

TERAPIAS CELULARES EXPERIMENTALES PARA EL TRATAMIENTO DEL INFARTO DE MIOCARDIO: LECCIONES DE LA REGENERACIÓN Y REPARACIÓN CARDÍACA EN VERTEBRADOS NO HUMANOS

por PAUL PALMQUIST-GOMES¹, JOSÉ M. PÉREZ-POMARES², JUAN ANTONIO GUADIX²

¹UNIVERSITÉ DE PARIS, IMAGINE - INSTITUT PASTEUR, UNIT OF HEART MORPHOGENESIS, INSERM UMR1163, 75015

PARIS, FRANCE. ²DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL, FACULTAD DE CIENCIAS, UNIVERSIDAD DE MÁLAGA, INSTITUTO MALAGUEÑO DE BIOMEDICINA (IBIMA), CAMPUS DE TEATINOS S/N, 29080 MÁLAGA, ESPAÑA

Palabras clave: infarto de miocardio, terapias avanzadas, regeneración tisular, reparación tisular, modelos animales

Introducción

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en el mundo occidental (<http://www.who.int/classifications/icd>). El infarto de miocardio asociado a enfermedad coronaria es la más frecuente de las enfermedades cardiovasculares y la que conlleva una mayor mortalidad y morbilidad^[1]. Desde una perspectiva fisiopatológica, el infarto de miocardio consiste en una pérdida significativa de musculatura cardíaca como consecuencia de episodios sostenidos de isquemia que, a su vez, se asocian anomalías en el flujo circulatorio coronario (habitualmente por fenómenos de arteriosclerosis). En respuesta a la muerte masiva de cardiomiocitos, el corazón activa una respuesta reparativa que sustituye progresivamente el músculo cardíaco por una cicatriz fibrótica que altera gravemente la función cardíaca^[2].

De momento, y a pesar de que en los últimos años ha habido notables avances en los ámbitos de la farmacoterapia (trombolíticos, nuevas generaciones de beta bloqueantes, antiarrítmicos, etc), la cirugía y el uso de dispositivos de asistencia cardíaca dirigidos a compensar la pérdida de función del corazón isquémico (catéteres, marcapasos, desfibriladores implantables, válvulas artificiales y stents, entre otros)^[3], la tasa de mortalidad asociada a las enfermedades cardiovasculares continua ascendiendo. Tanto el aumento de los casos de infarto de miocardio en todo el mundo como la cronificación de la enfermedad y su tendencia natural hacia la insuficiencia cardíaca sugieren que es necesario desarrollar terapias alternativas para el tratamiento del infarto de corazón. Esta necesidad es especialmente urgente si se tienen en cuenta el limitado número de corazones disponibles para el trasplante^[4] (que es la única solución clínica a la insuficiencia cardíaca realmente viable a largo plazo)

y el enorme gasto sanitario que supone el cuidado de los enfermos de infarto de miocardio.

Fisiopatología del infarto de miocardio: de la respuesta celular local a la insuficiencia cardíaca

La consecuencia inmediata de la muerte de miocardio es la activación de una respuesta inflamatoria mediada por macrófagos residentes, respuesta que se amplifica rápidamente a través del reclutamiento de células de estirpe sanguínea, primero granulocitos y después grandes cantidades de monocitos que se infiltran en el tejido dañado y se diferencian en macrófagos^[5].

La consecuencia directa de esta respuesta inflamatoria es la eliminación de restos celulares, pero también la activación de la respuesta reparativa a la que hemos hecho referencia con anterioridad y que consiste en la activación y reclutamiento de progenitores fibroblásticos residentes^[6] a la zona de daño. Dichos fibroblastos sintetizan matriz extracelular, formando una cicatriz fibrosa que carece de capacidad contráctil y que tiende a expandirse de forma continua y crónica^[2]. Este proceso de sustitución de un tejido por otro en los ventrículos del corazón infartado recibe el nombre de remodelación ventricular y conlleva un descenso progresivo en la fracción de eyección. En los casos de infarto crónico de miocardio, la remodelación ventricular deviene con mucha frecuencia en cardiopatía dilatada isquémica y, con el paso del tiempo, en insuficiencia cardíaca^[2].

El corazón humano puede repararse, pero no regenerarse de forma espontánea

Como ya hemos indicado, tras una isquemia sostenida el músculo cardíaco que muere es sustituido

por un tejido fibroso, no muscular, que evita la ruptura de la pared ventricular. Desde una perspectiva biológica, la sustitución de un tejido determinado por otro con propiedades distintas recibe el nombre de reparación y es un fenómeno habitual en vertebrados superiores (aves y mamíferos, incluyendo el hombre). El término reparación es usado en muchos contextos, erróneamente, como sinónimo de regeneración. Es evidente que la regeneración, es decir, la reposición de un tejido muerto o no funcional por otro celular y funcionalmente idéntico al original implica mecanismos celulares y moleculares distintos a los de la reparación. Como discutiremos a lo largo de esta revisión, saber distinguir entre estas dos respuestas y entender la biología de los tipos celulares implicados es fundamental para el desarrollo de cualquier aproximación novedosa en el tratamiento del infarto de miocardio.

Modelos animales para el estudio de la regeneración cardíaca

Los procesos de regeneración tisular, que consisten en la sustitución progresiva de un tejido dañado por otro nuevo con la misma estructura y funcionalidad que el original^[7,8], se encuentran ampliamente representados en los diferentes phyla que componen el Reino Metazoa (Animales).

Estudios llevados a cabo en animales de experimentación han demostrado que, mientras algunos vertebrados amniotas de la Clase Mamíferos como los ratones, las ratas, los conejos o los perros no son capaces de regenerar el miocardio adulto dañado^[9,10,11], distintas especies de vertebrados anamniotas como la carpa dorada^[12], el pez cebra^[13], el ajolote^[14] o el tritón^[15] regeneran completamente el ventrículo tras una resección apical. En este aspecto, cabe puntualizar que algunos animales anamniotas como la rana *Xenopus laevis*^[16] o una subpoblación de la especie de pez *Astyanax mexicanus*^[17], no son capaces de regenerar el ventrículo. Así, el ratón espinoso egipcio (*Acomys cahirinus*) presenta la habilidad natural de regenerar algunos tejidos, incluyendo el músculo esquelético^[18] o el miocardio^[19,20]. Estos animales presentan potenciales reparativos/regenerativos diferentes al resto de animales que representan sus respectivos clados, lo que puede ayudar a comprender mejor estos fenómenos mediante análisis comparativos.

La especie de vertebrado anamniota más estudiada en investigación básica en el ámbito de la regeneración cardíaca es el pez cebra, en el que se ha descrito que la formación de una estructura de tipo blastema (masa de células mesenquimáticas indiferenciadas) y la proliferación de cardiomiocitos de-diferenciados

hacen viable los procesos de regeneración miocárdica^[21]. En la regeneración del corazón del pez cebra son fundamentales tanto la proliferación de los cardiomiocitos como las señales, todavía desconocidas, que proporcionan los tejidos adyacentes (endocardio y epicardio) durante el proceso reparativo^[22,23]. Este fenómeno no tiene lugar en el corazón adulto de los mamíferos. Sin embargo, es interesante considerar que estudios recientes demuestran que las propiedades regenerativas de los mamíferos pueden variar a lo largo de su vida, desde el período embrionario a la vida adulta. De hecho, se ha demostrado que ratones neonatos de menos de siete días de edad son capaces de regenerar miocardio tras haberlos sometido a una resección ventricular apical^[24], en un proceso que implica un incremento de la tasa de proliferación de los cardiomiocitos y una reducción de los procesos de fibrosis cardíaca^[25]. Además, se ha comprobado que existe una población de células residentes en el corazón, caracterizada por la expresión en su membrana celular de la proteína c-Kit, que juega un papel fundamental en la capacidad regenerativa temprana de los ratones neonatos (pero no en corazones adultos) mediante procesos paracrinos de interacción intercelular con el tejido cardíaco dañado^[26].

Si bien es cierto que los datos que acabamos de discutir sugieren que los mamíferos neonatos son capaces de activar mecanismos regenerativos tras sufrir un daño cardíaco, es imprescindible concretar que el proceso regenerativo en estos casos depende del tamaño del daño causado, ya que si dicho daño es de tipo transmural (es decir, afecta a todo el grosor de la pared ventricular) la regeneración del tejido es incompleta^[27]. Este potencial regenerativo durante los primeros días de vida de algunos mamíferos se ha observado también tras la amputación de la parte más distal de sus falanges^[28]. Por otro lado se ha comprobado que las propiedades regenerativas de todos los tejidos se reducen con la edad, probablemente debido al envejecimiento del componente celular en dichos tejidos^[29], lo que sugiere que el envejecimiento celular y de los tejidos es un factor fundamental a tener en cuenta al estudiar fenómenos regenerativos.

Los trabajos que acabamos de citar sugieren que los mamíferos poseen cierto potencial regenerativo endógeno que se pierde durante los primeros días de vida postnatal. Sin embargo, algunos trabajos han demostrado que en un modelo de ratón transgénico concreto (línea MRL) los individuos adultos son capaces de regenerar por completo diferentes tejidos dañados, incluyendo el corazón^[30]. De esta forma resulta evidente que el potencial regenerativo endógeno del corazón adulto de los mamíferos puede llegar a reactivarse de manera efectiva bajo determinadas con-

diciones en las que el fondo genético del organismo resulta determinante.

Es por todo lo anterior por lo que la investigación preclínica en modelos animales resulta imperativa para conocer las respuestas biológicas que intervienen en los procesos regenerativos y reparativos en tejidos dañados.

La regeneración cardíaca en los vertebrados: implicaciones biomédicas

Resulta paradójico que algunos tejidos humanos como la piel, la sangre o la mucosa intestinal sean capaces de regenerarse de forma continua a lo largo de toda la vida mientras que otros como el tejido nervioso y el corazón no muestren ningún signo macroscópico de regeneración tras un daño significativo.

Pero ¿es realmente el corazón humano un órgano sin potencial regenerativo? Como se ha mencionado anteriormente, el corazón de los humanos, al contrario que el de otros vertebrados, no es capaz de regenerarse de forma ostensible tras una pérdida significativa de cardiomiocitos. ¿Cuál es el origen de esta limitación? No podemos saberlo a ciencia cierta, pero el análisis de los fenómenos regenerativos en el Reino Animal aporta posibles explicaciones. Para que un órgano pueda llevar a cabo un proceso de regeneración es necesario que se active uno de estos dos tipos de respuesta:

- a. En la regeneración epimórfica existe un incremento en la tasa de proliferación de las células adyacentes al daño, habitualmente con la formación de un blastema, es decir, una masa de células indiferenciadas capaces de diferenciarse *de novo* en los tejidos perdidos.
- b. En la regeneración morfoláctica existe un cambio en la morfología y organización de otros tipos celulares residentes en el propio tejido, siendo este un proceso que puede implicar la transdiferenciación (diferenciación directa de un tipo celular en otro) de las células preexistentes.

Según estos criterios, mientras en el corazón de algunos vertebrados como el pez cebra o el tritón la proliferación de los cardiomiocitos permite el desarrollo de una regeneración de tipo epimórfica^[21,31], en el corazón de los humanos no se ha descrito este proceso regenerativo de manera que, aunque existe un pequeño número de cardiomiocitos con capacidad proliferativa en el corazón humano adulto^[32], esta proliferación no se incrementa de forma sostenida en respuesta a estímulos patológicos^[33]. Además,

aunque la respuesta hipertrófica de algunos cardiomiocitos^[34,35] pudiera ser considerada como el inicio de un proceso regenerativo de tipo morfoláctico, los datos disponibles en la literatura sugieren que simplemente se trata de una respuesta adaptativa común de los cardiomiocitos al estrés^[36]. Por último, otro motivo común en la reparación y regeneración del corazón de los vertebrados es la participación activa del epicardio y sus derivados celulares en estas respuestas^[37].

A pesar de la discusión previa, son todas estas evidencias experimentales que sugieren que el corazón de los mamíferos, incluido el humano conserva un cierto potencial regenerativo endógeno^[38,39]. Aunque es cierto que dicho potencial regenerativo no se desarrolla de forma efectiva debido a razones desconocidas^[40,41], es posible que la limitada neovascularización de la zona de daño tras infarto de miocardio limite la activación de una regeneración tisular consistente.

¿Qué hemos, por tanto, aprendido del estudio de los procesos regenerativos en modelos animales? En primer lugar, que la regeneración cardíaca, depende de la capacidad del tejido cardíaco para generar nuevo músculo. En vertebrados inferiores la proliferación de cardiomiocitos adultos provee esa fuente celular, mientras que en vertebrados superiores como los mamíferos esa propiedad proliferativa parece estar restringida a un número muy pequeño de cardiomiocitos adultos. Esta circunstancia parece ser el principal obstáculo a la regeneración del corazón de los mamíferos. En segundo lugar, sabemos que la fibrosis reparativa sólo persiste en el corazón de los vertebrados superiores, interfiriendo en la reposición del músculo muerto. Por lo tanto, en la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas para tratar el corazón infartado, minimizar la fibrosis post-infarto debe ser un objetivo paralelo al de la generación de nuevo miocardio funcional. Por último, la viabilidad de cualquier proceso regenerativo dependerá de la eficacia de la neovascularización de los nuevos tejidos, por lo que es tan importante garantizar la aparición de nuevo tejido como mantenerlo en el tiempo.

La promesa de las terapias avanzadas

En la actualidad, la mayor parte de los recursos en investigación enfocados a la regeneración del corazón infartado se centran en la búsqueda de fuentes celulares que deberán permitir el desarrollo de terapias celulares sustitutivas. Estas aproximaciones, aún en fase de desarrollo, requieren la identificación de un tipo celular apropiado para promover una regeneración eficaz y extensa del músculo cardíaco. Aunque se

han usado células multi o pluripotentes con reconocida capacidad para diferenciarse en cardiomiocitos *in vitro*^[42,43], de momento no se han obtenido buenos resultados en su diferenciación efectiva en músculo *in vivo* así como en su capacidad para acoplarse eléctricamente al tejido sano del receptor.

De esta forma, en la encrucijada entre las propiedades celulares que permiten un trasplante seguro y aquellas que garantizan una diferenciación celular amplia, se encuentran las células madre mesenquimales (MSC, del inglés *Mesenchymal Stem Cell*) de la médula ósea y de la grasa, las cuales, a su vez, pueden favorecer la regeneración cardíaca mediante interacciones de tipo paracrino^[44]. Entre las características singulares de las MSC debemos destacar sus propiedades inmunomoduladoras, su multipotencia y el bajo riesgo de alteración celular (p.ej. anomalías cromosómicas) que muestran durante su expansión *in vitro*^[45,46], así como la posibilidad de realizar trasplantes autólogos que evitarían el rechazo inmunológico. Desafortunadamente, todos los resultados obtenidos en estos ensayos clínicos llevados a cabo hasta ahora prueban que las MSC no son capaces de diferenciarse a cardiomiocitos de forma eficiente, por lo que apenas mejoran la función cardíaca^[47].

En el extremo opuesto del amplio espectro de células candidatas para la regeneración cardíaca se encuentran las células madre embrionarias (ESC, del inglés *Embryonic Stem Cell*) y las células pluripotentes inducidas (iPS, del inglés *induced Pluripotent Stem Cell*) que son ejemplos prototípicos de células pluripotentes (PSC) y se caracterizan por ser capaces de diferenciarse hacia células de las tres capas blastodérmicas (ectodermo, mesodermo y endodermo), ser clonogénicas y autorrenovarse^[48]. Sin embargo, las PSC tienen como inconveniente fundamental el no poder ser usadas en condiciones de trasplante autólogo (en el caso de las ESC), el elevado costo económico de su generación (en el caso de las iPS) y el riesgo de desarrollo de teratomas *in vivo* en ambos casos^[49,50]. No obstante, ambas PSC son modelos óptimos para el estudio *in vitro* de las complejas redes transcripcionales y las señales moleculares que regulan los procesos de diferenciación celular, así como de las bases fisiopatológicas de diversas enfermedades cardiovasculares^[51].

De manera alternativa, algunos investigadores han planteado que el uso de estas células permitiría el desarrollo de terapias basadas en células de origen autólogo e incluso la activación de la regeneración basada en el potencial celular endógeno del corazón adulto. Finalmente, inspirados por la misma idea del potencial regenerativo endógeno del corazón, otros autores han propuesto el uso de micro ARN y an-

ti micro ARN como herramientas para promover la regeneración cardíaca *in vivo*^[52], ya que se ha demostrado que la sobreexpresión de algunos de estos factores, como por ejemplo miR-15, produce un aumento en la proliferación de los cardiomiocitos en los corazones dañados^[53].

Perspectivas experimentales para el estudio de la respuesta cardíaca a daño

El desarrollo de terapias avanzadas que supongan una alternativa viable a las que acabamos de discutir debe sustentarse en la experimentación, en un contexto preclínico, con nuevos modelos animales. De esta manera, nuestros equipos de investigación llevan varios años estudiando las bases regenerativas del corazón de vertebrados superiores (aves y mamíferos) durante su fase embrionaria. Basamos esta investigación en el hecho de que el tejido embrionario mantiene activados, al menos durante períodos de tiempo significativos, los mecanismos celulares y moleculares (p.ej. proliferación y diferenciación de los cardiomiocitos) que pueden sostener una regeneración epimórfica clásica.

El uso de embriones de ratón en la investigación sobre la regeneración cardíaca tiene la ventaja de que la manipulación genética en esta especie permite el estudio tanto del seguimiento de linajes celulares como del impacto de la alteración de señales moleculares concretas en la estructura cardíaca. No obstante, las posibilidades de manipulación experimental real en embriones de mamífero son muy limitadas. En los escasos estudios disponibles en la literatura al respecto se demuestra que la pérdida de una parte de la musculatura cardíaca del embrión de ratón es rápidamente compensada mediante el crecimiento de las células no afectadas del propio órgano^[54,55], siendo esta una respuesta que puede ser interpretada más como un crecimiento compensatorio del tejido en desarrollo que como una respuesta regenerativa. Sin embargo, la investigación con ratones permite la alteración de la actividad génica normal durante el desarrollo para luego someter al organismo adulto a algún tipo de daño experimental (para el estudio del infarto de miocardio en ratones lo más frecuente es la ligadura de la arteria coronaria descendente izquierda, que causa muerte miocárdica extensa en el ventrículo izquierdo). En uno de estos estudios se ha observado que la sobreexpresión del regulador del ciclo celular ciclina D2 permite el desarrollo de nuevos cardiomiocitos en respuesta a daño gracias al aumento de la actividad proliferativa de los cardiomiocitos^[56]. A pesar de que el modelo de ratón puede ayudar a ampliar el conocimiento para futuras

aplicaciones de terapias regenerativas, la imposibilidad de realizar microcirugía en los embriones de ratón representa un hándicap en este tipo de modelo experimental.

Al contrario de lo que sucede con los embriones de mamífero, en el caso de las aves, sí se puede realizar manipulación microquirúrgica del embrión durante el desarrollo *in ovo* sin que ello afecte a la viabilidad del organismo. De esta forma, los experimentos basados en la realización de daño tisular en embriones de ave^[57] pueden considerarse un complemento ideal a los experimentos realizados en otros modelos de animales vertebrados en los que la microcirugía embrionaria no es posible.

Conclusiones

Como resumen, podemos concluir que el desarrollo de nuevas terapias para regenerar el corazón en los humanos no se debe centrar sólo en el desarrollo de terapias celulares sustitutorias de carácter aditivo (es decir, que incorporan células extracardíacas al órgano dañado), sino que se han de dedicar esfuerzos al estudio del potencial endógeno del corazón para promover una regeneración basada en las propiedades naturales, conservadas a lo largo de la evolución, del corazón de los vertebrados. Este tipo de investigación implica necesariamente el estudio de otros modelos animales, incluyendo aquellos en los que existen estrategias reparativas o regenerativas complejas y distintas a las habituales en los tejidos humanos.

Referencias

- [1] Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, et al. Heart disease and stroke statistics-2016 update a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2016;133:e38-48.
- [2] Jessup M, Brozena S. Heart Failure. *N Engl J Med*. 2003;348:2007-18.
- [3] Hall R, Simpson I. The ESC Textbook of Cardiovascular Medicine: Second edition. Oxford Univ Press. 2009.
- [4] Taylor DO, Edwards LB, Boucek MM, Trulock EP, Aurora P, Christie J, et al. Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twenty-fourth Official Adult Heart Transplant Report-2007. *J Hear Lung Transplant*. 2007;26:769-81.
- [5] Sager HB, Kessler T, Schunkert H. Monocytes and macrophages in cardiac injury and repair. *J Thorac Dis*. 2017;9:S30-5.
- [6] Ruiz-Villalba A, Simón AM, Pogontke C, Castillo MI, Abizanda G, Pelacho B, et al. Interacting resident epicardium-derived fibroblasts and recruited bone marrow cells form myocardial infarction scar. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65:2057-66.
- [7] Sánchez-Alvarado A. Regeneration in the metazoans: Why does it happen? *BioEssays*. 2000;22:578-90.
- [8] Durán I. Modelos de regeneración. *Encuentros en la Biol*. 2009;2:13-4.
- [9] Jensen JA, Kosek JC, Hunt TK, Goodson WH, Miller DC. Cardiac cryolesions as an experimental model of myocardial wound healing. *Ann Surg*. 1987;206:798-803.
- [10] Ciulla MM, Paliotti R, Ferrero S, Braidotti P, Esposito A, Gianelli U, et al. Left ventricular remodeling after experimental myocardial cryoinjury in rats. *J Surg Res*. 2004;116:91-7.
- [11] van den Bos EJ, Mees BME, de Waard MC, de Crom R, Duncker DJ. A novel model of cryoinjury-induced myocardial infarction in the mouse: a comparison with coronary artery ligation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289:H1291-300.
- [12] Grivas J, Haag M, Johnson A, Manalo T, Roell J, Das TL, et al. Cardiac repair and regenerative potential in the goldfish (*Carassius auratus*) heart. *Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol*. 2014;163:14-23.
- [13] Poss KD, Wilson LG, Keating MT. Heart regeneration in zebrafish. *Science* (80-). 2002;298:2188-90.
- [14] Vargas-González A, Prado-Zayago E, León-Olea M, Guarner-Lans V, Cano-Martínez A. Regeneración miocárdica en *Ambystoma mexicanum* después de lesión quirúrgica. *Arch Cardiol Mex*. 2005;75:21-9.
- [15] Witman N, Murtuza B, Davis B, Arner A, Morrison JI. Recapitulation of developmental cardiogenesis governs the morphological and functional regeneration of adult newt hearts following injury. *Dev Biol*. 2011;354:67-76.
- [16] Marshall LN, Vivien CJ, Girardot F, Péricard L, Scerbo P, Palmier K, et al. Stage-dependent cardiac regeneration in *Xenopus* is regulated by thyroid hormone availability. *Proc Natl Acad Sci*. 2019;116:3614-23.
- [17] Stockdale WT, Lemieux ME, Killen AC, Zhao J, Hu Z, Riepsaame J, et al. Heart Regeneration in the Mexican Cavefish. *Cell Rep*. 2018;25:1997-2007.e7.
- [18] Maden M, Brant JO, Rubiano A, Sandoval AGW, Simmons C, Mitchell R, et al. Perfect chronic skeletal muscle regeneration in adult spiny mice, *Acomys cahirinus*. *Sci Rep*. 2018;8:1-14.
- [19] Shindo K, Peng H, Donahue RR, Ahern BM, Levitan BM, Satin J, et al. Evaluating spiny mice (*Acomys*) as a model for cardiac research. *BiorXiv*. 2020.
- [20] Koopmans T, van Beijnum H, Roovers EF, Malhotra D, Tomasso A, Boeter J, et al. Ischemic tolerance and cardiac repair in the African spiny mouse. *BiorXiv*. 2021.
- [21] Sallin P, de Preux Charles AS, Duruz V, Pfefferli C, Jaźwińska A. A dual epimorphic and compensatory mode of heart regeneration in zebrafish. *Dev Biol*. 2015;399:27-40.
- [22] Zhao L, Borikova AL, Ben-Yair R, Guner-Ataman B, MacRae CA, Lee RT, et al. Notch signaling regulates cardiomyocyte proliferation during zebrafish heart regeneration. *Proc Natl Acad Sci*. 2014;111:1403-8.
- [23] Lepilina A, Coon AN, Kikuchi K, Holdway JE, Roberts RW, Burns CG, et al. A Dynamic Epicardial Injury Response Supports Progenitor Cell Activity during Zebrafish Heart Regeneration. *Cell*. 2006;127:607-19.
- [24] Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, Hill JA, Richardson JA, Olson EN, et al. Transient Regenerative Potential of the Neonatal Mouse Heart. *Science* (80-). 2011;331:1078-80.
- [25] Bryant DM, O'Meara CC, Ho NN, Gannon J, Cai L, Lee RT. A systematic analysis of neonatal mouse heart regeneration after apical resection. *J Mol Cell Cardiol*. 2015;79:315-8.

- [26] Eschenhagen T, Bolli R, Braun T, Field LJ, Fleischmann BK, Frisén J, et al. Cardiomyocyte Regeneration. *Circulation*. 2017;136:680-6.
- [27] Darezhereshki A, Rubin N, Gamba L, Kim J, Fraser J, Huang Y, et al. Differential regenerative capacity of neonatal mouse hearts after cryoinjury. *Dev Biol*. 2015;399:91-9.
- [28] Borgens RB. Mice regrow the tips of their foretoes. *Sci* (New York, NY). 1982;217:747-50.
- [29] Sousounis K, Baddour JA, Tsonis PA. *Aging and Regeneration in Vertebrates*. vol. 108. ed. Elsevier Inc.; 2014.
- [30] Leferovich JM, Bedelbaeva K, Samulewicz S, Zhang XM, Zwas D, Lankford EB, et al. Heart regeneration in adult MRL mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:9830-5.
- [31] Bettencourt-Dias M, Mitnacht S, Brookes JP. Heterogeneous proliferative potential in regenerative adult newt cardiomyocytes. *J Cell Sci*. 2003;116:4001-9.
- [32] Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Walsh S, Zupicich J, et al. Evidence for Cardiomyocyte Renewal in Humans. *Science* (80-). 2009;324:98-102.
- [33] Pasumarthi KBS, Field LJ. Cardiomyocyte cell cycle regulation. *Circ Res*. 2002;90:1044-54.
- [34] Prabhu SD, Frangogiannis NG. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction. *Circ Res*. 2016;119:91-112.
- [35] Frangogiannis NG. The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodeling. *Nat Rev Cardiol*. 2014;11:255-65.
- [36] Haque ZK, Wang DZ. How cardiomyocytes sense pathophysiological stresses for cardiac remodeling. *Cell Mol Life Sci*. 2017;74:983-1000.
- [37] Smits AM, Dronkers E, Goumans M-J. The epicardium as a source of multipotent adult cardiac progenitor cells: Their origin, role and fate. *Pharmacol Res*. 2018;127:129-40.
- [38] Bianconi V, Sahebkar A, Kovanen P, Bagaglia F, Ricciuti B, Calabrò P, et al. Endothelial and cardiac progenitor cells for cardiovascular repair: A controversial paradigm in cell therapy. Elsevier Inc.; 2017.
- [39] Mauretti A, Spaans S, Bax NAM, Sahlgren C, Bouten CVC. Cardiac Progenitor Cells and the Interplay with Their Microenvironment. *Stem Cells Int*. 2017;2017.
- [40] Milasinovic D, Mohl W. Contemporary perspective on endogenous myocardial regeneration. *World J Stem Cells*. 2015;7:793-805.
- [41] Rubin N, Harrison MR, Krainock M, Kim R, Lien C-L. Recent advancements in understanding endogenous heart regeneration—insights from adult zebrafish and neonatal mice. *Semin Cell Dev Biol*. 2016;58:34-40.
- [42] Oh H, Ito H, Sano S. Challenges to success in heart failure: Cardiac cell therapies in patients with heart diseases. *J Cardiol*. 2016;68:361-7.
- [43] Brandão KO, Tabel VA, Atsma DE, Mummery CL, Davis RP. Human pluripotent stem cell models of cardiac disease: from mechanisms to therapies. *Dis Model Mech*. 2017;10:1039-59.
- [44] Loffredo FS, Steinhauser ML, Gannon J, Lee RT. Bone Marrow-Derived Cell Therapy Stimulates Endogenous Cardiomyocyte Progenitors and Promotes Cardiac Repair. *Cell Stem Cell*. 2011;8:389-98.
- [45] Caplan A. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol*. 2009;217:318-24.
- [46] Guadix JA, Zugaza JL, Gálvez-Martín P. Characteristics, applications and prospects of mesenchymal stem cells in cell therapy. *Med Clin*. 2017;148:408-14.
- [47] Abdel-latif A, Bolli R, Tleyjeh IM, Montori VM, Perin EC, Hornung CA, et al. Adult Bone Marrow-Derived Cells for Cardiac Repair. *Arch Intern Med*. 2007;167:989-97.
- [48] Posfai E, Tam OH, Rossant J. Mechanisms of Pluripotency In Vivo and In Vitro. *Curr. Top. Dev. Biol.*, vol. 107. ed., Elsevier Inc.; 2014, p. 1-37.
- [49] Fong C-Y, Gauthaman K, Bongso A. Teratomas from pluripotent stem cells: A clinical hurdle. *J Cell Biochem*. 2010;111:769-81.
- [50] Romano G, Morales F, Marino IR, Giordano A. A Commentary on iPS Cells: Potential Applications in Autologous Transplantation, Study of Illnesses and Drug Screening. *J Cell Physiol*. 2014;229:148-52.
- [51] Birket MJ, Mummery CL. Pluripotent stem cell derived cardiovascular progenitors - A developmental perspective. *Dev Biol*. 2015;400:169-79.
- [52] van Rooij E, Olson EN. MicroRNA therapeutics for cardiovascular disease: opportunities and obstacles. *Nat Rev Drug Discov*. 2012;11:860-72.
- [53] Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, Johnson BA, Grinsfelder D, Canseco D, et al. Regulation of neonatal and adult mammalian heart regeneration by the miR-15 family. *Proc Natl Acad Sci*. 2013;110:187-92.
- [54] Drenckhahn JD, Schwarz QP, Gray S, Laskowski A, Kiriakis H, Ming Z, et al. Compensatory Growth of Healthy Cardiac Cells in the Presence of Diseased Cells Restores Tissue Homeostasis during Heart Development. *Dev Cell*. 2008;15:521-33.
- [55] Sturzu AC, Rajarajan K, Passer D, Plonowska K, Riley A, Tan TC, et al. Fetal Mammalian Heart Generates a Robust Compensatory Response to Cell Loss. *Circulation*. 2015;132:109-21.
- [56] Hassink RJ, Pasumarthi KB, Nakajima H, Rubart M, Soonpaa MH, de la Riviere AB, et al. Cardiomyocyte cell cycle activation improves cardiac function after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2008;78:18-25.
- [57] Palmquist-Gomes P, Guadix JA, Pérez-Pomares JM. A chick embryo cryoinjury model for the study of embryonic organ development and repair. *Differentiation*. 2016;91:72-7.