

## Anuario 2012: La terapia celular en la enfermedad cardiovascular. Las revistas de las Sociedades Nacionales presentan una selección de las investigaciones que han impulsado avances recientes en Cardiología Clínica

*Almanac 2012: Cell therapy in cardiovascular disease. The National Society Journals present selected research that has driven recent advances in Clinical Cardiology*

Daniel A Jones<sup>a,b,c</sup>, Fizzah Choudry<sup>a,c</sup> y Anthony Mathur<sup>a,b,c</sup>✉

<sup>a</sup> Departamento de Cardiología, London Chest Hospital. Londres, Reino Unido.

<sup>b</sup> Departamento de Farmacología Clínica, William Harvey Research Institute, Queen Mary University. Londres, Reino Unido.

<sup>c</sup> NIHR Cardiovascular Biomedical Research Unit, London Chest Hospital. Londres, Reino Unido.

*Full English text of this article is also available*

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Recibido en Heart: 19 de marzo de 2012

Versión revisada en Heart: 7 de junio de 2012

Aprobado en Heart: 8 de junio de 2012

Recibido en CorSalud: 20 de octubre de 2012

Aprobado en CorSalud: 21 de octubre de 2012

*Este artículo fue publicado por primera vez en la revista Heart [2012;98(22):1626-31. doi: 10.1136/heartjnl-2011-301540. En línea el 2 de septiembre de 2012] y se reproduce con permiso de los autores y de la Red de Editores de la Sociedad Europea de Cardiología.*

*Es una publicación simultánea en todas las revistas de las Sociedades Nacionales pertenecientes a la Sociedad Europea de Cardiología y en otras revistas seleccionadas.*

### RESUMEN

La rápida puesta en práctica de la investigación de transferencia que se ha visto en la aplicación de la medicina regenerativa a la cardiología ha dado lugar a interesantes avances en nuestra comprensión de algunos de los mecanismos fundamentales relacionados con la biología humana. La primera generación de

células utilizadas en ensayos fase I-II (principalmente células mononucleares de la médula ósea), están entrando ahora en la fase III de los ensayos clínicos, con el objetivo de producir una estrategia terapéutica basada en células que puedan cambiar el pronóstico de la enfermedad cardíaca. La primera generación de terapia celular parece haber abordado las preocupaciones de seguridad, y mostró "actividad" en numerosos meta-análisis publicados. Con los conocimientos adquiridos hasta el momento, esta disciplina se está moviendo hacia la próxima generación de células -las células modificadas-, que se han desarrollado para mostrar un fenotipo que mejorará aún más el proceso

✉ A Mathur

Department of Cardiology, London Chest Hospital

Bonner Road, Bethnal Green

London E2 9JX, UK;

Correo electrónico: [a.mathur@qmul.ac.uk](mailto:a.mathur@qmul.ac.uk)

de reparación/rescate del miocardio. Este anuario cubre las últimas investigaciones básicas que pueden tener aplicación en los seres humanos próximamente, así como los resultados de los últimos ensayos clínicos.

**Palabras Clave:** Terapia Tisular, Terapia Celular, Enfermedades Cardiovasculares

#### ABSTRACT

The rapid translation from bench to bedside that has been seen in the application of regenerative medicine to cardiology has led to exciting new advances in our understanding of some of the fundamental mechanisms related to human biology. The first generation of cells used in phase I-II trials (mainly bone marrow mononuclear cells) are now entering phase III clinical

trials with the goal of producing a cell based therapeutic that can change the outcome of cardiac disease. First generation cell therapy appears to have addressed safety concerns as well as showing 'activity' in numerous published meta-analyses. With the knowledge gained to date, the field is moving towards the next generation of cells-the 'engineered' cell-that have been developed to display a phenotype that will further enhance the myocardial repair/salvage process. This almanac review covers the latest basic research that may soon have application to humans as well as the results of the latest clinical trials.

**Key words:** Tissue Therapy, Cell Therapy, Cardiovascular Diseases

---

### ACTUALIZACIÓN SOBRE LA TERAPIA CELULAR PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

La terapia celular es uno de los "nuevos horizontes" más importantes de la enfermedad cardiovascular. Esta ofrece nuevas oportunidades para desarrollar terapias que podrían revolucionar la forma en que tratamos a los pacientes, y constituye un campo de investigación que combina una mayor comprensión de la fisiopatología de la enfermedad cardiovascular con algunos de los conceptos biológicos más elementales relacionados con la embriología. El consecuente crecimiento de la investigación preclínica en el sistema cardiovascular y la rápida aplicación a los seres humanos han dado lugar a beneficios para la biología humana como un todo. La disciplina se está desarrollando rápidamente, y aquí presentamos los principales avances en los últimos 2 años. Con el fin de reflejar la sinergia entre la investigación básica y la aplicada, dividimos esta revisión en dos secciones.

### ACTUALIZACIÓN DE LAS CIENCIAS BÁSICAS EN TERAPIA CELULAR EN LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

**Nuevos modelos que mejoran nuestra comprensión de la regeneración**

#### El pez cebra

Existe una larga historia de investigaciones sobre la regeneración del corazón anfibio, con el pez cebra como el modelo más adoptado, dada su importante capacidad regenerativa y susceptibilidad a la manipu-

lación genética. El corazón del pez cebra se regenera totalmente después de la amputación quirúrgica del ápex cardíaco: una lesión que corresponde a una pérdida de aproximadamente el 20 % de la masa ventricular total<sup>1</sup>. Los experimentos iniciales sugirieron que las células progenitoras indiferenciadas eran la fuente principal de la regeneración de miocardiocitos en el pez cebra; sin embargo, dos estudios recientes de mapeo de genes demuestran claramente que los miocardiocitos preexistentes comprometidos son la fuente principal<sup>2,3</sup>. Estos dos grupos generaron independientemente peces cebras transgénicos en los que el promotor específico de miocardiocito *cmlc2* (también conocido como *myl7*) dirige la expresión de recombinasa Cre inducible por tamoxifeno. Estos animales se cruzaron con una línea reportera en la que la escisión, mediada por Cre, de una secuencia de parada flanqueada por sitios *loxP*, induce la expresión constitutiva de la proteína verde fluorescente (*GFP*, por sus siglas en inglés). En la descendencia de este cruce, todos los miocardiocitos preexistentes y su progenie fueron inducidos a expresar la GFP mediante tratamiento con tamoxifeno. Por lo tanto, si la regeneración del miocardio se derivó de células progenitoras indiferenciadas, el nuevo ápex ventricular debe ser GFP<sup>-</sup>. En cambio, ambos grupos encontraron que la gran mayoría de los miocardiocitos regenerados recientemente fueron GFP<sup>+</sup>, lo que sugiere que la regeneración del corazón del pez cebra está mediada principalmente por la proliferación de miocardiocitos pre-existentes. Esto es contrario a la creencia sostenida anteriormen-

te de que la generación de nuevos miocardiocitos a partir de células madre, constituía la etiología subyacente.

### **Ratones vs. pez cebra**

A pesar de que carecen de la capacidad de regeneración del corazón del pez cebra, los corazones postnatales de los mamíferos también se someten a un grado de renovación de miocardiocitos durante el envejecimiento normal y la enfermedad. Recientemente, un estudio<sup>4</sup> mostró que las diferencias entre los corazones de mamíferos y peces no se aplican necesariamente en el desarrollo temprano. Utilizando enfoques del modelo del pez cebra, los autores extirparon el ápex del ventrículo izquierdo (VI) de ratones recién nacidos de 1 día, y se observó una rápida respuesta regenerativa similar a la del pez cebra adulto. A las 3 semanas después de la lesión, el defecto había sido reemplazado por tejido normal del miocardio, el cual mostró una función contráctil normal a las 8 semanas. Los estudios de mapeo de destino genético indicaron que esta regeneración fue mediada por la proliferación de miocardiocitos preexistentes, nuevamente como en el pez cebra. En particular, esta capacidad regenerativa no se observó en los ratones con 7 días de edad, lo que sugiere que su pérdida puede coincidir con la binucleación de los miocardiocitos y la reducción de la actividad del ciclo celular. Sin embargo, este estudio indica que los mecanismos regenerativos, como los del pez cebra, están latentes en el corazón de los mamíferos. También proporciona un modelo genéticamente viable para la disección de los bloqueos a estos mecanismos en el mamífero adulto.

### **Fuentes alternativas de miocardiocitos: nuevos conceptos y conocimientos avanzados**

#### **Los fibroblastos como fuente de miocardiocitos**

Recientemente se ha demostrado que los fibroblastos en infartos podrían potencialmente ser reprogramados directamente a miocardiocitos. Hace quince años, los investigadores mostraron que los fibroblastos pueden ser diferenciados en el músculo esquelético *in vitro*, o en el corazón lesionado mediante la sobreexpresión del gen que codifica el factor de transcripción miogénica, MyoD. Sin embargo, a pesar de un extenso trabajo, no se encontró ningún gen maestro similar para el músculo cardíaco, y decayó el interés en la reprogramación. Estimulados por el descubrimiento de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs o

células *IPS*, por sus siglas en inglés), los científicos han regresado a este campo, utilizando combinaciones de factores de transcripción para reactivar las redes básicas de transcripción de los tipos celulares deseados. En los últimos 2 años, dos grupos han logrado avances en este objetivo. El primer grupo<sup>5</sup> exploró un total de 14 factores de transcripción cardíacos y encontró que una combinación específica de tres factores de transcripción, Gata4, MEF2C y Tbx5, era suficiente para generar miocardiocitos funcionales contráctiles directamente de fibroblastos dérmicos o cardíacos de ratones postnatales, y que los miocardiocitos inducidos se reprogramaban generalmente para adoptar un perfil de expresión genética similar al de los miocardiocitos. Estos factores activaron el transgén en el 20 % de los fibroblastos, de los cuales aproximadamente el 4 % de las células expresaron proteínas sarcoméricas endógenas, como la troponina T cardíaca, con ~ 1 % que mostraba propiedades funcionales, como lo es la contractilidad espontánea. Así, la mayoría de las células estaban solo parcialmente reprogramadas, aunque sus patrones globales de expresión génica se habían desplazado marcadamente de los fibroblastos a los miocardiocitos.

El segundo grupo<sup>6</sup> utilizó un método diferente para reprogramar los fibroblastos de embriones de ratón a miocardiocitos. Ellos utilizaron los “factores de Yamana”: OCT4 (también conocido como POU5F1), SOX2, KLF4 y c-MYC, para iniciar una reprogramación, pero después bloquearon la señalización a través de la vía JAK-STAT, que se requiere para la pluripotencia en el ratón, y añadieron el factor de BMP4 cardiogénico. Estas modificaciones produjeron una generación mínima de células IPS, pero a su vez activaron el programa progenitor cardíaco y, a las 2 semanas, generaron un número sustancial de colonias contráctiles. A los 18 días después de la inducción, aproximadamente el 40 % de las células expresó troponina T cardíaca. Cabe señalar que este estudio utilizó fibroblastos de embriones de ratón, mientras que Leda *et al.*<sup>5</sup> utilizaron principalmente fibroblastos cardíacos postnatales de ratón. La reprogramación del fibroblasto de cicatrización a un miocardiocito es atractiva, en particular si se puede hacer directamente en el infarto. Para tener éxito clínico, necesitamos saber cuán normales son estos miocardiocitos reprogramados, y el proceso tendrá que ser mucho más eficiente y libre de transgenes.

### **Células madre pluripotentes inducidas**

Un informe reciente, publicado en esta revista, llamó la atención sobre la gran promesa de las células IPS (células somáticas reprogramadas), como fuente renovable de células autólogas<sup>7</sup>. Estas células fueron descubiertas hace sólo 5 años por Takahashi y Yamanaka<sup>8</sup>, después de la introducción de genes en células de ratón adulto y de su reprogramación para parecerse a células madre embrionarias (células ES, por sus siglas en inglés). Dado que el ADN de estas células es idéntico al del paciente, se ha supuesto que éstas no serían atacadas por el sistema inmune, aunque su inmunogenicidad no se ha examinado profundamente. Sin embargo, un estudio<sup>9</sup> publicado en *Nature* en 2011 demostró que en un modelo de trasplante de ratón, algunas células IPS son, en efecto, inmunogénicas, aumentando las preocupaciones acerca de su uso terapéutico. Este estudio examinó la inmunogenicidad de las células IPS de ratón, utilizando un ensayo de formación de teratoma. Se inyectaron células IPS en ratones que estaban inmunodeprimidos o que eran genéticamente compatibles con las células del donante. Esto normalmente da como resultado la formación de tumores benignos llamados teratomas, que consisten en muchos tipos de células diferenciadas. El método fue validado utilizando una línea de células madre embrionarias genéticamente compatibles (autólogas), que dieron lugar a teratomas, mientras que una línea de células madre embrionarias no compatibles fue rechazada antes que se produjeran los teratomas. El trasplante de células IPS autólogas derivadas de fibroblastos fetales en ratones compatibles, trajo como consecuencia el rechazo de los teratomas, independientemente del método utilizado para generar las células IPS, lo que indica que, en este ensayo, las células IPS compatibles son más inmunogénicas que las células ES compatibles.

El estudio también identificó los antígenos que pueden haber causado el rechazo inmune de las células IPS, y descubrió un grupo de nueve genes que se expresaban a niveles anormalmente altos. La inducción de la expresión de tres de estos genes (*Hormad1*, *Zg16* y *Cyp3a11*) en las células madre embrionarias no inmunogénicas, deterioró significativamente la capacidad de las células para formar teratomas en el trasplante en ratones genéticamente compatibles. Este estudio ofrece más preguntas que respuestas, y tiene muchas limitaciones en relación con los estudios clínicos; sin embargo, también destaca que se necesita

aprender mucho acerca de los mecanismos subyacentes de la reprogramación celular, y las inherentes similitudes y diferencias entre las células madre embrionarias y las células IPS.

### **Terapias complementarias para mejorar la diferenciación de células madre**

Como beneficios derivados de la terapia celular, se han presentado dos nuevos enfoques a la reparación cardíaca.

#### **Timosina $\beta$ 4**

Uno de los avances más interesantes en la medicina regenerativa en los últimos 2 años ha sido la identificación de la “fuente auténtica de las progenitoras del miocardio” (células derivadas del epicardio)<sup>10</sup>, que pueden ser inducidas por timosina  $\beta$ 4 para diferenciarse en miocardiocitos. Este estudio sin precedentes realizado por Smart *et al.*<sup>11</sup> constituye un gran paso de avance en la identificación de una fuente viable de células madre/progenitoras, que podría contribuir al nuevo músculo después de una cardiopatía isquémica e infarto agudo de miocardio (IAM). Ellos demostraron que en un modelo de ratón, el corazón adulto contiene una población de células progenitoras permanente, que tiene el potencial de convertirse en miocardiocitos diferenciados después de un infarto de miocardio (IM). Las células progenitoras fueron preparadas con un péptido llamado timosina  $\beta$ 4 que indujo la reprogramación embrionaria, y causó la movilización de esta población y posterior diferenciación para dar lugar a nuevos miocardiocitos. Tras un IM inducido experimentalmente, se observó que estas células migraban al sitio de la lesión y luego se diferenciaban, sin ninguna evidencia de fusión celular, en miocardiocitos estructural y funcionalmente activos. Estos miocardiocitos mostraron evidencia de formación de uniones intercelulares comunicantes con células adyacentes, canales sincrónicos de calcio y la formación del aparato contráctil operacional. A pesar de que una baja fracción global de estas células están presentes en el sitio de la lesión y de una eficacia general de diferenciación relativamente pobre, las exploraciones con resonancia magnética revelaron mejoras significativas en la fracción de eyección, volúmenes cardíacos y tamaño de la cicatriz, en comparación con los animales del grupo control. El pretratamiento con timosina  $\beta$ 4 fue crucial para estos efectos y puede sugerir una nueva estrategia para promover la repara-

ción del miocardio en los seres humanos.

### Los microARNs

Los microARNs (pequeños ARN no codificantes) desempeñan un papel de vital importancia en la diferenciación y la auto-renovación de células madre pluripotentes, así como en la diferenciación de células de linaje cardiovascular. Como resultado, los microARNs han surgido como posibles moduladores de la diferenciación de células madre; específicamente, se ha informado que los miR-1 desempeñan un papel integral en la regulación de la diferenciación de las células progenitoras del músculo cardíaco. Un estudio publicado en 2011<sup>12</sup> dio un paso adelante y evaluó si la sobreexpresión del miR-1 en células madre embrionarias (células ES miR-1) mejoraba la diferenciación de miocitos cardíacos después de un trasplante en el miocardio infartado. En este estudio, los ratones modelo de infarto de miocardio tenían células ES miR-1, células madre embrionarias o medio de cultivo (control) trasplantado en la zona fronteriza del miocardio infartado. La sobreexpresión de miR-1 en las células ES trasplantadas protegió al miocardio receptor de apoptosis inducida por IM, mediante la activación del p-AKT e inhibición de la caspasa-3, fosfatasa y homóloga de la tensina, y la producción de superóxido. Una reducción significativa de la fibrosis intersticial y vascular se cuantificó en las células ES miR-1 en comparación con el control de IM. Por último, los ratones que recibieron células ES miR-1 presentaron una función cardíaca significativamente mejorada en comparación con los respectivos controles. Esto sugeriría que el miR-1 impulsa la diferenciación del miocito cardíaco a partir de células ES trasplantadas e inhibe la apoptosis post-IM; sin embargo, algo importante con respecto a la fibrosis es que no se observó una diferencia estadística significativa entre células ES miR-1 y grupos de células ES, lo que sugiere que se necesitan otros estudios en esta área. Recientemente se ha publicado una revisión<sup>13</sup> de la evidencia actual del papel de los microARN en las células madre/progenitoras y la reparación cardiovascular.

### ACTUALIZACIÓN CLÍNICA DE LA TERAPIA CELULAR EN LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

La trayectoria de aplicación desde la observación preclínica hasta el desarrollo del nuevo tratamiento puede llevar muchos años, incluso décadas. Diez años después de la primera aplicación clínica de las células

madre en la enfermedad cardíaca<sup>14</sup>, se han abordado muchas preguntas acerca de los tipos de células y su administración, y los investigadores están logrando una mejor comprensión de esta área investigativa y de los desafíos de la investigación de transferencia. Aunque existen muchos tipos de células elegibles para la reparación del miocardio, se ha usado un enfoque pragmático en los ensayos clínicos que han utilizado células mononucleares de médula ósea autólogas (CMN-MO), y algunos de los tipos celulares componentes encontrados [células madre hematopoyéticas, células madre mesenquimales (MSCs, por sus siglas en inglés) y las células endoteliales progenitoras] en los primeros pasos hacia el entorno clínico<sup>15</sup>. En los últimos años se han realizado varios ensayos clínicos fase I-II de trasplante de CMN-MO en la enfermedad cardíaca, los cuales han demostrado seguridad y viabilidad, mientras que los informes de eficacia, aunque menos consistentes, constituyen un motivo para futuras investigaciones.

### DESARROLLOS RECIENTES EN EL USO DE CMN-MO AUTÓLOGAS

Los últimos 2 años han sido testigo de algunos de los más grandes ensayos que examinan CMN-MO en el contexto de IAM, cuyos informes de resultados a largo plazo confirman seguridad a 3-5 años. Afortunadamente, meta-análisis recientes que examinan estos estudios han confirmado una vez más una pequeña, pero importante "actividad" de la terapia celular en la mejora de diversos parámetros secundarios de la función cardíaca<sup>16,17</sup>.

El primer ensayo controlado aleatorio de la terapia con células madre en el IAM fue el ensayo BOOST (transferencia de médula ósea para mejorar la regeneración del infarto con elevación del ST), que informó un incremento del 6,7 % en la fracción de eyección global del ventrículo izquierdo (FEVI) en el grupo de tratamiento, en comparación con un aumento del 0,7% en el grupo control a los 6 meses, lo que se atribuyó a la mejora del movimiento sistólico regional de la pared en la zona del infarto<sup>18</sup>. Los datos del seguimiento a los 5 años<sup>19</sup> mostraron una disminución de la FEVI y el aumento de los volúmenes del VI en ambos grupos, sin diferencias significativas en la mortalidad o en las variables clínicas fundamentales entre los grupos. Curiosamente, los análisis de subgrupos sugirieron que en el infarto más grave, definido como aquel con mayor afectación transmural, la terapia

celular confiere un beneficio significativo en la FEVI y la dimensión del VI en comparación con el grupo control.

El ensayo Reinfusión de Células Progenitoras Enriquecidas y Remodelación del Infarto en el Infarto Agudo de Miocardio (*REPAIR-AMI*, por sus siglas en inglés) es, hasta la fecha, el mayor ensayo clínico controlado aleatorizado de la terapia con células madre para la reparación cardíaca. El estudio original que incluyó a 204 pacientes con IAM mostró una mejoría significativamente mayor en la FEVI absoluta en los pacientes tratados con CMN-MO en comparación con el grupo control a los 4 meses. Como se ve en BOOST, los pacientes con infartos más grandes obtuvieron el mayor beneficio. Aunque no estaba lo suficientemente preparado para este propósito, éste fue el primer parámetro clínico de valoración (*endpoint*) a gran escala, cuyos datos muestran el beneficio en la mortalidad y la morbilidad conferido por la administración intracoronaria de células madre<sup>20</sup>. Esto fue confirmado a los 2 años con reducciones significativas de los *endpoints* clínicos combinados y aumentos en el movimiento de la pared del VI en los pacientes que recibieron CMN-MO evaluados mediante resonancia magnética<sup>21</sup>. Los datos de seguimiento a los 5 años, presentados en las Sesiones Científicas de la Asociación Estadounidense del Corazón (*AHA*, por sus siglas en inglés) del 2011<sup>22</sup>, incluyeron a 100 pacientes en cada grupo de tratamiento. Mientras que sólo había una tendencia hacia una mejora en la mortalidad, se observó una reducción significativa del *endpoint* combinado de muerte, en la recurrencia de infarto de miocardio y en la revascularización, conferida por una única infusión intracoronaria de células.

Los datos de seguimiento a largo plazo de 100 pacientes incluidos en el ensayo Trasplante de Células Madre Autólogas en el Infarto Agudo de Miocardio (*ASTAMI*, por sus siglas en inglés), mostró una mejora significativa en la capacidad de ejercicio en la cohorte tratada a los 3 años, aunque no hubo diferencias significativas en la FEVI entre los grupos de tratamiento y placebo<sup>23</sup>. El seguimiento a 5 años para el estudio "BALANCE" (Beneficio Clínico y Resultado a Largo Plazo Después de un Trasplante Intracoronario de Células Autólogas de Médula Ósea en Pacientes con Infarto Agudo de Miocardio), mostró una mejora significativa y sostenida de la función del VI y una reducción de la mortalidad en 62 pacientes tratados, en comparación con 62 pacientes del grupo control. Aunque esto

sugiere un beneficio significativo sobre la mortalidad, se debe señalar que este estudio no fue aleatorizado<sup>24</sup>. Otro ensayo grande (HEBE), de 200 pacientes, también se ha publicado recientemente<sup>25</sup> y no muestra ninguna mejora significativa en la función del VI en pacientes tratados hasta los 4 meses con CMN-MO en comparación con el placebo; sin embargo, los efectos a largo plazo de la terapia celular en este estudio todavía no se han informado.

La mayoría de estos estudios se encuentran en el contexto de la administración de células entre 5-8 días después del IAM. Todavía hay una necesidad de definir el momento óptimo para la transferencia de células en relación con la lesión isquémica. Es concebible que la mejoría en la función del VI y el resultado visto inconsistentemente entre los ensayos pueda depender del momento de la transferencia de células ya que, después del infarto, el miocardio tendrá un medio inflamatorio cambiante. En el reciente estudio LateTIME<sup>26</sup> se aborda el momento más tardío de 2-3 semanas post-IAM. Aquí, los autores encontraron que en 87 pacientes aleatorizados a CMN-MO o a control, el tratamiento con CMN-MO en el momento dado no mejoró la FEVI global ni la motilidad regional de la pared a los 6 meses. Aunque lo más probable sea que entre 5-7 días es el tiempo óptimo para la terapia celular post-IAM, no se han investigado todos los puntos temporales. Los ensayos en curso TIME<sup>27</sup> y SWISS-AMI<sup>28</sup> tienen como objetivo seguir evaluando el momento de la inyección. Hasta ahora, el único momento que no se ha considerado es la fase temprana (<12 h después de la revascularización). El ensayo clínico REGENERATE-AMI (EUDRACT 2007-002144-16), en el que se transfieren CMN-MO aproximadamente 6 horas después del intervencionismo coronario percutáneo (ICP), se encuentra a mitad del reclutamiento y presentará su informe en 2013.

En la actualidad existe la necesidad de definir mejor a los pacientes que se beneficiarán con la terapia celular. Los resultados a los 5 años de seguimiento de los ensayos BOOST y REPAIR-AMI sugieren que si la fracción de eyección se utiliza como *endpoint* secundario, los subgrupos con un gran déficit funcional inicial experimentarán aumentos clínicamente significativos en la FEVI, aunque el efecto general puede ser moderado para todos los participantes. Esto se ve corroborado por el subestudio FINCELL<sup>29</sup>, en el que 78 pacientes recibieron placebo o CMN-MO post-trombólisis e ICP en el IAM. Aquí se observó una mejoría

significativamente mayor en la función del VI, asociada con las CMN-MO, en los pacientes con FEVI inicial por debajo de la media para el grupo.

A pesar de la heterogeneidad de los resultados de los ensayos descritos, el mayor meta-análisis hasta la fecha, que incluye 1.765 pacientes y 33 ensayos controlados aleatorios, demuestra una mejora modesta pero significativa de la FEVI de 2,87 % en el seguimiento a corto plazo, con una mejora sostenida de la FEVI del 3,75 % después de más de 1 año de seguimiento<sup>16</sup>, lo que sugiere que el tratamiento complementario con células madre en el IAM ofrece mejora respecto a la terapia convencional. Estos efectos, si bien modestos, son comparables con los observados en los estudios trascendentales de la angioplastia primaria, los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) y los betabloqueadores<sup>30</sup>, y sugieren que se puede alcanzar un beneficio adicional similar con respecto a la mortalidad. La mayoría de los estudios en este campo, hasta la fecha, utilizan la FEVI como un *endpoint* clínico secundario, con poca comprensión de cómo este parámetro se relaciona con el resultado.

Recientemente, se han publicado dos estudios de CMN-MO en el IAM que tratan de explorar *endpoints* secundarios alternativos. El objetivo del estudio "Médula Ósea en el Infarto Agudo de Miocardio (BONAMI, por sus siglas en inglés)", fue evaluar el efecto sobre la variabilidad del miocardio a los 3 meses, y se reclutaron 101 pacientes con mala función ventricular izquierda post-IAM para recibir CMN-MO o placebo. La funcionabilidad miocárdica mejoró significativamente en el grupo tratado en comparación con el grupo control<sup>31</sup>. En otro ensayo<sup>32</sup>, la FEVI se evaluó junto a la perfusión miocárdica en una cohorte similar de pacientes hasta 12 meses. Se observó una pequeña mejora en la perfusión miocárdica en el grupo CMN-MO, en comparación con el control. Sin embargo, hubo una incidencia significativamente más baja de incidentes cardíacos adversos importantes combinados en el grupo de tratamiento, destacando de nuevo una relación mal definida entre los posibles marcadores secundarios y las mediciones complejas de los resultados clínicos.

Uno de los avances más importantes hasta la fecha es el paso de la fase II a la fase III en los ensayos clínicos. La mayoría de los ensayos clínicos actuales se han diseñado para evaluar solamente la seguridad y la viabilidad, y no han estado preparados para evaluar la

eficacia de la tecnología, al utilizar marcadores secundarios como la FEVI para evaluar la actividad. Para hacer frente a este problema, el programa de financiación de la Unión Europea recientemente, adjudicó a un consorcio integrado por 17 centros clínicos de Europa, 6 millones de euros para diseñar y llevar a cabo el estudio de resultados definitivos de CMN-MO en el IAM (BAMI; <http://www.bami-fp7.eu>). BAMI involucrará 3000 pacientes con el *endpoint* primario de mortalidad por todas las causas, haciendo de este estudio uno de los avances más interesantes en este campo en varios años. El informe del estudio se presentará en 5 años.

### **Terapia celular para la enfermedad crónica del VI**

El estudio *STAR-heart* es la mayor experiencia que se haya informado de CMN-MO en la insuficiencia cardíaca isquémica, y presentó los datos de sus cinco años de seguimiento en 2010<sup>33</sup>. El estudio no aleatorizado reclutó originalmente a 391 pacientes con una FEVI de 35 % o menos, a quienes se les ofreció la administración intracoronaria de CMN-MO autólogas. En total, 191 pacientes recibieron terapia celular y 200 pacientes recibieron solamente el mejor tratamiento médico. A los 5 años de seguimiento, hubo mejorías significativas en la FEVI, la contractilidad, el consumo de oxígeno y la tolerancia al ejercicio en pacientes tratados con CMN-MO, asociado interesantemente con una tasa de mortalidad significativamente menor que el grupo control. Esto requiere confirmación en un estudio aleatorizado doble ciego. El estudio FOCUS-HF<sup>34</sup> es un ensayo controlado aleatorizado de 30 pacientes, diseñado para evaluar los efectos de la administración transendocárdica de CMN-MO, en pacientes con insuficiencia cardíaca isquémica crónica sin posibilidad de revascularización posterior. A los 6 meses, aunque no hubo diferencias en la FEVI entre el grupo tratado y el grupo placebo, se constató que la terapia celular mejoró significativamente los síntomas y la calidad de vida; y en el análisis del subgrupo, el consumo de oxígeno en pacientes de 60 años o menos. Otro estudio<sup>35</sup> reciente evaluó el efecto de la terapia celular como complemento de la cirugía de revascularización miocárdica en pacientes con insuficiencia cardíaca isquémica sometidos a este procedimiento. A los 6 meses de seguimiento se informó un impresionante aumento de la FEVI y la reducción en las dimensiones del VI en el grupo CMN-MO.

Los datos a largo plazo del primer ensayo contro-

lado aleatorio con CMN-MO en la miocardiopatía dilatada (Células Autólogas de Médula Ósea en la Miocardiopatía Dilatada, ensayo *ABCD*, por sus siglas en inglés), fueron presentados en 2010<sup>36</sup>. En los 41 pacientes con un seguimiento de 3 años, se produjo una mejoría significativa de la FEVI en el grupo de tratamiento, mayor en los pacientes con clase funcional 3 de la Asociación del Corazón de Nueva York (*NYHA*, por sus siglas en inglés), en comparación con la clase funcional 4 de la *NYHA*, lo que sugiere que la mejoría fue mayor en aquellos pacientes con un miocardio menos dañado. También hubo una mejoría asociada de los síntomas, pero no se demostró beneficio en la mortalidad. Los ensayos con CMN-MO en la miocardiopatía no isquémica están en curso.

#### **La aplicación de otros tipos celulares en el entorno clínico**

Otro avance importante en los últimos 2 años ha sido el movimiento hacia la aplicación clínica de poblaciones celulares diferentes y una búsqueda del tipo celular óptimo para la reparación cardíaca con una serie de ensayos realizados por primera vez en humanos.

Las células madre hematopoyéticas circulantes/movilizadas identificadas más comúnmente por los marcadores CD34 y CD133 se han investigado como potenciales poblaciones elegibles para la reparación cardíaca. Estas poblaciones de células pueden ser fraccionadas a partir de CMN-MO o movilizadas en la circulación, utilizando agentes farmacológicos, tales como el factor estimulante de colonia de granulocitos (*G-CSF*, por sus siglas en inglés). Las células CD34 contienen más células determinadas de linaje endotelial y han sido previamente evaluadas en el IAM y en la angina refractaria. Los investigadores de la Terapia Celular Autóloga CD34 en la Isquemia Miocárdica Crónica (*ACT-CMI*, por sus siglas en inglés), han informado recientemente los resultados de un amplio ensayo de fase II que evalúa la terapia celular con la inyección intramiocárdica de dosis baja y alta de CD34 autóloga movilizada periféricamente, contra placebo en 167 pacientes con angina refractaria. Se encontró una mejoría significativa en la frecuencia de la angina y la tolerancia al ejercicio en el grupo con dosis baja en comparación con el placebo a los 6 y 12 meses. También hubo un aumento de la mortalidad en el grupo placebo<sup>37</sup>. Por el contrario, Chih *et al.* informaron que, a pesar de la movilización de células CD34 y CD34/CD133 con *G-CSF*, no se observó mejoría en la angina o

la perfusión miocárdica en los pacientes con enfermedad isquémica crónica<sup>38</sup>. Una vez más, esta discrepancia en los resultados de estos estudios, sugiere que se debe considerar cuidadosamente el método de administración empleado y que la administración intramiocárdica puede ser más eficaz en este tipo de pacientes.

Las MSC son capaces de liberar una amplia gama de factores paracrinos cardioprotectores y transdiferenciarse en una serie de tipos celulares que están implicados en la reparación cardíaca y, por lo tanto, se utilizan cada vez más en los ensayos clínicos que han demostrado resultados prometedores. Otra ventaja de las MSC es su facilidad logística de acceso a través de la médula ósea y el tejido adiposo.

Recientemente se informaron los resultados de 6 meses del primer ensayo controlado aleatorizado en humanos, con 14 pacientes que recibieron células madre y regenerativas derivadas del tejido adiposo autólogo (*ADRCs*, por sus siglas en inglés) para el IAM [el ensayo Células madre derivadas de tejido adiposo en el tratamiento de pacientes con infarto con elevación del ST (*APOLLO*)]<sup>39</sup>. Todos los pacientes recibieron placebo o terapia celular dentro de las 24 h del ICP primario. Estos fueron los primeros pacientes con IM que tenían una FEVI entre 35 % y 50 %. A los 6 meses hubo una mejoría significativa en la formación de la cicatriz miocárdica y en el defecto de perfusión, una reducción casi significativa en el tamaño del infarto y una mejoría en la fracción de eyección calculada con la terapia celular en comparación con el grupo control, y el tratamiento demostró ser seguro. Los datos a los 18 meses fueron presentados en el Simposio Internacional 2011 sobre Terapia de Células Madre e Innovación Cardiovascular, los cuales mostraron beneficios sostenidos. El siguiente paso, un estudio más amplio llamado *ADVANCE*, con 375 pacientes, proporcionará una mayor fuerza estadística. Los resultados de dieciocho meses de un ensayo similar hecho por primera vez en humanos con *ADRCs* para la insuficiencia cardíaca isquémica, *PRECISE*, aunque aún no están publicados, fueron presentados en las Sesiones Científicas de la *AHA* en 2010<sup>40</sup>. Aquí, 27 pacientes fueron aleatorizados para recibir *ADRCs* transendocárdica o placebo. Los resultados a los 6 meses mostraron una reducción significativa en el tamaño del infarto en el grupo de tratamiento en relación con los controles, pero sin diferencia en la FEVI. Hasta los 18 meses, se encontró que la terapia celular era segura, sin diferencia en los resultados adversos entre los dos grupos y que mejoró



significativamente la clase funcional de la NYHA y de la Sociedad Canadiense de Cardiología (CCS, por sus siglas en inglés), los equivalentes metabólicos y el consumo máximo de oxígeno, en el grupo tratado.

Las MSC alogénicas en lugar de las autólogas también han sido recientemente evaluadas como una nueva estrategia terapéutica potencial para permitir una mayor facilidad logística. Las MSC son capaces de eludir la detección inmunológica, lo que significa que estos pacientes no requieren inmunosupresión. El primer estudio aleatorizado controlado en humanos fase I que comparó las MSC alogénicas con placebo, en el marco del primer IAM y disfunción del VI, incluyó a 53 pacientes<sup>41</sup>. Algo importante, el estudio demostró que no hubo diferencias respecto a episodios adversos, nuevas hospitalizaciones o arritmias entre los grupos. A los 18 meses, el grupo de tratamiento mostró una mejoría significativa de la FEVI en relación con los controles. Los resultados preliminares de un ensayo aleatorizado y controlado de fase II que evaluó MSC alogénicas en el contexto de la insuficiencia cardíaca isquémica fueron presentados en las Sesiones Científicas de la AHA en 2011<sup>22</sup>. El estudio consistió en 60 pacientes con 12 meses de seguimiento y confirmó la seguridad de la tecnología. Si bien no hubo diferencia en la FEVI entre los dos grupos, hubo una incidencia significativamente menor de complicaciones cardíacas importantes, mortalidad y síntomas en el grupo tratado, lo cual apoya el concepto de que la FEVI no es un marcador secundario útil para el resultado.

La atractiva oportunidad de explotar las células madre cardíacas, que son capaces de regenerar tejido cardíaco sano, se percibió al descubrir que el corazón adulto contiene su propio depósito de células progenitoras. Existen dos poblaciones principales de células madre cardíacas que se han descrito, la población c-kit+ y las células derivadas de cardioesferas, que son una mezcla natural de subpoblaciones celulares derivadas del corazón que incluyen c-kit+/CD90- y MSCs c-kit-/CD90 cardíacas. Aunque no se sabe si éstas resultarán ventajosas con respecto a otros tipos de células madre, particularmente si actúan de una manera paracrina, ambas poblaciones se han estudiado en el contexto clínico.

El ensayo SCIPPIO (células madre cardíacas en pacientes con miocardiopatía isquémica) publicado recientemente, es un ensayo fase I realizado primeramente en humanos que evaluó el valor de c-kit+ CSC en la insuficiencia cardíaca isquémica posterior a la

revascularización miocárdica quirúrgica (CABG, por sus siglas en inglés)<sup>42</sup>. Aquí, células c-kit+ autólogas del apéndice auricular se aíslan y expanden en el momento de la CABG y se reinfunden de 3-4 meses después de la cirugía. Es importante destacar que no hubo diferencia en la tasa de episodios adversos entre los grupos de tratamiento y control. A los 8 meses, hubo una mejoría significativa en el tamaño del infarto y la FEVI en los pacientes tratados. El ensayo CADUCEUS (células madre autólogas derivadas de cardioesferas para revertir la disfunción ventricular) evaluó, en un ensayo clínico fase I<sup>43</sup>, el impacto de la infusión intracoronaria de células autólogas derivadas de cardioesferas, obtenidas por biopsias endomiocárdicas en pacientes de 2-3 meses post-IAM. Aquí, la FEVI mejoró significativamente a los 12 meses en comparación con los controles, y mediante la resonancia magnética cardíaca (RMC) se notó una reducción importante de la masa de la cicatriz en el grupo tratado pero no en el control. No hubo ninguna diferencia en el resultado adverso entre los grupos. Es importante destacar que este es uno de los primeros ensayos de la terapia celular que sugiere que los beneficios observados en relación con la reparación del miocardio se deben a un proceso regenerativo. Los resultados de un ensayo de fase II serán esperados con entusiasmo.

Aunque el objetivo final de la terapia celular es restaurar la función cardíaca y de ese modo mejorar la calidad de vida y la supervivencia, el mecanismo por el cual esto se consigue mediante la terapia celular sigue siendo un tema de debate, en dependencia del tipo de células empleadas. Sin embargo, esta área de investigación ha conducido a una mejor comprensión de cómo trabajar las células *in vitro* para diferenciarlas en un fenotipo que podría mejorar la reparación cardíaca. Los primeros resultados de este enfoque en los seres humanos se han publicado recientemente. En el ensayo C-Cure, los investigadores han realizado la diferenciación de CMN-MO en linajes específicos de células progenitoras cardíacas utilizando proteínas de cardiogénesis antes de la transferencia de células, a través de la vía transendocárdica<sup>44</sup>, a 45 pacientes con insuficiencia cardíaca isquémica. A los 6 meses de seguimiento, se observó una mejoría significativa de la FEVI y la reducción de los volúmenes del VI, así como una mejoría significativa de los síntomas, evidenciada por el test de marcha de 6 min en el grupo tratado comparado con el grupo control. No hubo diferencias significativas respecto a resultados adversos. La segun-

da fase de este ensayo está en curso.

## RESUMEN

Las investigaciones en terapia celular ofrecen la perspectiva de un enfoque terapéutico totalmente nuevo en Cardiología. Los últimos 2 años han sido testigos de un movimiento sistemático desde la fase I a la fase II de los ensayos clínicos, utilizando tipos de células establecidos, junto con la aparición de nuevos tipos celulares en ensayos de fase I, que solamente se han hecho viables debido a las investigaciones realizadas con una temprana aplicación en los seres humanos. Para el enfoque pragmático de la terapia celular derivada de la médula ósea, un meta-análisis reciente confirmó una vez más el potencial de beneficio, lo cual se abordará en un estudio de resultados en fase III que también estandarizará la técnica de procesamiento y administración celular. Otros tipos de células tendrán que seguir un camino de investigación similar y, sin duda, los ensayos con células derivadas de la médula ósea fijarán las normas por las que serán juzgadas diferentes tipos de células y técnicas.

**Agradecimientos:** A *NIHR Cardiovascular Biomedical Research Unit* con sede en *Barts Health NHS Trust*.

**Colaboradores:** DJ y FC contribuyeron por igual a la redacción de este manuscrito. El concepto y la idea, así como la edición estuvo a cargo de AM.

**Conflicto de intereses:** Ninguno.

## Procedencia y revisión por pares

**En Heart:** Por encargo, revisado por pares internamente.

**En CorSalud:** Por invitación de la *ESC Editors' Network* (Red de Editores de la Sociedad Europea de Cardiología). Sin revisión.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Poss KD, Wilson LG, Keating MT. Heart regeneration in zebrafish. *Science* 2002;298:2188-90.
2. Jopling C, Sleep E, Raya M, *et al.* Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature* 2010;464:606-9.
3. Kikuchi K, Holdway JE, Werdich AA, *et al.* Primary contribution to zebrafish heart regeneration by gata4(+) cardiomyocytes. *Nature* 2010;464:601-5.
4. Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, *et al.* Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science* 2011;331:1078-80.
5. Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, *et al.* Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* 2010;142:375-86.
6. Efe JA, Hilcove S, Kim J, *et al.* Conversion of mouse fibroblasts into cardiomyocytes using a direct reprogramming strategy. *Nat Cell Biol* 2011;13:215-22.
7. Oh Y, Wei H, Ma D, *et al.* Clinical applications of patient-specific induced pluripotent stem cells in cardiovascular medicine. *Heart* 2012;98:443-9.
8. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663-76.
9. Okita K, Nagata N, Yamanaka S. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Circ Res* 2011;109:720-1.
10. Vieira JM, Riley PR. Epicardium-derived cells: a new source of regenerative capacity. *Heart* 2011;97:15-19.
11. Smart N, Bollini S, Dube KN, *et al.* De novo cardiomyocytes from within the activated adult heart after injury. *Nature* 2011;474:640-4.
12. Glass C, Singla DK. MicroRNA-1 transfected embryonic stem cells enhance cardiac myocyte differentiation and inhibit apoptosis by modulating the PTEN/Akt pathway in the infarcted heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;301:H2038-49.
13. Jakob P, Landmesser U. Role of microRNAs in stem/progenitor cells and cardiovascular repair. *Cardiovasc Res* 2012;93:614-22.
14. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, *et al.* Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001;410:701-5.
15. Lovell MJ, Mathur A. Cardiac stem cell therapy: progress from the bench to bedside. *Heart* 2010;96:1531-7.
16. Clifford DM, Fisher SA, Brunskill SJ, *et al.* Stem cell treatment for acute myocardial infarction. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;2:CD006536.
17. Martin-Rendon E, Brunskill SJ, Hyde CJ, *et al.* Autologous bone marrow stem cells to treat acute myocardial infarction: a systematic review. *Eur Heart J* 2008;29:1807-18.
18. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, *et al.* Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised con-

- trolled clinical trial. *Lancet* 2004;364:141-8.
19. Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, et al. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: 5-year follow-up from the randomized-controlled BOOST trial. *Eur Heart J* 2009;30:2978-84.
  20. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, et al. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006;355:1210-21.
  21. Assmus B, Rolf A, Erbs S, et al. Clinical outcome 2 years after intracoronary administration of bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *Circ Heart Fail* 2010;3:89-96.
  22. 2011 AHASS. Late-breaking clinical trial/clinical science: special reports abstracts. *Circulation* 2011;124:2365-75.
  23. Beitnes JO, Hopp E, Lunde K, et al. Long-term results after intracoronary injection of autologous mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction: the ASTAMI randomised, controlled study. *Heart* 2009;95:1983-9.
  24. Yousef M, Schannwell CM, Kostering M, et al. The BALANCE Study: clinical benefit and long-term outcome after intracoronary autologous bone marrow cell transplantation in patients with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2009;53:2262-9.
  25. Hirsch A, Nijveldt R, van der Vleuten PA, et al. Intracoronary infusion of mononuclear cells from bone marrow or peripheral blood compared with standard therapy in patients after acute myocardial infarction treated by primary percutaneous coronary intervention: results of the randomized controlled HEBE trial. *Eur Heart J* 2011;32:1736-47.
  26. Traverse JH, Henry TD, Ellis SG, et al. Effect of intracoronary delivery of autologous bone marrow mononuclear cells 2 to 3 weeks following acute myocardial infarction on left ventricular function: the LateTIME randomized trial. *JAMA* 2011;306:2110-9.
  27. Traverse JH, Henry TD, Vaughan DE, et al. Rationale and design for TIME: a phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled pilot trial evaluating the safety and effect of timing of administration of bone marrow mononuclear cells after acute myocardial infarction. *Am Heart J* 2009;158:356-63.
  28. Suarder D, Schwitter J, Moccetti T, et al. Cell-based therapy for myocardial repair in patients with acute myocardial infarction: rationale and study design of the SWISS multicenter Intracoronary Stem cells Study in Acute Myocardial Infarction (SWISS-AMI). *Am Heart J* 2010;160:58-64.
  29. Miettinen JA, Ylitalo K, Hedberg P, et al. Determinants of functional recovery after myocardial infarction of patients treated with bone marrow-derived stem cells after thrombolytic therapy. *Heart* 2010;96:362-7.
  30. Reffelmann T, Konemann S, Kloner RA. Promise of blood- and bone marrow-derived stem cell transplantation for functional cardiac repair: putting it in perspective with existing therapy. *J Am Coll Cardiol* 2009;53:305-8.
  31. Roncalli J, Mouquet F, Piot C, et al. Intracoronary autologous mononucleated bone marrow cell infusion for acute myocardial infarction: results of the randomized multicenter BONAMI trial. *Eur Heart J* 2011;32:1748-57.
  32. Grajek S, Popiel M, Gil L, et al. Influence of bone marrow stem cells on left ventricle perfusion and ejection fraction in patients with acute myocardial infarction of anterior wall: randomized clinical trial: impact of bone marrow stem cell intracoronary infusion on improvement of microcirculation. *Eur Heart J* 2010;31:691-702.
  33. Strauer BE, Yousef M, Schannwell CM. The acute and long-term effects of intracoronary stem cell transplantation in 191 patients with chronic heart failure: the STAR-heart study. *Eur J Heart Fail* 2010;12:721-9.
  34. Perin EC, Silva GV, Henry TD, et al. A randomized study of transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells and cell function analysis in ischemic heart failure (FOCUS-HF). *Am Heart J* 2011;161:1078-87.e3.
  35. Hu S, Liu S, Zheng Z, et al. Isolated coronary artery bypass graft combined with bone marrow mononuclear cells delivered through a graft vessel for patients with previous myocardial infarction and chronic heart failure: a single-center, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *J Am Coll Cardiol* 2011;57:2409-15.
  36. Seth S, Bhargava B, Narang R, et al. The ABCD (Autologous Bone Marrow Cells in Dilated Cardiomyopathy) trial a long-term follow-up study. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:1643-4.
  37. Losordo DW, Henry TD, Davidson C, et al. Intramyocardial, autologous CD34+ cell therapy for re-

- fractory angina. *Circ Res* 2011;109:428-36.
38. Chih S, Macdonald PS, McCrohon JA, *et al.* Granulocyte colony stimulating factor in chronic angina to stimulate neovascularisation: a placebo controlled crossover trial. *Heart* 2012;98:282-90.
39. Houtgraaf JH, den Dekker WK, van Dalen BM, *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.
40. Perin EC SPL, Ruiz R, Perez-Cano R, *et al.* Abstract 17966: first in man transendocardial injection of autologous adipose-derived stem cells in patients with non revascularizable ischemic myocardium (PRECISE). *Circulation* 2010;122: A17966.
41. Hare JM, Traverse JH, Henry TD, *et al.* A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:2277-86.
42. Bolli R, Chugh AR, D'Amario D, *et al.* Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet* 2011;378:1847-57.
43. Makkar RR, Smith RR, Cheng K, *et al.* Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet* 2012;379: 895-904.
44. Bartunek J, Wijns W, Dolatabadi D, *et al.* C-CURE Multicenter trial: lineage specific bone marrow derived cardiopoietic mesenchymal stem cells for treatment of ischaemic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2011;57:E200.

## **Almanac 2012: Cell therapy in cardiovascular disease. The National Society Journals present selected research that has driven recent advances in Clinical Cardiology**

**Anuario 2012: La terapia celular en la enfermedad cardiovascular. Las revistas de las Sociedades Nacionales presentan una selección de las investigaciones que han impulsado avances recientes en Cardiología Clínica**

Daniel A Jones<sup>a,b,c</sup>, Fizzah Choudry<sup>a,c</sup> y Anthony Mathur<sup>a,b,c</sup>✉

<sup>a</sup> Department of Cardiology, London Chest Hospital. London, UK.

<sup>b</sup> Department of Clinical Pharmacology, William Harvey Research Institute, Queen Mary University. London, UK.

<sup>c</sup> NIHR Cardiovascular Biomedical Research Unit, London Chest Hospital. London, UK.

*Este artículo también está disponible en español*

### ARTICLE INFORMATION

Received (Heart): March 19<sup>th</sup> 2012

Revised (Heart): June 7<sup>th</sup> 2012

Accepted (Heart): June 8<sup>th</sup> 2012

Received (CorSalud): October 20<sup>th</sup> 2012

Accepted (CorSalud): October 21<sup>st</sup> 2012

*This article was first published in Heart [2012;98(22):1626-31. doi: 10.1136/heartjnl-2011-301540. Published Online First: September 2, 2012] and is republished with permission, and in agreement with the author and the ESC Editors' Network. It is a simultaneous publication in all the National Cardiac Society Journals of the European Society of Cardiology, and other selected journals.*

### ABSTRACT

The rapid translation from bench to bedside that has been seen in the application of regenerative medicine to cardiology has led to exciting new advances in our understanding of some of the fundamental mechanisms related to human biology. The first generation of cells used in phase I-II trials (mainly bone marrow

mononuclear cells) are now entering phase III clinical trials with the goal of producing a cell based therapeutic that can change the outcome of cardiac disease. First generation cell therapy appears to have addressed safety concerns as well as showing 'activity' in numerous published meta-analyses. With the knowledge gained to date, the field is moving towards the next generation of cells-the 'engineered' cell-that have been developed to display a phenotype that will further enhance the myocardial repair/salvage process. This almanac review covers the latest basic research that may soon have application to humans as well as the results of the latest clinical trials.

✉ A Mathur

Department of Cardiology, London Chest Hospital

Bonner Road, Bethnal Green

London E2 9JX, UK;

E-mail address: a.mathur@qmul.ac.uk

**Key words:** Tissue Therapy, Cell Therapy, Cardiovascular Diseases

## RESUMEN

La rápida puesta en práctica de la investigación de transferencia que se ha visto en la aplicación de la medicina regenerativa a la cardiología ha dado lugar a interesantes avances en nuestra comprensión de algunos de los mecanismos fundamentales relacionados con la biología humana. La primera generación de células utilizadas en ensayos fase I-II (principalmente células mononucleares de la médula ósea), están entrando ahora en la fase III de los ensayos clínicos, con el objetivo de producir una estrategia terapéutica basada en células que puedan cambiar el pronóstico

de la enfermedad cardíaca. La primera generación de terapia celular parece haber abordado las preocupaciones de seguridad, y mostró "actividad" en numerosos meta-análisis publicados. Con los conocimientos adquiridos hasta el momento, esta disciplina se está moviendo hacia la próxima generación de células -las células modificadas-, que se han desarrollado para mostrar un fenotipo que mejorará aún más el proceso de reparación/rescate del miocardio. Este anuario cubre las últimas investigaciones básicas que pueden tener aplicación en los seres humanos próximamente, así como los resultados de los últimos ensayos clínicos. **Palabras Clave:** Terapia Tisular, Terapia Celular, Enfermedades Cardiovasculares

---

## UPDATE ON CELL THERAPY FOR THE TREATMENT OF CARDIOVASCULAR DISEASE

Cell therapy is one of the most important 'new horizons' in cardiovascular disease. It offers new opportunities to develop therapeutics that could revolutionise the way we treat patients and a field of research that combines an increased understanding of the pathophysiology of the cardiovascular disease with some of the most basic biological concepts involved in embryology. The resultant growth of preclinical research in the cardiovascular system and the rapid translation into humans have led to benefits for human biology as a whole. The field is rapidly advancing; here, we present key developments in the last 2 years. In order to reflect the synergy between basic and translational research, this review is therefore divided into two sections.

### BASIC SCIENCE UPDATE ON CELL THERAPY IN CARDIOVASCULAR DISEASE

#### *New models enhancing our understanding of regeneration*

##### Zebrafish

There is a long history of research on amphibian heart

regeneration with the most adopted model the zebrafish given its substantial regenerative capacity and amenability to genetic manipulation. The zebrafish heart fully regenerates after the surgical amputation of the cardiac apex: an injury that corresponds to a loss of approximately 20% of the total ventricular mass<sup>1</sup>. Initial experiments suggested that undifferentiated progenitor cells were the principal source of regenerating cardiomyocytes in zebrafish; however, two recent gene mapping studies clearly demonstrate that preexisting committed cardiomyocytes are instead the main source<sup>2,3</sup>. These two groups independently generated transgenic zebrafish in which the cardiomyocyte-specific *cm1c2* (also known as *myl7*) promoter drives the expression of tamoxifen-inducible Cre recombinase. These animals were crossed with a reporter line in which Cre-mediated excision of a *loxP*-flanked stop sequence induces constitutive expression of green fluorescent protein (GFP). In the offspring of this cross, all pre-existing cardiomyocytes and their progeny were induced to express GFP by tamoxifen treatment. Therefore, if the regenerated myocardium was derived from undifferentiated progenitor cells, the new ventricular apex should be GFP<sup>-</sup>. Instead, both groups found that the vast majority of the newly regenerated cardiomyocytes were GFP<sup>+</sup>, suggesting that the heart regeneration in zebrafish is principally mediated by the proliferation of pre-existing cardiomyocytes. This

is contrary to the previously held belief that the generation of new cardiomyocytes from stem cells was the underlying aetiology.

### **Mice versus zebrafish**

Although they lack the regenerative capacity of the zebrafish heart, postnatal mammalian hearts also undergo a degree of cardiomyocyte renewal during normal ageing and disease. Recently, a study<sup>4</sup> showed that the differences between mammalian and fish hearts may not necessarily apply early in development. Using approaches from the zebrafish model, the authors resected the left ventricular (LV) apex of 1-day-old neonatal mice and observed a brisk regenerative response similar to that in the adult zebrafish. By 3 weeks after injury, the defect had been replaced by normal myocardial tissue, which showed normal contractile function by 8 weeks. Genetic fate-mapping studies indicated that this regeneration was mediated by the proliferation of pre-existing cardiomyocytes, again as in the zebrafish. Notably, this regenerative capacity was not observed in 7-day-old mice, suggesting that its loss may coincide with cardiomyocyte binucleation and reduced cell-cycle activity. Nonetheless, this study indicates that zebrafish-like regenerative mechanisms are latent in mammalian hearts. It also provides a genetically tractable model for dissecting the blocks to these mechanisms in the mammalian adult.

### ***Alternative sources of cardiomyocytes: new concepts and advanced understanding***

#### **Fibroblasts as source of cardiomyocytes**

It has recently been demonstrated that fibroblasts in infarcts could potentially be reprogrammed directly to cardiomyocytes. Fifteen years ago, researchers showed that fibroblasts could be differentiated into skeletal muscle *in vitro* or in the injured heart by overexpressing the gene encoding the myogenic transcription factor, MyoD. However, despite extensive work, no comparable master gene for cardiac muscle was found, and interest in reprogramming waned. Spurred by the discovery of induced pluripotent stem

cells (iPSCs), scientists have now returned to this field, using combinations of transcription factors to reactivate core transcriptional networks of desired cell types. In the last 2 years, two groups have made progress to this goal. The first group<sup>5</sup> screened a total of 14 cardiac transcription factors finding that a specific combination of three transcription factors, Gata4, Mef2c and Tbx5, was sufficient to generate functional beating cardiomyocytes directly from mouse postnatal cardiac or dermal fibroblasts and that the induced cardiomyocytes were globally reprogrammed to adopt a cardiomyocyte-like gene expression profile. These factors activated the transgene in 20% of fibroblasts of which approximately 4% of the cells expressed endogenous sarcomeric proteins such as cardiac troponin T, with ~1% showing functional properties such as spontaneous beating. Thus, most of the cells were only partially reprogrammed, although their global gene expression patterns had shifted markedly from fibroblast to cardiomyocyte.

The second group<sup>6</sup> used a different method of reprogramming mouse embryonic fibroblasts to cardiomyocytes. They used the 'Yamanaka factors'—OCT4 (also known as POU5F1), SOX2, KLF4 and c-MYC—to initiate reprogramming, but then blocked signalling through the JAK—STAT pathway, which is required for pluripotency in the mouse, and added the cardiogenic factor BMP4. These modifications yielded minimal generation of iPSCs, but instead activated the cardiac progenitor programme and, within 2 weeks, generated substantial numbers of beating colonies. By 18 days after induction, approximately 40% of the cells expressed cardiac troponin T. It should be noted that this study used mouse embryonic fibroblasts, whereas Leda *et al*<sup>5</sup> principally used postnatal mouse cardiac fibroblasts. Reprogramming the scar-forming fibroblast to a cardiomyocyte is appealing, particularly if it can be done directly in the infarct. To succeed clinically, we need to know how normal these reprogrammed cardiomyocytes are, and the process will have to be much more efficient and transgene-free.

#### **Induced pluripotent stem cells**

A recent report in this journal drew attention to the great promise of iPSC (reprogrammed somatic cells) as a renewable source of autologous cells<sup>7</sup>. These cells

were first discovered only 5 years ago by Takahashi and Yamanaka<sup>8</sup> following the introduction of genes into adult mouse cells reprogramming them to resemble embryonic stem (ES) cells. Given that the DNA of such cells is identical to that of the patient, it has been assumed that they would not be attacked by the immune system although their immunogenicity has not been vigorously examined. However, a study<sup>9</sup> published in *Nature* in 2011 showed that in a mouse transplantation model, some iPS cells are indeed immunogenic, raising concerns about their therapeutic use. This study examined the immunogenicity of mouse iPS cells, using a teratoma-formation assay. They injected iPS cells into mice that were either immune-compromised or genetically matched with the donor cells. This normally results in the formation of benign tumours called teratomas, which consist of many types of differentiated cells. The approach was validated using a line of genetically matched (autologous) ES cells which gave rise to teratomas, whereas a line of unmatched ES cells was rejected before teratomas were produced. The transplantation of autologous iPS cells derived from fetal fibroblasts into matched mice resulted in the rejection of teratomas, irrespective of the approach used to generate the iPS cells, indicating that, in this assay, matched iPS cells are more immunogenic than matched ES cells.

The study also identified the antigens that may have caused immune rejection of the iPS cells, discovering a group of nine genes that were expressed at abnormally high levels. Inducing the expression of three of these genes (*Hormad1*, *Zgl6* and *Cyp3a11*) in the non-immunogenic ES cells significantly impaired the cells' ability to form teratomas on transplantation into genetically matched mice. This study provides more questions than answers with many limitations in relation to clinical studies; however, it highlights that a great deal needs to be understood about the mechanisms underlying cellular reprogramming and the inherent similarities and differences between ES cells and iPS cells.

#### **Adjunctive therapies to improve stem cell differentiation**

As a related spin-off to cell therapy, two new approaches to cardiac repair have been reported.

#### **Thymosin $\beta$ 4**

One of the most exciting developments in regenerative medicine over the past 2 years has been the identification of 'bona fide source of myocardial progenitors' (epicardial derived cells)<sup>10</sup> which can be induced by thymosin  $\beta$ 4 to differentiate into cardiomyocytes. This landmark study by Smart *et al*<sup>11</sup> provides a major step forward in identifying a viable source of stem/progenitor cells that could contribute to new muscle after ischaemic heart disease and acute myocardial infarction (AMI). They demonstrated that in a mouse model the adult heart contains a resident progenitor cell population, which has the potential to become terminally differentiated cardiomyocytes after MI. Progenitor cells were primed with a peptide called thymosin  $\beta$ 4 which induced embryonic reprogramming resulting in the mobilisation of this population and subsequent differentiation to give rise to de novo cardiomyocytes. Following experimentally induced MI, these cells were shown to migrate to the site of injury and then differentiate without any evidence of cellular fusion into structurally and functionally active cardiomyocytes. These cardiomyocytes showed evidence of gap junction formation with adjacent cells, synchronous calcium transients and the formation of operational contractile apparatus. Despite a low overall fraction of these cells being present at the site of injury and a relatively poor overall efficiency of differentiation, serial MRI scans revealed significant improvements in ejection fraction, cardiac volumes and scar size in comparison with sham treated animals. The pretreatment with thymosin  $\beta$ 4 was crucial to these effects and may suggest a new strategy for promoting myocardial repair in humans.

#### **MicroRNAs**

MicroRNAs (small non-coding RNAs) play a critical role in differentiation and self-renewal of pluripotent stem cells, as well as in the differentiation of cardiovascular lineage cells. As a result, microRNAs have emerged as potential modulators of stem cell differentiation; specifically, miR-1 has been reported to play an integral role in the regulation of cardiac muscle progenitor cell differentiation. A study published in 2011<sup>12</sup> looked to take this one step further and assessed whether the



overexpression of miR-1 in ES cells (miR-1-ES cells) enhances cardiac myocyte differentiation following transplantation into the infarcted myocardium. In this study, mice models of MI had miR-1-ES cells, ES cells or culture medium (control) transplanted into the border zone of the infarcted heart. Overexpression of miR-1 in transplanted ES cells protected host myocardium from MI-induced apoptosis through activation of p-AKT and inhibition of caspase-3, phosphatase and tensin homologue, and superoxide production. A significant reduction in interstitial and vascular fibrosis was quantified in miR-1-ES cells compared with control MI. Finally, mice receiving miR-1-ES cells had significantly improved heart function compared with respective controls. This would suggest that miR-1 drives cardiac myocyte differentiation from transplanted ES cells and inhibits apoptosis post-MI; however, importantly with respect to fibrosis no statistical significance between miR-1-ES cell and ES cell groups was observed suggesting further study in this area is needed. A review<sup>13</sup> of the current evidence for the role of microRNAs in stem/progenitor cells and cardiovascular repair has recently been published.

#### **CLINICAL UPDATE ON CELL THERAPY IN CARDIOVASCULAR DISEASE**

The translational path from preclinical observation to new treatment development can take many years, even decades. Ten years after the first clinical application of stem cells in cardiac disease<sup>14</sup>, many questions regarding cell types and their administration have been addressed and researchers are better understanding this area of research and the challenges of translational medicine.

Although many candidate cell types for myocardial repair exist, a pragmatic approach has been used in clinical trials which have utilised autologous bone marrow mononuclear cells (BMMNCs) and some of the component cell types found therein (haematopoietic stem cells, mesenchymal stem cells (MSCs) and endothelial progenitor cells) in the first steps into the clinical setting<sup>15</sup>. Recent years have seen several phase I-II clinical trials of BMMNC transplantation in cardiac disease which have demonstrated safety and feasibility while reports of efficacy, although less consistent, have provided grounds for further investigation.

#### **RECENT DEVELOPMENTS IN THE USE OF AUTOLOGOUS BMMNCs**

The last 2 years has seen the some of the larger trials examining BMMNCs in the setting of AMI report long-term results confirming safety to 3-5 years. Reassuringly, recent meta-analyses to look at these studies have again confirmed a small but important 'activity' of cell therapy in improving various surrogate parameters of cardiac function<sup>16,17</sup>.

The first randomised controlled trial of stem cell therapy in AMI was the BOOST trial (BOne marrOW transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) reporting a 6.7% increase in global left ventricular ejection fraction (LVEF) in the treatment group compared with a 0.7% increase in the control group at 6 months; this was attributed to improved regional systolic wall motion in the infarct zone<sup>18</sup>. The 5-year follow-up data<sup>19</sup> showed a decline in LVEF and increase in LV volumes in both groups with no significant difference in mortality or clinical end points between the groups. Interestingly, subgroup analyses suggested that in more severe infarction, defined as greater transmural, cell therapy conferred a significant benefit in LVEF and LV dimension compared with control.

The Reinfusion of Enriched Progenitor cells And Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction (REPAIR-AMI) trial is the largest randomised controlled trial in stem cell therapy for cardiac repair to date. The original study that enrolled 204 patients with AMI demonstrated a significantly greater improvement in absolute LVEF in patients treated with BMMNCs compared with control at 4 months. As seen in BOOST, the patients with larger infarcts derived the most benefit. Although not sufficiently powered for the purpose, this was the first large scale clinical endpoint data showing mortality and morbidity benefit conferred by intracoronary administration of stem cells<sup>20</sup>. This was borne out at 2 years with significant reductions in combined clinical end point and increases in LV wall motion when assessed on MRI in the patients who received BMMNCs<sup>21</sup>. The 5-year follow-up data, presented at the American Heart Association (AHA) Scientific Sessions 2011<sup>22</sup>, included 100 patients in each treatment arm. While there was only a trend towards improvement in mortality, there was a significant reduction of the combined end point of death, recurrence of MI and revascularisation conferred by a

single intracoronary infusion of cells.

Long-term follow-up data from 100 patients enrolled in the Autologous Stem-cell Transplantation in Acute Myocardial Infarction (ASTAMI) trial showed a significant improvement in exercise capacity in the treated cohort at 3 years, although there was no significant difference in LVEF between treatment and placebo arms<sup>23</sup>. The 5-year follow-up for the 'BALANCE' study (Clinical Benefit and Long-Term Outcome After Intracoronary Autologous Bone Marrow Cell Transplantation in Patients With Acute Myocardial Infarction) showed significant and sustained improvement in LV function and reduction in mortality in 62 treated patients compared with 62 control patients. Although this suggests a significant mortality benefit, it is noted that this study was non-randomised<sup>24</sup>. Another large trial (HEBE) consisting of 200 patients has also been published recently<sup>25</sup> showing no significant improvement in LV function in BMMNC treated patients compared with placebo up to 4 months; however, the long-term effects of cell therapy in this study are yet to be reported.

The majority of these studies are in the context of cell administration 5-8 days following AMI. There is still a need to define the optimal time point for cell transfer relative to ischaemic insult. It is conceivable that the improvement in LV function and outcome seen inconsistently between trials may be dependent on the timing of cell transfer as the postinfarct myocardium will have a changing inflammatory milieu. The later time point of 2-3 weeks post-AMI is addressed by the recent LateTIME study<sup>26</sup>. Here, the authors found that in 87 patients randomised to either BMMNCs or control, BMMNC treatment at the given time point did not improve either global LVEF or regional wall motion at 6 months. Although the likelihood is that day 5-7 is the optimal time for delivery of cell therapy post-AMI, not all time points have been investigated. The ongoing trials TIME<sup>27</sup> and SWISS-AMI<sup>28</sup> aim to evaluate the timing of injection further. As yet, the only time point that has not been considered is the very early phase (<12 h post-revascularisation). The REGENERATE-AMI clinical trial (EUDRACT 2007-002144-16) in which BMMNCs are transferred approximately 6 h post-PCI is over halfway through recruitment and will report in 2013.

There is now a need to better define those patients who will benefit from cell therapy. The results of the 5-year follow-up from the BOOST and REPAIR-AMI

trials suggest that if ejection fraction is used as a surrogate end point, while the overall effect may be modest for all-comers, subgroups with a large functional deficit at baseline do experience clinically meaningful increments in LVEF. This is further substantiated by the FINCELL substudy<sup>29</sup> in which 78 patients received either BMMNCs or placebo post-thrombolysis and PCI for AMI. Here, a significantly greater BMMNC associated improvement in LV function was observed in patients with baseline LVEF below the median for the group.

Despite the heterogeneity of trial results described, the largest meta-analysis to date comprising 1765 patients and 33 randomised controlled trials demonstrates a modest but significant improvement in LVEF of 2.87% in short-term follow-up, with sustained LVEF improvement of 3.75% after follow-up over 1 year<sup>16</sup> suggesting that adjunctive stem cell treatment in AMI offers an improvement over conventional therapy. These effects while modest are comparable with those seen in landmark studies of primary angioplasty, ACE inhibitors and  $\beta$ -blockers<sup>30</sup> and suggest that a similar additional mortality benefit may be achieved. The majority of trials in this field to date use LVEF as a surrogate clinical end point with little understanding of how this parameter relates to outcome.

Recently, two trials of BMMNCs in AMI have been published attempting to explore alternative surrogate end points. The aim of the 'Bone Marrow in Acute Myocardial Infarction (BONAMI)' was to assess the effect on myocardial variability at 3 months recruiting 101 patients with poor LV function post-AMI to receive BMMNCs or placebo. Myocardial viability was significantly improved in the treated group compared with control<sup>31</sup>. In another trial<sup>32</sup>, LVEF was assessed alongside myocardial perfusion in a similar patient cohort up to 12 months. A small improvement in myocardial perfusion was observed in the BMMNC group compared with control; there was however a significantly lower incidence of combined major adverse cardiac events in the treatment group, highlighting again an ill-defined relationship between potential surrogate markers and hard clinical outcome measures.

One of the most important developments to date is the move from phase II to phase III clinical trials. The majority of the current clinical trials have been designed to assess safety and feasibility only, and being underpowered to assess efficacy of the tech-

nology use surrogate markers such as LVEF to assess activity. In order to address this issue, the EU funding programme recently awarded a consortium composed of 17 clinical centres across Europe €6 million to design and conduct the definitive outcome study of BMMNC in AMI (BAMI; <http://www.bami-fp7.eu>). BAMI will enrol 3000 patients with the primary end point as all-cause mortality making it one of the most exciting developments in the field for several years. The study will be reported in 5 years.

### **Cell therapy for chronic LV disease**

El The STAR-heart study is the largest reported experience of BMMNCs in ischaemic heart failure and reported its 5-year follow-up data in 2010<sup>33</sup>. The non-randomised study originally recruited 391 patients with an LVEF of 35% or less who were offered intracoronary administration of autologous BMMNCs. In all, 191 patients received cell therapy and 200 patients received best medical treatment alone. At 5-year follow-up, there were significant improvements in LVEF, contractility, oxygen uptake and exercise tolerance in patients treated with BMMNCs associated with perhaps more interestingly a significantly lower death rate than the control group. This requires confirmation in a double-blinded randomised study. The FOCUS-HF trial<sup>34</sup> is a randomised controlled trial of 30 patients designed to evaluate the effects of transcatheter delivery of BMMNCs in patients with chronic ischaemic heart failure with no option for further revascularisation. At 6 months, although there was no difference in LVEF between the treated and placebo groups, cell therapy was found to significantly improve symptoms and quality of life scores and in subgroup analysis oxygen uptake in patients who were 60 years and younger. Another recent study<sup>35</sup> assessed the effect of cell therapy as an adjunct to bypass surgery (coronary artery bypass graft (CABG)) in patients with ischaemic heart failure undergoing CABG. An impressive increase in LVEF and reduction in LV dimensions in the BMMNC group were reported at 6-month follow-up.

Long-term data from the first randomised controlled trial of BMMNCs in dilated cardiomyopathy (Autologous Bone marrow Cells in Dilated cardiomyopathy (ABCD) trial) were reported in 2010<sup>36</sup>. In the 41

patients followed to 3 years, there was a significant improvement in LVEF in the treatment group, greater in patients with the New York Heart Association (NYHA) class 3 symptoms compared with NYHA class 4 suggesting improvement in patients was greater in those with less severely damaged myocardium. There was also an associated symptomatic improvement but no mortality benefit was shown. Trials of BMMNCs in non-ischaemic cardiomyopathy are ongoing.

### **Translation of other cell types into the clinical setting**

Another major development in the last 2 years has been the move towards clinical translation of different cell populations and a search for the optimal cell type for cardiac repair with a number of first-in-human trials.

Circulating/mobilised haemopoietic stem cells identified most commonly by markers CD34 and CD133 have been investigated as potential candidate populations in cardiac repair. These cell populations can either be fractionated from BMMNC or mobilised into the circulation using pharmacological agents such as Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF). CD34 cells contain more endothelial lineage determined cells and have been previously evaluated in both AMI and refractory angina. The Autologous Cellular Therapy CD34 in Chronic Myocardial Ischemia (ACT-CMI) investigators have recently reported on a large phase II trial evaluating intramyocardial injection of low and high dose autologous peripherally mobilised CD34 cell therapy against placebo in 167 patients with refractory angina. There was found to be a significant improvement in angina frequency and exercise tolerance in the low dose group compared with placebo at 6 and 12 months. There was also an increased mortality in the placebo arm<sup>37</sup>. In contrast, Chih *et al* report that despite mobilisation of CD34 and CD34/CD133 cells using G-CSF, no improvement in angina or myocardial perfusion was observed in patients with chronic Ischaemic heart disease (IHD)<sup>38</sup>. Again, this discrepancy in the findings from these studies suggests that careful consideration to the method of delivery should be given and that intramyocardial delivery may be more effective in this type of patients.

MSCs are able to release a large range of cardio-protective paracrine factors and transdifferentiate into

a number of cell types that are involved in cardiac repair and are therefore increasingly being used in clinical trials which have shown promising results. Another advantage of MSCs is their logistical ease of access via bone marrow and adipose tissue.

The 6 month results of the first-in-human randomised controlled 14 patient trial of autologous adipose tissue derived stem and regenerative cells (ADRCs) for AMI (the Adipose- derived stem cells in the treatment of patients with ST-elevation myocardial Infarction (APOLLO) trial) have recently been reported<sup>39</sup>. All patients received either cell therapy or placebo within 24 h of primary PCI. These were first MI patients with an LVEF between 35% and 50%. At 6 months, there was a significant improvement in myocardial scar formation and perfusion defect, near significant reduction in infarct size and improvement in estimated ejection fraction with cell therapy compared with control, and the treatment proved safe. The 18 month data were presented at the 2011 International Symposium on Stem Cell Therapy & Cardiovascular Innovation and showed sustained benefits. The next step, a larger study called ADVANCE, enrolling 375 patients will give greater statistical power. Eighteen month results for a similar first-in-human trial of ARDCs for ischaemic heart failure, PRECISE, although not yet published, have been presented at the AHA Scientific Sessions 2010<sup>40</sup>. Here, 27 patients were randomised to receive transendocardial ADRCs or placebo. Results at 6 months showed a significant reduction in infarct size in the treatment group relative to the controls but with no difference in LVEF. Out to 18 months, cell therapy was found to be safe with no difference in adverse outcomes between the two groups and found to significantly improve both NYHA and Canadian cardiovascular society (CCS) class symptoms, metabolic equivalents and peak oxygen consumption, in the treatment group.

Allogeneic as opposed to autologous MSCs have also recently been evaluated as a potential novel therapeutic strategy allowing for 'off-the-shelf' logistical ease. MSCs are able to evade immune detection meaning immunosuppression is not required for these patients. The first-in-human phase I randomised controlled study comparing allogeneic MSCs with placebo in the setting of first AMI and LV dysfunction enrolled 53 patients<sup>41</sup>. Importantly, the study demonstrated no difference in adverse events, rehospitalisation or arrhythmia between the groups. At 18 months, the

treatment group conferred significant improvement in LVEF relative to controls. The preliminary results of a phase II randomised controlled trial assessing allogeneic MSCs in the setting of ischaemic heart failure were presented at the AHA Scientific Sessions 2011<sup>22</sup>. The study consisted of 60 patients with a 12 month follow-up period and confirmed safety of the technology. While there was no difference in LVEF between the two groups, there was a significantly lower incidence of major adverse cardiac events, mortality and symptoms in the treated group supporting the concept of LVEF not being a useful surrogate marker for outcome.

The attractive opportunity to exploit cardiac stem cells (CSC) which are capable of regrowing healthy heart tissue was realised with the discovery that the adult heart contains its own reservoir of progenitor cells. There are two main CSC populations that have been described, the c-kit+ population and cardiosphere-derived cells, which are a natural mix of heart derived cell subpopulations including c-kit+/CD90- and cardiac MSCs c-kit-/CD90. Although it is uncertain as to whether these will prove advantageous over other stem cell types, particularly if they act in a paracrine manner, both populations have been studied in the clinical setting.

The recently published SCIPIO trial (Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy) is a first-in-human phase I trial assessing the value of c-kit+ CSCs in ischaemic heart failure post-CABG<sup>42</sup>. Here, autologous atrial appendage c-kit+ cells are isolated and expanded at the time of CABG and re-infused 3-4 months after surgery. Importantly, there was no difference in adverse event rate between treatment and control arms. At 8 months, there was a significant improvement in infarct size and LVEF in treated patients. The CADUCEUS trial (cardiosphere-derived autologous stem cells to reverse ventricular dysfunction) assessed the impact of intracoronary infusion of autologous cardiosphere-derived cells harvested from endomyocardial biopsies in patients 2-3 months post-AMI in a phase I clinical trial<sup>43</sup>. Here, LVEF was significantly improved at 12 months compared with controls and there was a major reduction in scar mass on Cardiac magnetic resonance imaging (CMR) in the treated but not the control group. There was no difference in adverse outcome between the groups. Importantly, this is one of the first trials of cell therapy to suggest that the benefits seen in relation to myo-

cardial repair are explained by a regenerative process. The results of a phase II trial will be eagerly awaited.

Although the ultimate goal of cell therapy is to restore cardiac function and thereby improve quality of life and survival, the mechanism by which this is achieved using cell therapy continues to remain a topic of debate depending on the cell type used. This area of research has nonetheless led to a better understanding of how cells can in vitro be made to differentiate into a phenotype that may improve cardiac repair. The first results of this approach in humans have recently been published. In the C-Cure trial, the investigators have driven the differentiation of BMMNCs into lineage-specific cardiac progenitor cells using cardiogenesis proteins before cell transfer via the trans- endocardial route<sup>44</sup> to 45 patients with ischaemic heart failure. At 6 month follow-up, there was significant improvement in LVEF and reduction of LV volumes as well as significant symptomatic improvement evidenced by the 6 min walk test in the treated group compared with the control group. There were no significant differences in adverse outcome. The second phase of this trial is ongoing.

## SUMMARY

Cell therapy research offers the prospect of a completely new therapeutic approach in cardiology. The last 2 years has seen a systematic move from phase I to phase II clinical trials using established cell types together with the emergence of new cell types in phase I studies that have only become feasible due to the research that has been driven by the early translation into humans. For the pragmatic approach of bone marrow derived cell therapy, recent meta-analysis again confirms the potential for benefit and this will now be addressed in a phase III outcome study that will also standardise the technique of cell processing and administration. Other cell types will need to follow a similar path of investigation and no doubt the trials of bone marrow derived cells will set the standards by which different cell types and techniques will be judged.

**Acknowledgements:** NIHR Cardiovascular Biomedical Research Unit based at Bartshealth NHS Trust.

**Contributors:** DJ and FC contributed equally to the writing of this manuscript. The concept and idea as well as editing was undertaken by AM.

**Competing interests:** None.

## Provenance and peer review

**In Heart:** Commissioned; internally peer reviewed.

**In CorSalud:** Invited by ESC Editors' Network. Without review.

## REFERENCES

1. Poss KD, Wilson LG, Keating MT. Heart regeneration in zebrafish. *Science* 2002;298:2188-90.
2. Jopling C, Sleep E, Raya M, *et al.* Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature* 2010;464:606-9.
3. Kikuchi K, Holdway JE, Werdich AA, *et al.* Primary contribution to zebrafish heart regeneration by gata4(+) cardiomyocytes. *Nature* 2010;464:601-5.
4. Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, *et al.* Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science* 2011;331:1078-80.
5. Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, *et al.* Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* 2010;142:375-86.
6. Efe JA, Hilcove S, Kim J, *et al.* Conversion of mouse fibroblasts into cardiomyocytes using a direct reprogramming strategy. *Nat Cell Biol* 2011;13:215-22.
7. Oh Y, Wei H, Ma D, *et al.* Clinical applications of patient-specific induced pluripotent stem cells in cardiovascular medicine. *Heart* 2012;98:443-9.
8. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663-76.

9. Okita K, Nagata N, Yamanaka S. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Circ Res* 2011;109:720-1.
10. Vieira JM, Riley PR. Epicardium-derived cells: a new source of regenerative capacity. *Heart* 2011;97:15-19.
11. Smart N, Bollini S, Dube KN, *et al.* De novo cardiomyocytes from within the activated adult heart after injury. *Nature* 2011;474:640-4.
12. Glass C, Singla DK. MicroRNA-1 transfected embryonic stem cells enhance cardiac myocyte differentiation and inhibit apoptosis by modulating the PTEN/Akt pathway in the infarcted heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;301:H2038-49.
13. Jakob P, Landmesser U. Role of microRNAs in stem/progenitor cells and cardiovascular repair. *Cardiovasc Res* 2012;93:614-22.
14. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, *et al.* Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001;410:701-5.
15. Lovell MJ, Mathur A. Cardiac stem cell therapy: progress from the bench to bedside. *Heart* 2010;96:1531-7.
16. Clifford DM, Fisher SA, Brunskill SJ, *et al.* Stem cell treatment for acute myocardial infarction. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;2:CD006536.
17. Martin-Rendon E, Brunskill SJ, Hyde CJ, *et al.* Autologous bone marrow stem cells to treat acute myocardial infarction: a systematic review. *Eur Heart J* 2008;29:1807-18.
18. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, *et al.* Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 2004;364:141-8.
19. Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, *et al.* Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: 5-year follow-up from the randomized-controlled BOOST trial. *Eur Heart J* 2009;30:2978-84.
20. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, *et al.* Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006;355:1210-21.
21. Assmus B, Rolf A, Erbs S, *et al.* Clinical outcome 2 years after intracoronary administration of bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *Circ Heart Fail* 2010;3:89-96.
22. 2011 AHASS. Late-breaking clinical trial/clinical science: special reports abstracts. *Circulation* 2011;124:2365-75.
23. Beitnes JO, Hopp E, Lunde K, *et al.* Long-term results after intracoronary injection of autologous mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction: the ASTAMI randomised, controlled study. *Heart* 2009;95:1983-9.
24. Yousef M, Schannwell CM, Kostering M, *et al.* The BALANCE Study: clinical benefit and long-term outcome after intracoronary autologous bone marrow cell transplantation in patients with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2009;53:2262-9.
25. Hirsch A, Nijveldt R, van der Vleuten PA, *et al.* Intracoronary infusion of mononuclear cells from bone marrow or peripheral blood compared with standard therapy in patients after acute myocardial infarction treated by primary percutaneous coronary intervention: results of the randomized controlled HEBE trial. *Eur Heart J* 2011;32:1736-47.
26. Traverse JH, Henry TD, Ellis SG, *et al.* Effect of intracoronary delivery of autologous bone marrow mononuclear cells 2 to 3 weeks following acute myocardial infarction on left ventricular function: the LateTIME randomized trial. *JAMA* 2011;306:2110-9.
27. Traverse JH, Henry TD, Vaughan DE, *et al.* Rationale and design for TIME: a phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled pilot trial evaluating the safety and effect of timing of administration of bone marrow mononuclear cells after acute myocardial infarction. *Am Heart J* 2009;158:356-63.

- 
28. Suarnder D, Schwitter J, Moccetti T, et al. Cell-based therapy for myocardial repair in patients with acute myocardial infarction: rationale and study design of the SWISS multicenter Intracoronary Stem cells Study in Acute Myocardial Infarction (SWISS-AMI). *Am Heart J* 2010;160:58-64.
29. Miettinen JA, Ylitalo K, Hedberg P, et al. Determinants of functional recovery after myocardial infarction of patients treated with bone marrow-derived stem cells after thrombolytic therapy. *Heart* 2010;96:362-7.
30. Reffelmann T, Konemann S, Kloner RA. Promise of blood- and bone marrow-derived stem cell transplantation for functional cardiac repair: putting it in perspective with existing therapy. *J Am Coll Cardiol* 2009;53:305-8.
31. Roncalli J, Mouquet F, Piot C, et al. Intracoronary autologous mononucleated bone marrow cell infusion for acute myocardial infarction: results of the randomized multicenter BONAMI trial. *Eur Heart J* 2011;32:1748-57.
32. Grajek S, Popiel M, Gil L, et al. Influence of bone marrow stem cells on left ventricle perfusion and ejection fraction in patients with acute myocardial infarction of anterior wall: randomized clinical trial: impact of bone marrow stem cell intracoronary infusion on improvement of microcirculation. *Eur Heart J* 2010;31:691-702.
33. Strauer BE, Yousef M, Schannwell CM. The acute and long-term effects of intracoronary stem cell transplantation in 191 patients with chronic heart failure: the STAR-heart study. *Eur J Heart Fail* 2010;12:721-9.
34. Perin EC, Silva GV, Henry TD, et al. A randomized study of transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells and cell function analysis in ischemic heart failure (FOCUS-HF). *Am Heart J* 2011;161:1078-87.e3.
35. Hu S, Liu S, Zheng Z, et al. Isolated coronary artery bypass graft combined with bone marrow mononuclear cells delivered through a graft vessel for patients with previous myocardial infarction and chronic heart failure: a single-center, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *J Am Coll Cardiol* 2011;57:2409-15.
36. Seth S, Bhargava B, Narang R, et al. The ABCD (Autologous Bone Marrow Cells in Dilated Cardiomyopathy) trial a long-term follow-up study. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:1643-4.
37. Losordo DW, Henry TD, Davidson C, et al. Intramyocardial, autologous CD34+ cell therapy for refractory angina. *Circ Res* 2011;109:428-36.
38. Chih S, Macdonald PS, McCrohon JA, et al. Granulocyte colony stimulating factor in chronic angina to stimulate neovascularisation: a placebo controlled crossover trial. *Heart* 2012;98:282-90.
39. Houtgraaf JH, den Dekker WK, van Dalen BM, 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.
40. Perin EC SPL, Ruiz R, Perez-Cano R, et al. Abstract 17966: first in man transendocardial injection of autologous adipose-derived stem cells in patients with non revascularizable ischemic myocardium (PRECISE). *Circulation* 2010;122: A17966.
41. Hare JM, Traverse JH, Henry TD, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:2277-86.
42. Bolli R, Chugh AR, D'Amario D, et al. Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet* 2011;378:1847-57.
43. Makkar RR, Smith RR, Cheng K, et al. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet* 2012;379: 895-904.
-

44. Bartunek J, Wijns W, Dolatabadi D, *et al.* C-CURE Multicenter trial: lineage specific bone marrow derived cardiopoietic mesenchymal stem cells for treatment of ischaemic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2011;57:E200.