

## Puesta al día: Innovación en cardiología (IV)

# Ingeniería tisular cardiaca y corazón bioartificial

Carolina Gálvez-Montón<sup>a,\*</sup>, Cristina Prat-Vidal<sup>a</sup>, Santiago Roura<sup>a</sup>, Carolina Soler-Botija<sup>a</sup>  
y Antoni Bayes-Genis<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup> Grupo de Investigación ICREC, Fundació Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol (IGTP), Badalona, Barcelona, España

<sup>b</sup> Servicio de Cardiología, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona, España

<sup>c</sup> Departamento de Medicina, UAB, Barcelona, España

### Historia del artículo:

On-line el 5 de marzo de 2013

### Palabras clave:

Regeneración cardiaca  
Cardiomioplastia  
Ingeniería tisular cardiaca  
Neorganogénesis

### Keywords:

Cardiac regeneration  
Cardiomyoplasty  
Cardiac tissue engineering  
Neo-organogenesis

### RESUMEN

La insuficiencia cardiaca es la etapa final de muchas enfermedades cardiovasculares, como el infarto agudo de miocardio, y sigue siendo uno de los retos más atractivos para la medicina regenerativa debido a su alta incidencia y prevalencia. A lo largo de los últimos 20 años, la cardiomioplastia, basada en la administración aislada de células con capacidad regenerativa, ha focalizado la mayoría de estudios que han perseguido regenerar el corazón. No obstante, aunque esta terapia se ha mostrado factible en el ámbito clínico, el grado de regeneración del miocardio infartado y de mejoría de la función cardiaca es muy limitado. Ante tal escenario ha emergido la ingeniería tisular cardiaca como una novedosa tecnología basada en el uso de células con capacidad regenerativa, materiales biológicos y/o sintéticos, factores de crecimiento, diferenciación y proangiogénicos, y sistemas de registro *online* para inducir la regeneración de un órgano o tejido dañado. Un paso más, según algunos estudios pioneros realizados en animales, consiste en la generación de corazones bioartificiales *de novo* descelularizándolos y preservando sus estructuras de soporte para posteriormente repoblarlos con nuevo tejido muscular contráctil y vascular. Este nuevo abordaje comportaría, finalmente, el trasplante del corazón «reconstruido» restableciendo la función cardiaca del receptor.

© 2012 Sociedad Española de Cardiología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

### Cardiac Tissue Engineering and the Bioartificial Heart

### ABSTRACT

Heart failure is the end-stage of many cardiovascular diseases—such as acute myocardial infarction—and remains one of the most appealing challenges for regenerative medicine because of its high incidence and prevalence. Over the last 20 years, cardiomyoplasty, based on the isolated administration of cells with regenerative capacity, has been the focal point of most studies aimed at regenerating the heart. Although this therapy has proved feasible in the clinical setting, the degree of infarcted myocardium regenerated and of improved cardiac function are at best modest. Hence, tissue engineering has emerged as a novel technology using cells with regenerative capacity, biological and/or synthetic materials, growth, proangiogenic and differentiation factors, and online registry systems, to induce the regeneration of whole organs or locally damaged tissue. The next step, seen recently in pioneering animal studies, is *de novo* generation of bioartificial hearts by decellularization and preservation of supporting structures for their subsequent repopulation with new contractile, vascular muscle tissue. Ultimately, this new approach would entail transplantation of the «rebuilt» heart, reestablishing cardiac function in the recipient.

Full English text available from: [www.revespcardiol.org/en](http://www.revespcardiol.org/en)

© 2012 Sociedad Española de Cardiología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

## INTRODUCCIÓN

La insuficiencia cardiaca es la etapa final de muchas enfermedades cardiovasculares, como el infarto agudo de miocardio, y sigue siendo uno de los retos más atractivos para la medicina

regenerativa actual debido a su alta incidencia y prevalencia<sup>1,2</sup>. Los pacientes con disfunción cardiaca progresiva muestran un alto riesgo de muerte súbita y, a pesar de los grandes avances de las últimas décadas, únicamente el trasplante cardiaco consigue restablecer completamente la función cardiaca (aunque su uso está limitado por el escaso número de donantes y no está exento de complicaciones). El infarto agudo de miocardio se produce cuando se interrumpe el aporte sanguíneo del corazón provocando una situación irreversible de isquemia miocárdica, pérdida de células musculares cardíacas (cardiomiocitos) y formación de una cicatriz no contráctil<sup>3</sup>. Por ello, es necesario desarrollar estrategias

\* Autor para correspondencia: ICREC (Insuficiencia Cardiaca y Regeneración Cardiaca), Grupo de Investigación, Fundació Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol (IGTP), Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Ctra. Canyet s/n, 08916 Badalona, Barcelona, España.

Correo electrónico: [cgalvezmonton@gmail.com](mailto:cgalvezmonton@gmail.com) (C. Gálvez-Montón).

terapéuticas capaces de proporcionar las bases adecuadas para asegurar una rápida reconstrucción del tejido afectado y renovar eficazmente su capacidad contráctil.

A lo largo de los últimos 20 años, la terapia celular cardíaca (cardiomioplastia), basada en la administración aislada de células con capacidad regenerativa, ha focalizado la mayoría de estudios que han perseguido regenerar el corazón<sup>4-7</sup>. Los resultados obtenidos en los ensayos clínicos han demostrado que este procedimiento es seguro, aunque muestra un beneficio modesto en cuanto a incremento de la fracción de eyección. En la actualidad, siguen activos varios estudios con la finalidad de confirmar el beneficio clínico de la terapia celular.

Recientemente, se están abordando nuevos procedimientos basados en la combinación de células con capacidad regenerativa, factores de crecimiento proangiogénicos, matrices biológicas, polímeros sintéticos biocompatibles y sistemas de registro *online* mediante bioimplantes. Este conjunto de técnicas avanzadas recibe el nombre de ingeniería de tejidos<sup>8-12</sup>. Un paso más, según algunos estudios pioneros realizados en animales, sería generar corazones bioartificiales *de novo* descelularizándolos y preservando sus estructuras de soporte para repoblarlos con nuevo tejido muscular contráctil y vascular<sup>13</sup>. Este nuevo abordaje comportaría finalmente el trasplante del corazón «reconstruido» restableciendo la función cardíaca del receptor.

A lo largo de esta revisión analizaremos el estado de estas nuevas aproximaciones de ingeniería tisular, con sus ventajas y limitaciones. Como veremos, su valoración en conjunto nos permite seguir vislumbrando un futuro muy prometedor para la recuperación del miocardio disfuncional.

## CARDIOMIOPLASTIA CELULAR

La cardiomioplastia tiene como objetivo restaurar el miocardio dañado mediante la implantación aislada de células madre cardiomiogénicas y/o angiogénicas sobre el ventrículo disfuncional<sup>5</sup>. Los aspectos clave para esta estrategia terapéutica

son la elección del tipo celular y la vía de administración más adecuadas.

### Células con potencial cardiorregenerativo

Una fuente celular óptima debería: a) poderse expandir *in vitro* a gran escala; b) integrarse en el tejido dañado, y c) diferenciarse en nuevos cardiomiocitos acoplados electromecánicamente con el tejido huésped (tabla).

En este contexto, se han obtenido células madre adultas procedentes de médula ósea, tejido adiposo, músculo esquelético, pulpa dental, sangre periférica, líquido amniótico y líquido sinovial<sup>14</sup>. Más concretamente, en el campo de la regeneración cardíaca, se han implantado *mioblastos esqueléticos* por su fácil aislamiento, alta tasa de proliferación y resistencia a la hipoxia<sup>15,16</sup>. Asimismo, se han testado distintas poblaciones celulares residentes en la médula ósea debido a su gran plasticidad hacia células de linaje cardiogénico y endotelial<sup>17</sup>: *células progenitoras endoteliales*<sup>18,19</sup>, *células madre hematopoyéticas*<sup>4</sup> y *células madre mesenquimales*<sup>20</sup>. Como fuente alternativa de células madre mesenquimales, el tejido adiposo subcutáneo permite obtener gran cantidad de células<sup>21</sup> que se han aplicado en ensayos clínicos con resultados atractivos<sup>22</sup>. Además, se han identificado células progenitoras con alto potencial cardiomiogénico y vasculogénico en el tejido adiposo que envuelve el corazón. La implantación de estas células mejora la función cardíaca y reduce el tamaño del infarto en los modelos de rata y ratón<sup>7</sup>.

Durante muchos años se pensó que el corazón de mamífero carecía de capacidad autorregenerativa. Este dogma se ha desvanecido debido, en parte, al hallazgo de las *células madre cardíacas*, residentes en el corazón, autorreplicantes y capaces de generar cardiomiocitos, células endoteliales y fibroblastos cardíacos<sup>23,24</sup>. Estas células se han identificado y aislado mediante los marcadores Sca-1, c-kit, ABCG2 y Islet-1<sup>23-25</sup> y a partir de la formación de cardioesferas procedentes de explantes de miocardio<sup>26</sup>. Tal hallazgo ha originado estrategias basadas en la activación

**Tabla**  
Ventajas e inconvenientes de las células implantadas

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

iPS: células madre pluripotentes inducidas.

de dichas células mediante factores de crecimiento que favorecen su supervivencia y migración celular<sup>26,27</sup>. Sin embargo, varios estudios han demostrado que las células madre cardíacas implantadas en modelos animales de infarto de miocardio se fusionan con los cardiomiocitos del receptor<sup>23,28</sup>.

Alternativamente, se han testado las *células madre embrionarias* debido a su gran capacidad de expansión y posterior diferenciación a cardiomiocitos, células endoteliales y fibroblastos cardíacos<sup>29,30</sup>. Para evitar el uso de este tipo de células no autólogas y la consecuente terapia inmunosupresora, se han desarrollado *células madre pluripotentes inducidas* a partir de tejidos somáticos humanos<sup>31,32</sup>. Como las células embrionarias, las células madre pluripotentes inducidas muestran ilimitada replicación y amplia capacidad de diferenciación. Otro tipo celular utilizado han sido los *cardiomiocitos de origen fetal*, células capaces de sobrevivir, proliferar y formar discos intercalares con el tejido huésped miocárdico<sup>33-35</sup>.

### Vías de administración celular

Otro aspecto determinante para la optimización de la cardiomioplastia es la vía de administración celular. Así, se han testado la inyección intramiocárdica mediante aproximación epicárdica por esternotomía<sup>36</sup>, la vía endomiocárdica<sup>37</sup> y la ruta intracoronaria<sup>38</sup>. A pesar de que varios estudios abogan por la vía intracoronaria como la ruta que ofrece mayores índices de retención celular intramiocárdica<sup>39,40</sup>, dicha retención no supera el 10% y la mayoría de células administradas quedan anidadas en otros órganos o mueren<sup>41</sup>. Independientemente de la ruta de administración utilizada, la cardiomioplastia ha mostrado mejoras modestas sobre la función cardíaca y una limitada supervivencia de las células implantadas en el miocardio fibroso.

### Limitaciones

Los estudios en modelos animales basados en el uso de las células y vías de administración descritas anteriormente señalan a la cardiomioplastia como una técnica factible, segura y beneficiosa. No obstante, aunque esta terapia se ha mostrado también viable en el ámbito clínico, el grado de regeneración del miocardio infartado y de mejoría de la función cardíaca es muy limitado. Básicamente, se ha observado una escasa supervivencia de las células implantadas bajo las fuerzas mecánicas, y la hipoxia del tejido receptor impide desarrollar su efecto terapéutico<sup>42-45</sup>. Además, el número de células diferenciadas hacia nuevos cardiomiocitos es extremadamente bajo y al carecer de propiedades electromecánicas el tejido muscular regenerado resulta disfuncional. Por ejemplo, la elevada incidencia de arritmias debido a la falta de acoplamiento electromecánico ha desestimado el uso de mioblastos para tratar pacientes con disfunción cardíaca<sup>16,46</sup>. Por otro lado, el estado de indiferenciación de las células madre embrionarias genera su proliferación descontrolada dando lugar a formación de teratomas<sup>47</sup>, mientras que la obtención de células madre pluripotentes inducidas conlleva el uso de infecciones virales que podrían promover también activaciones oncogénicas indeseadas<sup>31,32</sup>.

Por todo lo expuesto anteriormente, se están desarrollando nuevos enfoques terapéuticos como la ingeniería de tejidos que revisamos detalladamente en las siguientes páginas.

## INGENIERÍA TISULAR CARDIACA: BIOPRÓTESIS PARA EL MIOCARDIO

La ingeniería tisular cardíaca es una novedosa y compleja tecnología basada en el uso de combinaciones de células con

capacidad regenerativa, materiales biológicos y/o sintéticos, factores de crecimiento, diferenciación y proangiogénicos, y sistemas de registro o monitorización *online* para inducir la regeneración de un órgano o tejido dañado. Los principales objetivos de la ingeniería tisular cardíaca consisten en generar matrices celulares, establecer acoplamiento celular electromecánico, avalar una función contráctil estable y una vascularización funcional<sup>9</sup>.

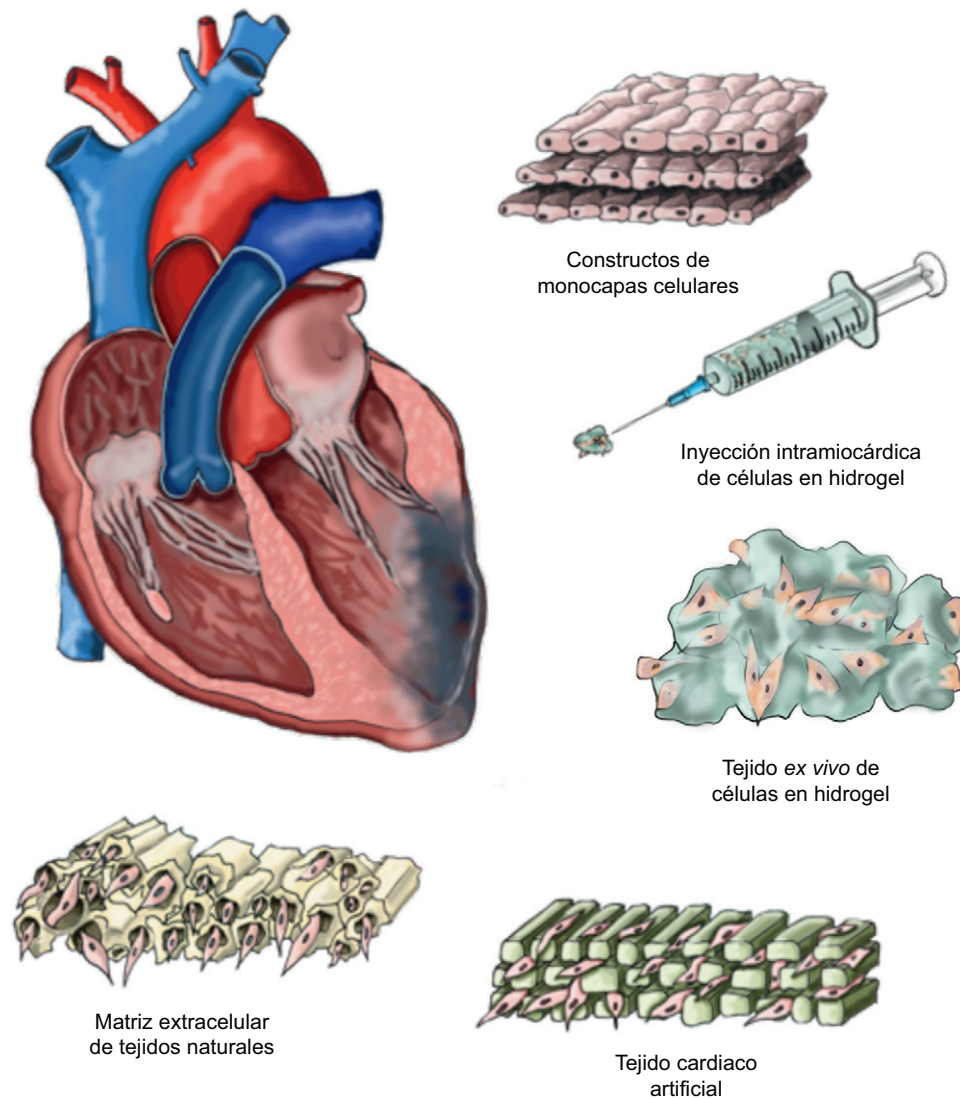
El corazón tiene unas propiedades funcionales dinámicas que requieren de una arquitectura tisular sofisticada con componentes celulares y extracelulares especializados<sup>48</sup>. Una de las características clave para actuar como motor circulatorio y satisfacer las demandas variables durante el reposo y el ejercicio reside en la arquitectura asimétrica de la banda miocárdica helicoidal<sup>49</sup>. Recientemente se ha descrito una participación más significativa de la matriz extracelular en los aspectos electromecánicos de lo que previamente se suponía<sup>50</sup>. El tejido cardíaco artificial ideal debe reproducir estas propiedades estructurales, mecánicas y electrofisiológicas óptimas para mantener viables las células trasplantadas, además de estimular la vasculogénesis en el propio tejido implantado. Así, el uso de materiales poliméricos naturales o sintéticos y de matrices biológicas, aplicados directamente sobre el área infartada o bien utilizados como matriz de soporte, constituye una alternativa a la cardiomioplastia celular.

### Tipos de matrices

El uso de una matriz, no necesariamente de origen biológico pero sí biocompatible, permite que las células administradas dispongan de una estructura de soporte estable que facilita una correcta localización y retención cerca del tejido que requiere de su efecto terapéutico. La estructura de dichas matrices debe cumplir ciertos requisitos «prácticos», como el mantenimiento de un flujo permanente de nutrientes y oxígeno entre las células dispuestas en su interior y el microambiente que las rodea, y facilitar una migración eficaz y la supervivencia dentro del tejido isquémico. Además, la matriz ideal debería ser biodegradable sin producir ningún producto tóxico, para poder ser finalmente reemplazada por nuevo tejido viable. A continuación se resumen algunos de los abordajes que se han estudiado en el marco de la ingeniería tisular cardíaca hasta la fecha, sin la pretensión de ser exhaustivos (fig. 1).

#### Constructos de monocapas celulares

El cultivo celular en placas de polímeros sensibles a la temperatura permite el desprendimiento de monocapas celulares sin intervención enzimática<sup>51</sup>. Una vez obtenido el constructo, este se adhiere sobre la zona isquémica para favorecer la implantación intramiocárdica de las células que conforman la monocapa. Se ha reportado nueva formación de vasos sanguíneos y una mejoría funcional mediante la implantación de varias monocapas juntas de células mesenquimales de origen adiposo en el modelo de infarto de miocardio crónico murino<sup>52</sup>. Sin embargo, mediante el uso de monocapas superpuestas de cardiomiocitos neonatales, se ha observado la generación de uniones intercelulares que permiten una función contráctil y la propagación de señales dentro del propio constructo<sup>53</sup>. Además, si se intercalan distintas monocapas de células endoteliales se favorece la formación de nuevos vasos dentro de la zona isquémica. A pesar de los beneficios observados mediante el uso de monocapas celulares, dicha estrategia aún carece de carácter translacional, puesto que resulta inviable obtener un constructo de similares características que garantice los mismos resultados en el corazón humano.



**Figura 1.** Ingeniería tisular cardíaca. Dibujos esquemáticos de los diferentes abordajes realizados en el campo de la ingeniería tisular cardíaca.

#### *Inyección intramiocárdica de células en hidrogel*

Otro abordaje se ha basado en el desarrollo de distintos tipos de hidrogeles naturales como Matrigel<sup>TM</sup> (laminina, colágeno tipo IV y heparán sulfato)<sup>54</sup>, colágeno<sup>55</sup> o fibrina<sup>56</sup>, en los que se embebe la población celular terapéutica para su posterior inyección intramiocárdica. Aunque el efecto del hidrogel sobre la retención celular ha sido positivo<sup>54-56</sup>, la presión de inyección necesaria para su administración es demasiado elevada y provoca una alta mortalidad celular que disminuye notablemente sus posibles efectos terapéuticos. Asimismo, el uso de hidrogeles compuestos por materiales naturales causa un bajo control de sus propiedades fisicoquímicas y su degradación, además se trata de productos de difícil esterilización y purificación<sup>57</sup>. Alternativamente, se han desarrollado hidrogeles sintéticos como el polietilenglicol, el ácido poliláctico, el ácido poliláctico-co-glicólico, la policaprolactona, la poliacrilamida y el poliuretano que minimizan dichos inconvenientes<sup>58</sup>. Sin embargo, su potencial citotóxico está aún bajo estudio y la *Food and Drug Administration* ha aprobado solamente el uso de polietilenglicol, ácido poliláctico y ácido poliláctico-co-glicólico para aplicación clínica. Se ha demostrado también que el polietilenglicol sensible a las metaloproteinasas de matriz es un material que permite modular su elasticidad y sus parámetros

biofísicos y bioquímicos implicados en la diferenciación cardiomiogénica de las células implantadas<sup>59</sup>. Un método alternativo es el uso de hidrogeles híbridos naturales/sintéticos que aporta las ventajas de ambos tipos de polímeros<sup>58</sup>.

#### *Formación de tejido ex vivo de células en hidrogel*

Con el fin de resolver los inconvenientes que generan las inyecciones intramiocárdicas de hidrogeles, se ha estudiado una alternativa fundamentada en la creación de nuevo tejido *ex vivo* a partir de células con potencial cardiovascular previamente incorporadas dentro del hidrogel. De este modo, 2 estudios recientes reportan la capacidad contráctil *in vitro* de estos constructos compuestos por cardiomiocitos embrionarios<sup>10</sup> o neonatales<sup>11</sup> de rata. Esta estrategia confiere un ambiente en 3 dimensiones que favorece los contactos intercelulares evitando el proceso de anoikis<sup>60</sup> (muerte celular por ausencia de contacto intercelular) y permite la formación de una matriz extracelular propia por parte de las células del constructo<sup>61</sup>. Si bien es cierto que para avalar un desarrollo tisular óptimo estos nuevos constructos deben ser sometidos a un proceso de mecanoestimulación, o de lo contrario los cardiomiocitos tienden a morir<sup>62</sup>.



## Tejido cardiaco artificial

El microambiente en el que residen las células regenerativas es determinante para el mantenimiento de sus propiedades básicas y su función. De hecho, estudios de *microarrays* han confirmado que la señalización y respuesta de estas células dependen, en gran medida, de sus interacciones con los componentes de la matriz extracelular en la que residen<sup>63</sup>. En consecuencia, la ingeniería tisular cardiaca está apostando por nuevas alternativas basadas en la formación de tejido cardiaco artificial funcional tridimensional. Por ejemplo se han desarrollado matrices muy semejantes en cuanto a propiedades fisicoquímicas a la matriz extracelular fisiológica a partir de materiales naturales, como el alginato<sup>64</sup> o mezclas de colágeno<sup>10</sup>, o sintéticos, como el ácido poliláctico<sup>65</sup> o el ácido poliglicólico<sup>66</sup>. Su principal ventaja es que se trata de materiales altamente maleables que permiten variar su forma y tamaño según las necesidades del individuo receptor. El estudio clínico MAGNUM (*Myocardial Assistance by Grafting a New Bioartificial Upgraded Myocardium*) ha utilizado una matriz de colágeno tipo I de dimensiones suficientes para cubrir completamente la cicatriz miocárdica. Este ensayo comparativo entre la cardiomioplastia aislada y la combinación de cardiomioplastia con ingeniería tisular concluye que esta nueva alternativa ofrece mejores resultados en cuanto a recuperación de función y el remodelado ventricular<sup>67</sup>. Sin embargo, la similitud de los tejidos cardiacos artificiales testados con la matriz extracelular cardiaca no es perfecta y las células implantadas no colonizan más que la superficie o unos pocos micrómetros de espesor<sup>61</sup>. Recientemente, se ha creado un consorcio europeo denominado RECATABI (*REgeneration of CARDiac Tissue Assisted by Bioactive Implants*)<sup>68</sup> para el desarrollo de una plataforma de bioingeniería cardiaca donde se combinan biomateriales innovadores (un esqueleto elastomérico e hidrogel-PuraMatrix<sup>TM</sup>) para mejorar la administración, supervivencia, migración y proliferación de las células implantadas. Los resultados preliminares muestran cierto grado de diferenciación cardiomiogénica de las células implantadas y conexiones vasculares entre los constructos y el miocardio adyacente.

### Matriz extracelular derivada de tejidos naturales

La matriz extracelular está compuesta por proteínas funcionales y estructurales como colágeno, elastina, laminina, fibronectina, proteoglicanos y muchas otras glucoproteínas, combinadas y organizadas espacialmente entre sí según cada tipo de tejido<sup>69,70</sup>. Se conoce que participa en múltiples procesos y respuestas celulares, incluyendo la proliferación, diferenciación y migración<sup>71</sup>. Estas propiedades le otorgan atractivo potencial como estructura de soporte en técnicas de ingeniería tisular cardiaca para implantar células regenerativas que sustituyan al miocardio dañado. Además existe la posibilidad de que esta matriz extracelular implantada pueda sustituir la del tejido dañado, contribuyendo de manera más eficaz a su regeneración. Se ha conseguido aislar láminas de matriz extracelular a partir de una gran variedad de tejidos incluyendo válvulas cardiacas<sup>72-74</sup>, vasos sanguíneos<sup>75,76</sup>, piel<sup>77</sup>, nervios<sup>78</sup>, músculo esquelético<sup>79</sup>, tendones<sup>80</sup>, ligamentos<sup>81</sup>, submucosa de intestino delgado<sup>82</sup>, vejiga urinaria<sup>83</sup> e hígado<sup>84</sup>.

Para su correcta aplicación, las láminas de matriz extracelular deben ser convenientemente separadas del tejido nativo, descelularizadas y, a menudo, desinfectadas, liofilizadas y esterilizadas<sup>85</sup>. Cabe considerar que este complejo procesado puede alterar la integridad y la arquitectura de la matriz. El uso de tejido animal como fuente de obtención, particularmente de tejido porcino, resuelve la escasez crítica de tejido humano para aplicaciones quirúrgicas<sup>86</sup>.

El protocolo ideal de descelularización de matrices naturales es aquel capaz de eliminar selectivamente los antígenos alogénicos y

xenogénicos, así como todo el contenido celular y nuclear del tejido preservando su composición, propiedades fisiológicas, integridad mecánica de la matriz extracelular y estructura vascular<sup>87,88</sup>. Este proceso combina tratamientos físicos, químicos y enzimáticos específicos, según el tipo de tejido que se va a tratar<sup>79,83,89,90</sup>.

Numerosos estudios han demostrado que la implantación de matriz extracelular facilita el remodelado de distintos tipos de tejidos, tanto en modelos animales como en el ámbito clínico<sup>83,89,91-97</sup>. Experimentalmente, en distintos modelos animales se ha reportado la colonización de las matrices extracelulares implantadas por células tanto de linaje cardiomiogénico como endotelial evitándose así el proceso de remodelado ventricular<sup>98-101</sup>. Sin embargo, cuando se trata de una matriz extracelular de origen miocárdico, los resultados ya implican una mejoría en la función cardiaca con presencia de cardiomiocitos en la región del implante<sup>102</sup>. Publicaciones recientes han demostrado que el uso de matrices extracelulares miocárdicas con la preservación de su arquitectura tridimensional es una alternativa clave para facilitar el soporte y la diferenciación celular necesarios para favorecer el proceso de regeneración cardiaca<sup>13,103-109</sup>.

### Acoplamiento celular electromecánico y función contráctil

En condiciones fisiológicas, el estiramiento mecánico de los cardiomiocitos está inducido por las señales eléctricas cardiacas y el acoplamiento entre el pulso eléctrico y las contracciones celulares, y es crucial para el desarrollo del miocardio<sup>14</sup>. Así, es de vital importancia que las técnicas de ingeniería tisular cardiaca garanticen un acoplamiento celular electromecánico y una función contráctil adecuadas dentro de los constructos generados. Con este fin se han diseñado estructuras de colágeno y Matrigel<sup>TM</sup> en forma de anillo colonizadas por cardiomiocitos neonatales de rata y sometidas a estimulación mecánica<sup>10</sup>. Tras su implantación sobre el miocardio isquémico de rata, estas estructuras anulares siguen siendo contráctiles de manera autónoma y son responsables de un incremento del grosor de la pared ventricular infartada y una mejoría de la función cardiaca. Otro abordaje se basa en la inducción de contracciones sincronizadas en la matriz celular mediante estimulación eléctrica<sup>110,111</sup>. Como resultado, los pulsos eléctricos dan lugar a una notable organización ultraestructural y acoplamiento celular de los cardiomiocitos residentes en la matriz. Como contrapartida, estos constructos contienen cardiomiocitos alogénicos y son demasiado pequeños para su aplicación clínica.

Recientemente se ha iniciado un estudio en el modelo porcino de infarto agudo de miocardio basado en la implantación de una matriz bioactiva con un sistema de monitorización *online*. Mediante impedancia eléctrica, este sistema permite valorar la progresión de la cicatriz cardiaca *in situ* y evaluar los cambios eléctricos que de ella se derivan<sup>112,113</sup>. Este nuevo abordaje permitirá, en un futuro, evaluar de forma no invasiva las mejoras funcionales que puedan obtenerse tras la administración celular mediante ingeniería tisular cardiaca.

### Vascularización funcional

Uno de los aspectos clave que persiguen las técnicas de ingeniería tisular cardiaca es promover fenómenos de vascularización dentro de la matriz bioartificial que permitan una difusión continua de nutrientes y oxígeno hacia su interior, y que, posteriormente, puedan favorecer la migración e incorporación de las células dentro del miocardio dañado. Se han probado distintas aproximaciones para garantizar este proceso. Por ejemplo, formando parte del constructo se han incluido distintos factores de crecimiento, como el factor de crecimiento endotelial vascular<sup>114</sup> o el factor de crecimiento de fibroblastos de tipo

básico<sup>115</sup>, para que estimulen la formación de estructuras vasculares a partir de las propias células madre mesenquimales<sup>116</sup> y/o células progenitoras endoteliales<sup>117</sup> del constructo, o bien se han añadido citocinas movilizadoras para que se incorporen células progenitoras endoteliales del propio receptor una vez realizada la implantación. En conjunto, este abordaje promueve la infiltración celular y la formación de vasos sanguíneos con resultados muy prometedores<sup>114-119</sup>. Otras alternativas incluyen el uso de biorreactores *in vitro* para mejorar la perfusión de oxígeno a través de las células implantadas dentro de la matriz previamente canalizada, para facilitar la migración de células progenitoras endoteliales hacia el interior de los constructos generados<sup>14</sup>.

## NEORGANOGÉNESIS: CORAZÓN BIOARTIFICIAL

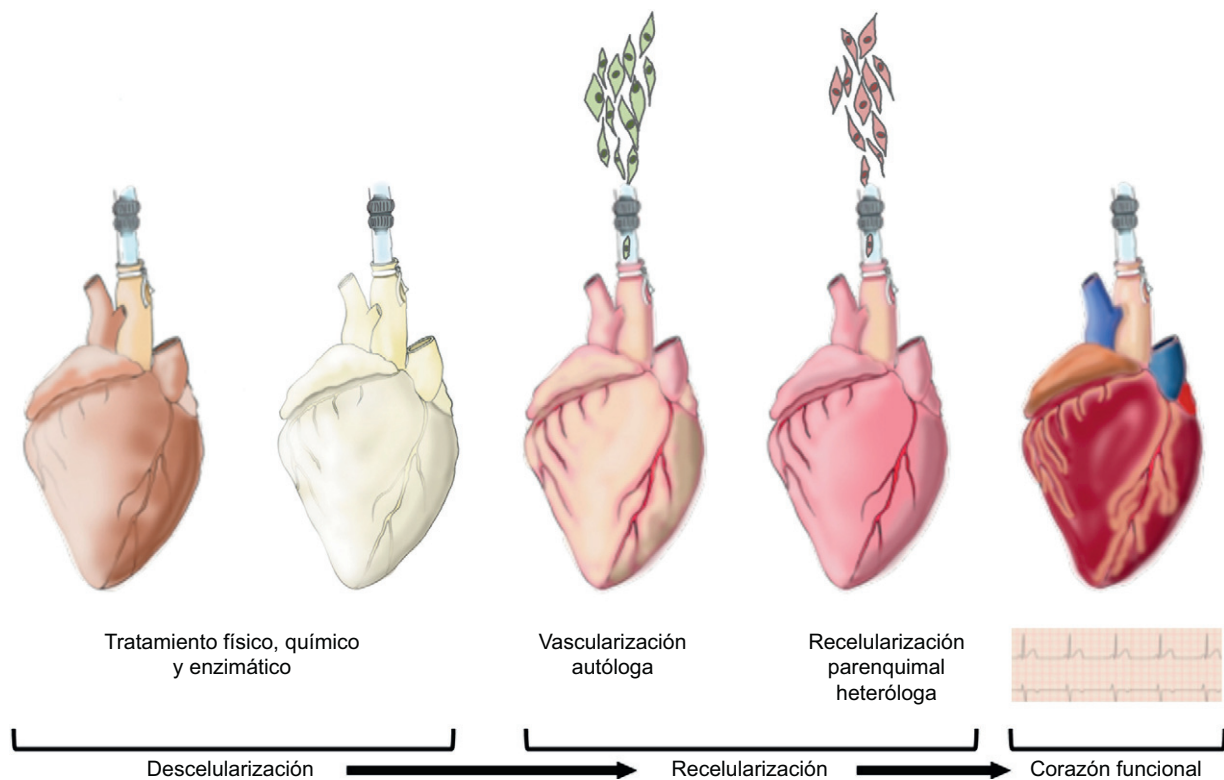
Los estudios de descelularización con matriz extracelular anteriormente comentados constituyen la prueba de concepto para la obtención de corazones descelularizados. Hasta la fecha, los procesos de descelularización por inmersión directa han sido suficientes para generar matrices de soporte a partir de distintos tejidos cardiovasculares, incluyendo la pared vascular<sup>120</sup>, el pericardio<sup>121,122</sup> y las valvas valvulares<sup>123,124</sup>. En cambio, para poder descelularizar un corazón entero, se ha demostrado que la perfusión coronaria con detergentes es el método más eficaz. Así, en 2008, se consiguió descelularizar corazones cadavéricos de ratas, obteniendo una compleja matriz extracelular cardiaca con el árbol vascular preservado, válvulas competentes y la geometría intacta de las aurículas y los ventrículos<sup>13</sup>. Posteriormente, se recelularizaron estos constructos con células endoteliales (vascularización autóloga) y células cardiacas neonatales (recelularización heteróloga parenquimal) mediante perfusión coronaria en un biorreactor simulando la fisiología cardiaca y favoreciendo

la maduración del órgano (fig. 2). Tras 8 días de incubación fisiológica y estimulación eléctrica se detectaron contracciones macroscópicas con una función de bomba equivalente al 2% del corazón adulto o al 25% de la función cardiaca de un feto de 16 semanas<sup>13</sup>.

Estudios más recientes han reportado la descelularización de corazones porcinos como modelo escalable al humano<sup>105,109</sup>. Un aspecto importante que hay que considerar en la aplicación de órganos enteros o matrices bioartificiales, es la necesidad de obtener una correcta vascularización sin la cual la viabilidad del constructo pueda verse comprometida. Este problema resulta especialmente crítico cuando el espesor de la matriz es superior a la barrera de difusión (unos 100  $\mu\text{m}$ ), donde el suministro de oxígeno y nutrientes queda limitado y se acumulan subproductos celulares de desecho citotóxicos<sup>103,125</sup>. Con la descelularización de corazones enteros se ha conseguido mimetizar el tejido miocárdico vascularizado y repoblarlo con células a través de estructuras vasculares con cierto grado de preservación<sup>13,105,109</sup>. A pesar de su éxito, esta estrategia puede verse limitada con respecto a las tecnologías disponibles para la expansión de células a gran escala, particularmente de cardiomiocitos, necesaria para la repoblación de todo el órgano<sup>103,126</sup>. Todavía queda camino por recorrer hasta poder disponer de un corazón bioartificial para su uso en humanos. Sin embargo, un grupo de investigación español pionero en este campo está llevando a cabo, como primera prueba de concepto, el desarrollo de un corazón bioartificial mediante la descelularización de corazones humanos, y su posterior recelularización con células mesenquimales humanas y cardiomiocitos de origen murino<sup>127</sup>.

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO

Aunque los resultados de los estudios anteriormente mencionados son claramente esperanzadores y muchos han demostrado



**Figura 2.** Neorganogénesis: corazón bioartificial. Esquema gráfico de los diferentes pasos de la descelularización y recelularización de un corazón. Inicialmente la descelularización física, química y enzimática cuyo objetivo es la preservación de la matriz extracelular cardiaca y del árbol vascular. A continuación se induce la vascularización autóloga seguida de la recelularización parenquimal heteróloga para, finalmente, generar un nuevo corazón funcional.

una mejoría notable en la función contráctil cardiaca, todavía quedan por definir muchas cuestiones. A día de hoy, el gran inconveniente en la mayoría de estudios de ingeniería tisular reside en la dificultad de extrapolación del modelo animal de rata/ratón al modelo porcino y, consecuentemente, al ámbito clínico. El tamaño del corazón humano hace que dichas aproximaciones sean inviables, tanto por las dimensiones de la matriz (debería ser de 10-50 cm<sup>2</sup> y de varios milímetros de grosor<sup>14</sup>) como por el número limitado de células que puedan llegar a ser implantadas.

Ante tal escenario, nuestro grupo de investigación ha diseñado una nueva técnica quirúrgica basada en la transposición de un pedículo adiposo autólogo de origen pericárdico sobre la superficie miocárdica isquémica. Esta nueva propuesta ofrece resultados muy prometedores en el modelo preclínico porcino de infarto de miocardio, puesto que el pedículo graso establece conexiones vasculares con el miocardio infartado<sup>128,129</sup> y, como consecuencia, garantiza una mejoría funcional cardiaca en términos de fracción de eyección y volúmenes cardíacos<sup>128</sup>. Actualmente estamos incluyendo pacientes de manera prospectiva y aleatorizada (Clinicaltrials.gov NCT01473433) para valorar la efectividad y seguridad de este nuevo abordaje quirúrgico<sup>130</sup>. En el ámbito clínico, todavía son pocos los ensayos basados en la aplicación de la ingeniería tisular cardiaca. Otros 2 ensayos clínicos vigentes se basan en la inyección intramiocárdica de alginato (NCT01311791) o la administración intracoronaria de alginato sódico combinado con gluconato cálcico (NCT01226563), con el fin de generar una nueva matriz extracelular en el miocardio para que los progenitores cardíacos residentes en él migren y repueblen la cicatriz cardiaca.

Pese a los ingentes avances en el campo de la ingeniería tisular cardiaca, quedan por discernir múltiples cuestiones cruciales para restablecer completamente la función cardiaca y la vascularización del miocardio isquémico. Primero, es clave determinar qué tipo celular (células adultas, embrionarias o células madre pluripotentes inducidas; autólogas o heterólogas) es idóneo para obtener regeneración tisular. Segundo, se debe definir qué matriz (hidrogeles naturales o sintéticos, colágeno, ácido poliláctico, ácido poliláctico-co-glicólico, matriz extracelular) ofrece mejores condiciones para anidar la población celular y favorecer su retención y proliferación. Tercero, la existencia del acoplamiento celular electromecánico dentro de la matriz y del constructo con el tejido que hay que reparar es fundamental para restaurar la función cardiaca. Finalmente, la vascularización del constructo determinará su propia viabilidad e integración con el tejido receptor, además de convertirse en el aporte sanguíneo preciso para revertir la isquemia miocárdica.

## FINANCIACIÓN

Red de Terapia Celular - TerCel (RD12/0019/0029), Red Cardiovascular (RD12/0042/0047), *European Commission 7th Framework Programme* (RECATABI, NMP3-SL-2009-229239), Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2011-30067-C02-01) y *Fundació Marató TV3* (122232).

## CONFLICTO DE INTERESES

Ninguno.

## BIBLIOGRAFÍA

- McKee PA, Castelli WP, McNamara WB. The natural history of congestive heart failure: the Framingham study. *N Engl J Med*. 1971;285:1441-6.
- Cowie MR, Wood DA, Coats AJ, Thompson SG, Poole-Wilson PA, Suresh V, et al. Incidence and aetiology of heart failure: a population-based study. *Eur Heart J*. 1999;20:421-8.
- Olivetti G, Capasso JM, Meggs LG, Sonnenblick EH, Anversa P. Cellular basis of chronic ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *Circ Res*. 1991;68:856-69.
- Suárez de Lezo, Herrera C, Romero MA, Pan M, Jiménez R, Carmona D, et al. Recuperación funcional tras infusión intracoronaria de células mononucleadas de médula ósea autóloga en pacientes con infarto crónico anterior y depresión severa de la función ventricular. *Rev Esp Cardiol*. 2010;63:1127-35.
- Terzic A, Perez-Terzic C. Terapia celular para la insuficiencia cardíaca. *Rev Esp Cardiol*. 2010;63:1117-9.
- Chachques JC. Cardiomyoplasty: is it still a viable option in patients with end-stage heart failure? *Eur J Cardiothorac Surg*. 2009;35:201-3.
- Bayes-Genis A, Soler-Botija C, Farré J, Sepulveda 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;49:771-80.
- Soler-Botija C, Bagó JR, Bayes-Genis A. A bird's-eye view of cell therapy and tissue engineering for cardiac regeneration. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1254:57-65.
- 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.
- Eschenhagen T, Fink C, Remmers U, Scholz H, Wattochow J, Weil J, et al. Three-dimensional reconstitution of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix: a new heart muscle model system. *FASEB J*. 1997;11:683-94.
- Morritt AN, Bortolotto SK, Dilley RJ, Han X, Kompa AR, McCombe D, et al. Cardiac tissue engineering in an in vivo vascularized chamber. *Circulation*. 2007;115:353-60.
- Li RK, Yau TM, Weisel RD, Mickle DA, Sakai T, Choi A, et al. Construction of a bioengineered cardiac graft. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2000;119:368-75.
- Ott HC, Matthiesens TS, Goh SK, Black LD, Kren SM, Netoff TI, et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med*. 2008;14:213-21.
- 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;16:169-87.
- Jain M, DerSimonian H, Brenner DA, Ngoy S, Teller P, Edge AS, et al. Cell therapy attenuates deleterious ventricular remodeling and improves cardiac performance after myocardial infarction. *Circulation*. 2001;103:1920-7.
- Menasché P, Alfieri O, Janssens S, McKenna W, Reichenspurner H, Trinquart L, et al. The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation*. 2008;117:1189-200.
- Bayes-Genis A, Roura S, Soler-Botija C, Farré J, Hove-Madsen L, Llach A, et al. Identification of cardiomyogenic lineage markers in untreated human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Transplant Proc*. 2005;37:4077-9.
- 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 U S A*. 2001;98:10733-8.
- Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JI, Uchida S, Masuda H, et al. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation*. 2001;103:634-7.
- Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringden O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*. 2003;31:890-6.
- Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res*. 2007;100:1249-60.
- Houtgraaf JH, Den Dekker WK, Van Dalen BM, Springeling T, De Jong R, Van Geuns RJ, et al. First experience in humans using adipose tissue-derived regenerative cells in the treatment of patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2012;59:539-40.
- Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussen V, Mishina Y, et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:12313-8.
- Martin CM, Meeson AP, Robertson SM, Hawke TJ, Richardson JA, Bates S, et al. 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.
- Messina E, De Angelis L, Frati G, Morrone S, Chimenti S, Fioraliso F, et al. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res*. 2004;95:911-21.
- Bock-Marquette I, Saxena A, White MD, Dimaio JM, Srivastava D. Thymosin  $\beta$ 4 activates integrin linked kinase and promotes cardiac cell migration, survival and cardiac repair. *Nature*. 2004;432:466-72.
- Linke A, Muller P, Nurzynska D, Casarsa C, Torella D, Nascimbene A, et al. Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:8966-71.
- Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 2003;114:763-76.
- Yang L, Soonpaa MH, Adler ED, Roepke TK, Kattman SJ, Kennedy M, et al. Human cardiovascular progenitor cells develop from a  $\beta$ 4 embryonic-stem-cell-derived population. *Nature*. 2008;53:524-8.



30. Caspi O, Lesman A, Basevitch Y, Gepstein A, Arbel G, Habib IH, et al. Tissue engineering of vascularized cardiac muscle from human embryonic stem cells. *Circ Res*. 2007;100:263-72.
31. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131:861-72.
32. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007;318:1917-20.
33. Soonpaa MH, Koh GY, Klug MG, Field LJ. Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium. *Science*. 1994;264:98-101.
34. Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, Mickle DA, Zhang J, Mohabeer MK, et al. Cardiomyocyte transplantation improves heart function. *Ann Thorac Surg*. 1996;62:654-60. discussion 660-1.
35. Etzlin S, Battler A, Barbash IM, Cagnano E, Zarin P, Granot Y, et al. Influence of embryonic cardiomyocyte transplantation on the progression of heart failure in a rat model of extensive myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 2001;33:1321-30.
36. Mathiasen AB, Jørgensen E, Qayyum AA, Haack-Sørensen M, Ekblond A, Kastrup J. Rationale and design of the first randomized, double-blind, placebo-controlled trial of intramyocardial injection of autologous bone-marrow derived Mesenchymal Stromal Cells in chronic ischemic Heart Failure (MSC-HF Trial). *Am Heart J*. 2012;164:285-91. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ahj.2012.05.026>.
37. Hashemi SM, Ghods S, Kolodgie FD, Parcham-Azad K, Keane M, Hamamdzić D, et al. A placebo controlled, dose-ranging, safety study of allogenic mesenchymal stem cells injected by endomyocardial delivery after an acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2008;29:251-9.
38. Revilla A, López J, Arnold R, Sánchez PL, Villa A, Pinedo M, et al. Evolución a largo plazo de la función ventricular tras la terapia celular intracoronaria en el infarto agudo de miocardio. *Rev Esp Cardiol*. 2011;64:334-7.
39. Rigol M, Solanes N, Farré J, Roura S, Roqué M, Berruzo A, et al. Effects of adipose tissue-derived stem cell therapy after myocardial infarction: impact of the route of administration. *J Card Fail*. 2010;16:357-66.
40. Freyman T, Polin G, Osman H, Crary J, Lu M, Cheng L, et al. A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2006;27:1114-22.
41. Hou D, Youssef EA, Brinton TJ, Zhang P, Rogers P, Price ET, et al. Radiolabeled cell distribution after intramyocardial, intracoronary, and interstitial retrograde coronary venous delivery: implications for current clinical trials. *Circulation*. 2005;112:1150-6.
42. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Döbert N, et al. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*. 2002;106:3009-17.
43. 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.
44. 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;355:1199-209.
45. Schächinger V, Erbs S, Elsässer A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, et al. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2006;355:1210-21.
46. Siminiak T, Kalawski R, Fiszler D, Jerzykowska O, Rzezniczak J, Rozwadowska N, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for the treatment of postinfarction myocardial injury: phase I clinical study with 12 months of follow-up. *Am Heart J*. 2004;148:531-7.
47. Cao F, Van der Bogt KE, Sadrzadeh A, Xie X, Sheikh AY, Wang H, et al. Spatial and temporal kinetics of teratoma formation from murine embryonic stem cell transplantation. *Stem Cells Dev*. 2007;16:883-91.
48. Torrent-Guasp F, Buckberg GD, Clemente C, Cox JL, Coghlan HC, Gharib M. The structure and function of the helical heart and its buttress wrapping I. The normal macroscopic structure of the heart. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*. 2001;13:301-19.
49. Buckberg GD. Basic science review: the helix and the heart. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2002;124:863-83.
50. 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.
51. Okano T, Yamada N, Okuhara M, Sakai H, Sakurai Y. Mechanism of cell detachment from temperature-modulated, hydrophilic-hydrophobic polymer surfaces. *Biomaterials*. 1995;16:297-303.
52. 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;12:459-66.
53. 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:e40.
54. 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;112:1173-7.
55. Zhang Y, Thorn S, DaSilva JN, Lamoureux M, DeKemp RA, Beanlands RS, et al. Collagen-based matrices improve the delivery of transplanted circulating progenitor cells: development and demonstration by ex vivo radionuclide cell labeling and in vivo tracking with positron-emission tomography. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2008;1:197-204.
56. Roura S, Bagó JR, Soler-Botija C, Pujal JM, Gálvez-Montón C, Prat-Vidal C, et al. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells promote vascular growth in vivo. *PLoS One*. 2012;7:e49447.
57. Dawson E, Mapiili G, Erickson K, Taqvi S, Roy K. Biomaterials for stem cell differentiation. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008;60:215-28.
58. Li Z, Guan J. Hydrogels for cardiac tissue engineering. *Polymers*. 2011;3:740-61.
59. Kraehenbuehl TP, Zammaretti P, Van der Vlies AJ, Schoenmakers RG, Lutolf MP, Jaconi ME, et al. Three-dimensional extracellular matrix-directed cardioprogenitor differentiation: systematic modulation of a synthetic cell-responsive PEG-hydrogel. *Biomaterials*. 2008;29:2757-66.
60. Munoz J, Zhou Y, Jarrett HW. LG4-5 domains of laminin-211 binds  $\alpha$ -dystroglycan to allow myotube attachment and prevent anoikis. *J Cell Physiol*. 2010;22:111-9.
61. Eschenhagen T, Eder A, Vollert I, Hansen A. Physiological aspects of cardiac tissue engineering. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012;303:H133-43.
62. Naderi H, Matin MM, Bahrami AR. Review paper: critical issues in tissue engineering: biomaterials, cell sources, angiogenesis, and drug delivery systems. *J Biomater Appl*. 2011;26:383-417.
63. Peralgallo S, Diaz-Mochon JJ, Bradley MA. Cooperative polymer-DNA microarray approach to biomaterial investigation. *Lab Chip*. 2009;9:397-403.
64. Dvir T, Timko BP, Brigham MD, Naik SR, Karajanagi SS, Levy O, et al. Nanowired three-dimensional cardiac patches. *Nat Nanotechnol*. 2011;6:720-5.
65. Behfar A, Yamada S, Crespo-Diaz R, Nesbitt JJ, Rowe LA, Perez-Terzic C, et al. Guided cardiopoiesis enhances therapeutic benefit of bone marrow human mesenchymal stem cells in chronic myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2010;56:721-34.
66. Stout DA, Basu B, Webster TJ. Poly(lactic-co-glycolic acid): carbon nanofiber composites for myocardial tissue engineering applications. *Acta Biomater*. 2011;7:3101-12.
67. Chachques JC, Trainini JC, Lago N, Cortes-Morichetti M, Schussler O, Carpentier A. Myocardial Assistance by Grafting a New Bioartificial Upgraded Myocardium (MAGNUM trial): clinical feasibility study. *Ann Thorac Surg*. 2008;85:901-8.
68. RECATABI. Regeneration of Cardiac Tissue Assisted by Bioactive Implants [consultado 22 Oct 2012]. Disponible en: [www.recatabi.com](http://www.recatabi.com)
69. Laurie GW, Horikoshi S, Killen PD, Segui-Real B, Yamada Y. In situ hybridization reveals temporal and spatial changes in cellular expression of mRNA for a laminin receptor, laminin, and basement membrane (type IV) collagen in the developing kidney. *J Cell Biol*. 1989;109:1351-62.
70. Baldwin HS. Early embryonic vascular development. *Cardiovasc Res*. 1996;31:E34-45. Spec No.
71. Midwood KS, Williams LV, Schwarzbauer JE. Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36:1031-7.
72. Bader A, Schilling T, Teebken OE, Brandes G, Herden T, Steinhoff G, et al. Tissue engineering of heart valves—human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1998;14:279-84.
73. Booth C, Korossis SA, Wilcox HE, Watterson KG, Kearney JN, Fisher J, et al. Tissue engineering of cardiac valve prostheses I: development and histological characterization of an acellular porcine scaffold. *J Heart Valve Dis*. 2002;11:457-62.
74. Korossis SA, Booth C, Wilcox HE, Watterson KG, Kearney JN, Fisher J, et al. Tissue engineering of cardiac valve prostheses II: biomechanical characterization of decellularized porcine aortic heart valves. *J Heart Valve Dis*. 2002;11:463-71.
75. Dahl SL, Koh J, Prabhakar V, Niklason LE. Decellularized native and engineered arterial scaffolds for transplantation. *Cell Transplant*. 2003;12:659-66.
76. Schmidt CE, Baier JM. Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering. *Biomaterials*. 2000;21:2215-31.
77. Chen RN, Ho HO, Tsai YT, Sheu MT. Process development of an acellular dermal matrix (ADM) for biomedical applications. *Biomaterials*. 2004;25:2679-86.
78. Hudson TW, Liu SY, Schmidt CE. Engineering an improved acellular nerve graft via optimized chemical processing. *Tissue Eng*. 2004;10:1346-58.
79. Borschel GH, Dennis RG, Kuzon Jr WM. Contractile skeletal muscle tissue-engineered on an acellular scaffold. *Plast Reconstr Surg*. 2004;113:595-602. discussion 603-4.
80. Cartmell JS, Dunn MG. Effect of chemical treatments on tendon cellularity and mechanical properties. *J Biomed Mater Res*. 2000;49:134-40.
81. Woods T, Gratzner PF. Effectiveness of three extraction techniques in the development of a decellularized bone-anterior cruciate ligament-bone graft. *Biomaterials*. 2005;26:7339-49.
82. Badylak SF, Lantz GC, Coffey A, Geddes LA. Small intestinal submucosa as a large diameter vascular graft in the dog. *J Surg Res*. 1989;47:74-80.
83. Chen F, Yoo JJ, Atala A. Acellular collagen matrix as a possible «off the shelf» biomaterial for urethral repair. *Urology*. 1999;54:407-10.
84. Lin P, Chan WC, Badylak SF, Bhatia SN. Assessing porcine liver-derived biomatrix for hepatic tissue engineering. *Tissue Eng*. 2004;10:1046-53.
85. Badylak SF, Freytes DO, Gilbert TW. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *Acta Biomater*. 2009;5:1-13.
86. Ekser B, Cooper DK. Overcoming the barriers to xenotransplantation: prospects for the future. *Expert Rev Clin Immunol*. 2010;6:219-30.



87. 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;18:866–76.
88. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*. 2006;27:3675–83.
89. Badylak SF. Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Transplant Immunol*. 2004;12:367–77.
90. Lichtenberg A, Tudorache I, Cebotari S, Ringes-Lichtenberg S, Sturz G, Hoefler K, et al. In vitro re-endothelialization of detergent decellularized heart valves under simulated physiological dynamic conditions. *Biomaterials*. 2006;27:4221–9.
91. Dellgren G, Eriksson M, Brodin LA, Radegran K. The extended Biocor stentless aortic bioprosthesis. Early clinical experience. *Scand Cardiovasc J*. 1999;33:259–64.
92. Harper C. Permacol: clinical experience with a new biomaterial. *Hosp Med*. 2001;62:90–5.
93. Kolkner AR, Brown DJ, Redstone JS, Scarpinato VM, Wallack MK. Multilayer reconstruction of abdominal wall defects with acellular dermal allograft (AlloDerm) and component separation. *Ann Plast Surg*. 2005;55:36–41. discussion 41–2.
94. Lee MS. Graftjacket augmentation of chronic Achilles tendon ruptures. *Orthopedics*. 2004;27:s151–3.
95. Metcalf MH, Savoie FH, Kellum B. Surgical technique for xenograft (SIS) augmentation of rotator-cuff repairs. *Oper Tech Orthop*. 2002;12:204–8.
96. 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;10:93–9.
97. Wainwright DJ. Use of an acellular allograft dermal matrix (AlloDerm) in the management of full-thickness burns. *Burns*. 1995;21:243–8.
98. Chang Y, Chen SC, Wei HJ, Wu TJ, Liang HC, Lai PH, et al. Tissue regeneration observed in a porous acellular bovine pericardium used to repair a myocardial defect in the right ventricle of a rat model. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2005;130:705–11.
99. Badylak SF, Kochupura PV, Cohen IS, Doronin SV, Saltman AE, Gilbert TW, et al. The use of extracellular matrix as an inductive scaffold for the partial replacement of functional myocardium. *Cell Transplant*. 2006;15:S29–40.
100. Ota T, Gilbert TW, Badylak SF, Schwartzman D, Zenati MA. Electromechanical characterization of a tissue-engineered myocardial patch derived from extracellular matrix. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2007;133:979–85.
101. Robinson KA, Li J, Mathison M, Redkar A, Cui J, Chronos NA, et al. Extracellular matrix scaffold for cardiac repair. *Circulation*. 2005;112:1135–43.
102. Kochupura PV, Azeloglu EU, Kelly DJ, Doronin SV, Badylak SF, Krukenkamp IB, et al. Tissue-engineered myocardial patch derived from extracellular matrix provides regional mechanical function. *Circulation*. 2005;112:1144–9.
103. Sarig U, Machluf M. Engineering cell platforms for myocardial regeneration. *Expert Opin Biol Ther*. 2011;11:1055–77.
104. Akhyari P, Aubin H, Gwanmesia P, Barth M, Hoffmann S, Huelsmann J, et al. The quest for an optimized protocol for whole-heart decellularization: a comparison of three popular and a novel decellularization technique and their diverse effects on crucial extracellular matrix qualities. *Tissue Eng Part C Methods*. 2011;17:915–26.
105. Wainwright JM, Czajka CA, Patel UB, Freytes DO, Tobita K, Gilbert TW, et al. Preparation of cardiac extracellular matrix from an intact porcine heart. *Tissue Eng Part C Methods*. 2010;16:525–32.
106. Singelyn JM, DeQuach JA, Seif-Naraghi SB, Littlefield RB, Schup-Magoffin PJ, Christman KL. Naturally derived myocardial matrix as an injectable scaffold for cardiac tissue engineering. *Biomaterials*. 2009;30:5409–16.
107. Eitan Y, Sarig U, Dahan N, Machluf M. Acellular cardiac extracellular matrix as a scaffold for tissue engineering: in vitro cell support, remodeling, and biocompatibility. *Tissue Eng Part C Methods*. 2010;16:671–83.
108. Wang B, Borazjani A, Tahai M, Curry AL, Simionescu DT, Guan J, et al. Fabrication of cardiac patch with decellularized porcine myocardial scaffold and bone marrow mononuclear cells. *J Biomed Mater Res A*. 2010;94:1100–10.
109. Weymann A, Loganathan S, Takahashi H, Schies C, Claus B, Hirschberg K, et al. Development and evaluation of a perfusion decellularization porcine heart model—generation of 3-dimensional myocardial neoscaffolds. *Circ J*. 2011;75:852–60.
110. 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 U S A*. 2004;101:18129–34.
111. Radisic M, Marsano A, Maidhof R, Wang Y, Vunjak-Novakovic G. Cardiac tissue engineering using perfusion bioreactor systems. *Nat Protoc*. 2008;3:719–38.
112. Sanchez B, Guasch A, Bogonez P, Galvez C, Puig V, Prat C, et al. Towards on line monitoring the evolution of the myocardium infarction scar with an implantable electrical impedance spectrum monitoring system. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. 2012;2012:3223–6.
113. Gálvez-Montón C, Prat-Vidal C, Sánchez-Terrones B, Puig V, Bragós R, Bayes-Genis A. On-line monitoring of myocardial ischemia after a bioactive smart patch implantation in swine [abstract SDT-31]. 4th International Congress on Stem Cells and Tissue Formation. Quantitative stem cell biology: from models to applications, 2012. Disponible en: [http://www.conventus.de/fileadmin/media/2012/sc/Programm/Scientific\\_Program/SCC2012\\_Abstract\\_Book.pdf](http://www.conventus.de/fileadmin/media/2012/sc/Programm/Scientific_Program/SCC2012_Abstract_Book.pdf)
114. Shen YH, Shoichet MS, Radisic M. Vascular endothelial growth factor immobilized in collagen scaffold promotes penetration and proliferation of endothelial cells. *Acta Biomater*. 2008;4:477–89.
115. 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;12:2499–508.
116. Jin J, Jeong SI, Shin YM, Lim KS, Shin H, Lee YM, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells within a poly(lactide-co-epsilon-caprolactone) scaffold improves cardiac function in a rat myocardial infarction model. *Eur J Heart Fail*. 2009;11:147–53.
117. Sales VL, Mettler BA, Lopez-Illasaca M, Johnson Jr JA, Mayer Jr JE. Endothelial progenitor and mesenchymal stem cell-derived cells persist in tissue-engineered patch in vivo: application of green and red fluorescent protein-expressing retroviral vector. *Tissue Eng*. 2007;13:525–35.
118. 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:e34284.
119. 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;19:437–47.
120. Roy S, Silacci P, Stergiopoulos N. Biomechanical properties of decellularized porcine common carotid arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289:H1567–76.
121. Courtman DW, Pereira CA, Kashev V, McComb D, Lee JM, Wilson GJ. Development of a pericardial acellular matrix biomaterial: biochemical and mechanical effects of cell extraction. *J Biomed Mater Res*. 1994;28:655–66.
122. Mirsadraee S, Wilcox HE, Korossis SA, Kearney JN, Watterson KG, Fisher J, et al. Development and characterization of an acellular human pericardial matrix for tissue engineering. *Tissue Eng*. 2006;12:763–73.
123. Bodnar E, Olsen EG, Florio R, Dobrin J. Damage of porcine aortic valve tissue caused by the surfactant sodiumdodecylsulphate. *Thorac Cardiovasc Surg*. 1986;34:82–5.
124. Grabow N, Schmohl K, Khosravi A, Philipp M, Scharfschwerdt M, Graf B, et al. Mechanical and structural properties of a novel hybrid heart valve scaffold for tissue engineering. *Artif Organs*. 2004;28:971–9.
125. Kaully T, Kaufman-Francis K, Lesman A, Levenberg S. Vascularization—the conduit to viable engineered tissues. *Tissue Eng Part B Rev*. 2009;15:159–69.
126. 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.
127. Sánchez Fernández PL, Fernández Santos ME, Costanza S, Rodríguez-Abella H, Garrido G, Matesanz R, et al. Decelularización de corazones humanos para el desarrollo de matrices cardíacas que sirvan como soporte a la bioingeniería de tejidos cardíacos funcionales [abstract 31]. *Rev Esp Cardiol*. 2011;64 Supl 3:4.
128. Gálvez-Montón C, Prat-Vidal C, Roura S, Farré J, Soler-Botija C, Lluçà-Valldeperas A, et al. Transposition of a pericardial-derived vascular adipose flap for myocardial salvage after infarct. *Cardiovasc Res*. 2011;91:659–67.
129. Gálvez-Montón C, Prat-Vidal C, Roura S, Soler-Botija C, Lluçà-Valldeperas A, Díaz-Güemes I, et al. Post-infarction scar coverage using a pericardial-derived vascular adipose flap. Pre-clinical results. *Int J Cardiol*. 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2011.11.019>.
130. Bayes-Genis A, Gálvez-Montón C, Prat-Vidal C, Soler-Botija C. Cardiac adipose tissue: A new frontier for cardiac regeneration? *Int J Cardiol*. 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2012.05.082>.