transplantation Teams Spanish Registry on Heart Transplantation. 23rd Official Report of the Spanish Society of Cardiology Working Group on Heart Failure and Heart Transplantation (1984-2011). *Rev Esp Cardiol* 2012; 65(11):1030-1038
3. Suárez de Lezo J, Herrera C, Romero MA, Pan M, Jiménez R, Carmona D, et al. Functional recovery following intracoronary infusion of autologous mononuclear bone marrow cells in patients with chronic anterior myocardial infarction and severely depressed ventricular function. *Rev Esp Cardiol* 2010; 63(10):1127-35.
4. Bayes-Genis A, Soler-Botija C, Farré J, Sepúlveda P, Raya A, Roura S, et al. Human progenitor cells derived from cardiac adipose tissue ameliorate myocardial infarction in rodents. *J Mol Cell Cardiol* 2010; 49(5):771-80.
5. Vunjak-Novakovic G, Lui KO, Tandon N, Chien KR. Bioengineering heart muscle: a paradigm for regenerative medicine. *Annu Rev Biomed Eng* 2011; 13:245-67.
6. Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, Black LD, Kren SM, Netoff TI, et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med* 2008; 14(2):213-21.
7. Gálvez-Montón C, Prat-Vidal C, Roura S, Soler-Botija C, Bayes-Genis A. Cardiac Tissue Engineering and the Bioartificial Heart. *Rev Esp Cardiol* 2013; 66(5):391-399.
8. Lobo González M. Células madre en terapia celular cardíaca. *Actual Med* 2013; 98:(788):38-44
9. Vunjak-Novakovic G, Tandon N, Godier A, Maidhof R, Marsano A, Martens TP, et al. Challenges in cardiac tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev* 2010; 16(2):169-87.
10. Leri A, Anversa P. Stem cells: Bone-marrow-derived cells and heart failure-the debate goes on. *Nat Rev Cardiol* 2013; 10(7):372-3.
11. Anversa P, Kajstura J, Rota M, Leri A. Regenerating new heart with stem cells. *J Clin Invest* 2013; 123(1):62-70.
12. Abdel-Latif A, Bolli R, Tleyjeh IM, Montori VM, Perin EC, Hornung CA, et al. Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med* 2007; 167(10):989-97.
13. Kang S, Yang YJ, Li CJ, Gao RL. Effects of intracoronary autologous bone marrow cells on left ventricular function in acute myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis for randomized controlled trials. *Coron Artery Dis* 2008; 19(5):327-35.
14. Bolli R, Chugh AR, D'Amario D, Loughran JH, Stoddard MF, Ikram S, et al. Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet* 2011; 378(9806):1847-57.
15. Wang F, Guan J. Cellular cardiomyoplasty and cardiac tissue engineering for myocardial therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 2010; 62(7-8):784-97.
16. Rigol M, Solanes N, Farré J, Roura S, Roqué M, Berrueto A, et al. Effects of adipose tissue-derived stem cell therapy after myocardial infarction: impact of the route of administration. *J Card Fail* 2010; 16(4):357-66.
17. Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T, et al. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006; 355(12):1199-209.
18. Chong JJ. Cell therapy for left ventricular dysfunction: an overview for cardiac clinicians. *Heart Lung Circ* 2012; 21(9):532-42.

19. Williams AR, Trachtenberg B, Velazquez DL, McNiece I, Altman P, Rouy D, et al. Intramyocardial stem cell injection in patients with ischemic cardiomyopathy: functional recovery and reverse remodeling. *Circ Res* 2011; 108(7):792-6.
20. Makkar RR, Smith RR, Cheng K, Malliaras K, Thomson LE, Berman D, et al. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet* 2012; 379(9819):895-904.
21. Lunkenheimer PP, Redmann K, Westermann P, Rothaus K, Cryer CW, Niederer P, et al. The myocardium and its fibrous matrix working in concert as a spatially netted mesh: a critical review of the purported tertiary structure of the ventricular mass. *Eur J Cardiothorac Surg* 2006; 29 Suppl 1:S41-9.
22. Kofidis T, Lebl DR, Martinez EC, Hoyt G, Tanaka M, Robbins RC. Novel injectable bioartificial tissue facilitates targeted, less invasive, large-scale tissue restoration on the beating heart after myocardial injury. *Circulation* 2005; 112(9 Suppl):I173-7.
23. Gaudette GR, Cohen IS. Cardiac regeneration: materials can improve the passive properties of myocardium, but cell therapy must do more. *Circulation* 2006; 114(24):2575-7.
24. Li Z and Guan J. Hydrogels for Cardiac Tissue Engineering. *Polymers* 2011; 3(2): 740-761.
25. Dvir T, Kedem A, Ruvinov E, Levy O, Freeman I, Landa N, et al. Prevascularization of cardiac patch on the omentum improves its therapeutic outcome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(35):14990-5.
26. Zimmermann WH, Melnychenko I, Wasmeier G, Didié M, Naito H, Nixdorff U, et al. Engineered heart tissue grafts improve systolic and diastolic function in infarcted rat hearts. *Nat Med* 2006; 12(4):452-8.
27. Yi BA, Wernet O, Chien KR. Regenerative medicine: developmental paradigms in the biology of cardiovascular regeneration. *J Clin Invest* 2010; 120(1):20-8.
28. Eschenhagen T, Eder A, Vollert I, Hansen A. Physiological aspects of cardiac tissue engineering. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012; 303(2):H133-43.
29. Radisic M, Park H, Vunjak-Novakovic G. Cardiac-tissue engineering. En : Lanza R, Langer R, Vacanti J (Eds.), *Principles of Tissue Engineering*, Academic Press, Boston, 2007, pp. 551-568.
30. Radisic M, Park H, Shing H, Consi T, Schoen FJ, Langer R, et al. Functional assembly of engineered myocardium by electrical stimulation of cardiac myocytes cultured on scaffolds. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(52):18129-34.
31. Shen YH, Shoichet MS, Radisic M. Vascular endothelial growth factor immobilized in collagen scaffold promotes penetration and proliferation of endothelial cells. *Acta Biomater* 2008; 4(3):477-89.
32. Lai PH, Chang Y, Chen SC, Wang CC, Liang HC, Chang WC, et al. Acellular biological tissues containing inherent glycosaminoglycans for loading basic fibroblast growth factor promote angiogenesis and tissue regeneration. *Tissue Eng* 2006; 12(9):2499-508.
33. Lisi A, Briganti E, Ledda M, Losi P, Grimaldi S, Marchese R, et al. A combined synthetic-fibrin scaffold supports growth and cardiomyogenic commitment of human placental derived stem cells. *PLoS One* 2012; 7(4):e34284.
34. Zachman AL, Crowder SW, Ortiz O, Zienkiewicz KJ, Bronikowski CM, Yu SS, et al. Pro-angiogenic and anti-inflammatory regulation by functional peptides loaded in polymeric implants for soft tissue regeneration. *Tissue Eng Part A* 2013; 19(3-4):437-47.
35. Marsano A, Maidhof R, Luo J, Fujikara K, Konofagou EE, Banfi A, et al. The effect of controlled expression of VEGF by transduced myoblasts in a cardiac patch on vascularization in a mouse model of myocardial infarction. *Biomaterials* 2013; 34(2):393-401.
36. Choi YC, Choi JS, Kim BS, Kim JD, Yoon HI, Cho YW. Decellularized extracellular matrix derived from porcine adipose tissue as a xenogeneic biomaterial for tissue engineering. *Tissue Eng Part C Methods* 2012; 18(11):866-76.
37. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials* 2006; 27: 3675–3683.
38. Lichtenberg A, Tudorache I, Cebotari S, Ringes-Lichtenberg S, Sturz G, Hoeffler K, et al. In vitro re-endothelialization of detergent decellularized heart valves under simulated physiological dynamic conditions. *Biomaterials* 2006; 27(23):4221-9.
39. Borschel GH, Dennis RG, Kuzon WM Jr. Contractile skeletal muscle tissue-engineered on an acellular scaffold. *Plast Reconstr Surg* 2004; 113(2):595-602; discussion 603-4.
40. Weymann A, Loganathan S, Takahashi H, Schies C, Claus B, Hirschberg K, et al. Development and evaluation of a perfusion decellularized porcine heart model—generation of 3-dimensional myocardial neoscaffolds. *Circ J* 2011; 75(4):852-60.
41. Badylak SF, Taylor D, Uygun K. Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds. *Annu Rev Biomed Eng* 2011; 13:27-53.
42. Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H, et al. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med* 2006; 12(4):459-65.
43. Shimizu T, Yamato M, Isoi Y, Akutsu T, Setomaru T, Abe K, et al. Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. *Circ Res* 2002; 90(3):e40.
44. Stevens KR, Kreutziger KL, Dupras SK, Korte FS, Regnier M, Muskheli V, et al. Physiological function and transplantation of scaffold-free and vascularized human cardiac muscle tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(39):16568-73.
45. Badylak SF. Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Transpl Immunol* 2004; 12(3-4):367-77.
46. Vanore M, Chahory S, Payen G, Clerc B. Surgical repair of deep melting ulcers with porcine small intestinal submucosa (SIS) graft in dogs and cats. *Vet Ophthalmol* 2007; 10(2):93-9.
47. Di Donato M, Sabatier M, Dor V, Toso A, Maioli M, Fantini F. Akinetic versus dyskinetic postinfarction scar: relation to surgical outcome in patients undergoing endoventricular circular patch plasty repair. *J Am Coll Cardiol* 1997; 29(7):1569-75.
48. Starling RC, Jessup M. Worldwide clinical experience with the CorCap Cardiac Support Device. *J Card Fail* 2004; 10(6 Suppl):S225-33.