

Asistencia miocárdica con matrices bioartificiales

JORGE C. TRAININI^{MTSAC, 1}, JUAN C. CHACHQUES², NOEMÍ LAGO^{MTSAC, 1}**Dirección para separatas:**Jorge C. Trainini
Brandsen 1690 - 3º "A"
(1287) Buenos Aires
jctrainini@hotmail.com**RESUMEN**

El objetivo de la cardiomioplastia celular es regenerar el miocardio mediante el implante de células vivas. Sin embargo, en corazones isquémicos hay alteraciones en la matriz extracelular. El colágeno tipo I, responsable del soporte estructural, disminuye desde el 80% al 40%, mientras que el colágeno tipo III aumenta del 10% al 35%. De esta manera, se hace importante asociar las células implantadas con una matriz extracelular bioartificial. El propósito de esta revisión es evaluar la *performance* de las células junto con una matriz biodegradable ubicadas en la superficie ventricular izquierda.

REV ARGENT CARDIOL 2006;74:401-405.

Palabras clave > Insuficiencia cardíaca congestiva - Células madre - Ingeniería de tejidos

INTRODUCCIÓN

Si nos remitimos a la biología cardíaca, vemos que ésta se halla compuesta por cardiomiocitos y matriz extracelular. Los cardiomiocitos adultos son células altamente diferenciadas que no pueden sintetizar ADN rápidamente y que presentan una síntesis proteica pausada. Constituyen el 30% de la masa muscular cardíaca. El 70% restante es patrimonio de la matriz extracelular, es decir, no miocitos, conformada por fibroblastos y células endocárdicas, epicárdicas y endoteliales. Los cardiomiocitos tienen una vida de unos cinco años, según investigaciones de Piero Anversa, (1) mientras que los no miocitos alcanzan a existir entre 80 y 120 días, aunque es posible la aceleración de esta condición en circunstancias patológicas como sobrecarga o estrés. Este intersticio se halla en un estado de continuo recambio o *turnover*. En estrecha relación con éste se hallan las células cardíacas en estado quiescente y muy bajos indicios de actividad regenerativa. Por otra parte, un 25% de los cardiomiocitos son binucleados y, además, la mitad de ellos son tetraploides y un cuarto, diploides. Estas cifras aumentan con la presencia de hipertrofia y con la edad, lo cual indica un esfuerzo indudable hacia la división celular.

La regeneración cardíaca no implica únicamente la compensación en la disminución de los miocitos en el miocardio patológico. Tal desequilibrio entre muerte y regeneración es el punto crítico en la evolución del corazón enfermo hacia su falla terminal. Hoy, la cardiomioplastia celular puede introducir una ayuda al proceso natural del reparo miocárdico con el fin de restaurar la contractilidad, limitar la remodelación ventricular y estimular la angiogénesis en los pacien-

tes que han tenido un infarto de miocardio extenso y probablemente también en los portadores de miocardiopatía dilatada. (2, 3)

En este punto debemos añadir un concepto que compendia una visión orgánica-funcional. Implica la alquimia de los procesos bioquímicos inscriptos en el mundo circundante a través de la vida. El comportamiento de un electrón espontáneo (no inducido) es radiactivo y su duración es de un *tiempo de vida*. No es posible saber la vuelta a su estado inicial, pues es espontáneo. Esto introduce una asimetría entre antes y después, o sea, revela que la *flecha del tiempo* es de carácter irreversible. La imagen termodinámica de los seres vivos nos dice que están en fluctuación permanente, en mutación constante. Es ir de la posibilidad a lo real. La matriz cardíaca posee la inestabilidad creadora. Y es el gradiente necesario para que el cardiomiocito no se estanque en un equilibrio térmico. Con sus fluctuaciones establece un intercambio de energía y materia con estructuras más estables, cual es el cardiomiocito, manteniendo de esta forma su función. A través de la mayor inestabilidad de la matriz se canaliza su actitud creativa ante situaciones más bruscas, en el momento de fluctuaciones y desequilibrios que la obligan a mantener su estructura aunque sea con una jerarquía menor en la función. En estos fenómenos que suceden lejos del equilibrio funcionan las estructuras disipativas. En esta inestabilidad se autoorganizan los sistemas con un comportamiento de probabilidad estadística en sus resultados. (4)

Comprendamos que la mecánica cuántica se aplicó al mundo microscópico ($< 10^{-8}$ cm) y la teoría de Einstein (relatividad) a la velocidad de los objetos cercana a la de la luz ($> 10^{10}$ cm/seg). Pero la *ciencia no*

^{MTSAC} Miembro Titular de la Sociedad Argentina de Cardiología¹ Servicio de Cirugía Cardíaca, Hospital Presidente Perón, Avellaneda, Provincia de Buenos Aires, Argentina² Servicio de Cirugía Cardiovascular, Hospital Europeo G. Pompidou, París, Francia

lineal, que abarca a prácticamente todos los problemas y representa el gran avance metodológico actual, incluye todos los tamaños y cualquiera sea su velocidad. Esta situación ha unido a las disciplinas y permite estudiar el mismo fenómeno desde todos los ángulos haciendo respetar el paradigma actual de intentar llegar a una ciencia objetiva.

El colágeno es el componente mayor de la matriz extracelular del corazón. Las funciones de una malla de este material persiguen dar el soporte y la alineación a los cardiomiocitos y los vasos sanguíneos, preservando la arquitectura, evitando el sobreestiramiento de las células miocíticas y proveyendo una base para la elasticidad diastólica. (5, 6) Se deduce que esta matriz extracelular sería beneficiosa con el fin de propender al crecimiento apropiado de las células implantadas en el marco de una geometría tridimensional. Con esta táctica de utilizar matriz extracelular de colágeno y células madre de la médula ósea en forma concomitante, se estaría cumplimentando la pauta de que esta asociación es importante para el mantenimiento estructural del miocardio.

COMPONENTES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR

La matriz extracelular está constituida por una red de proteínas y proteoglicanos que mantienen la estructura de los tejidos y regulan la expresión de funciones específicas de las células con las que interaccionan. Hay un activo intercambio entre las células y la matriz. Las primeras organizan la matriz y ésta efectúa la regulación celular.

La matriz extracelular contiene como componentes a la *sustancia fundamental amorfa* (glucosaminoglicanos, proteoglicanos), *proteínas fibrosas* (colágeno), *proteínas de adhesión* (fibronectina, laminina, tenascina, nidógeno), *células fijas* (fibroblastos, fibrocitos, mesenquimáticas) y *células errantes* (cebas, macrófagos). A su vez, el *colágeno tipo I* (80%) tiene a su cargo el soporte estructural y el alineamiento espacial de los cardiomiocitos, mientras que el *colágeno tipo III* (10%) desempeña su papel en el acortamiento del miocito interrelacionado con la función ventricular eyectiva.

Las interacciones entre los cardiomiocitos y los no miocitos se realizan a través de señalizaciones compuestas de proteínas (fibronectina, laminina, vitronectina), moléculas de adhesión (integrinas), proteínas citoesqueléticas (actina, alfaactinina) y otros mediadores como las cinasas de adhesión local. El gradiente de materia y energía entre la matriz extracelular y los cardiomiocitos, es decir, entre células menos diferenciadas y más diferenciadas, mantiene un flujo de comportamiento que va desde lo menos estable y más lejos del equilibrio hacia lo más estable y cercano al equilibrio. Dicha matriz genera sustancias químicas (señalizadores) que estimulan el crecimiento y a la vez ofrece soporte físico a las células.

MATERIALES

La elección de los biomateriales cumple un papel principal en ingeniería de tejidos. En efecto, éstos deberán servir no sólo de apoyo físico a las células, sino que también tendrán que proveer las sustancias químicas y biológicas necesarias para guiar el crecimiento, la diferenciación, la implantación, la distribución y la organización de las células. Igualmente, los biomateriales que podrían ser llamados bio-miméticos, deberán ser capaces de responder a estímulos celulares específicos, de facilitar la formación de una red vascular capaz de proporcionar oxígeno y nutrientes necesarios al metabolismo celular y finalmente de favorecer la actividad electromecánica eventualmente desarrollada por las células. (7-12)

Es decir que entre los biomateriales empleados y las células en ellos implantadas deberían establecerse interacciones a nivel molecular y ultraestructural, capaces de mimetizar los procesos fisiológicos que se verifican en los tejidos de nuestro organismo. Los componentes constitutivos de las matrices deberán poseer la especificidad biológica de los componentes fundamentales de la matriz extracelular, como el colágeno de tipo I y III, y tendrán que tener propiedades físico-químicas tales que permitan asegurar una resistencia adecuada por un lapso de tiempo determinado. Finalmente, ocuparán el lugar hacia la integración funcional soportando una degradación que deberá realizarse con una cinética adecuada, sin originar productos de degradación tóxicos, ni desencadenar una respuesta inmunológica en el tejido huésped. No obstante los progresos efectuados en los últimos años, no existen aún biomateriales que presenten la totalidad de las características citadas, habiéndose utilizado numerosos componentes en la ingeniería de tejidos (Tabla 1).

ANTECEDENTES

Actualmente, luego de los trabajos de Leor, (12, 13) existen tres posibilidades para intentar la construcción de un tejido cardíaco artificial:

- Implante de células en matrices bioartificiales.
- Superposición de estratos de células.
- Aplicación de células en matrices solubles.

Vacanti, (14) en la década de los noventa, propuso la utilización de matrices, con la ventaja de construir tejidos de distintas configuraciones. Presenta inconvenientes: limitación de la nutrición y oxigenación celular, que aumenta a medida que se incrementa el espesor de la matriz utilizada. Asimismo, en estas matrices preformadas hay restricción de la actividad contráctil y mala diferenciación de las células implantadas. Por el contrario, el empleo de matrices solubles –ampliamente estudiado por el grupo de Zimmermann– compuestas por fibras de colágeno tipo I y III han tenido otras perspectivas. (15) Los tejidos obtenidos con esta técnica fueron capaces de sobrevivir durante 8 sema-

Tabla 1. Matrices bioartificiales. Materiales

Naturales
Matrices gelatinosas
Matrices porosas de alginato
Matrices gelatinosas de alginato y polietilenglicol
Matrices de colágeno
Matrices de cola de fibrina
Sintéticos
Compuestos de ácido poliláctico
Compuestos gelatinosos derivados del ácido poliláctico y sus isómeros
Matrices capaces de conducir impulsos eléctricos compuestas de gelatina, alginato, ácido poliláctico y/o colágeno
Matrices de alcohol polivinílico
Matrices de ácido polihidrobutilato poliglicólico
Matrices de poliuretano
Matrices de isómeros del caprolactone láctico
Matrices de isómeros del caprolactone láctico y carbonato

nas luego de ser implantados en el corazón infartado de ratas.

Shimizu y su grupo (16, 17) han utilizado otro método, que consiste en el desarrollo de tejidos de recambio, gracias a la superposición de estratos de células. Las células se cultivan en discos que contienen polímeros capaces de responder a las variaciones de la temperatura. Se obtiene adherencia y proliferación a 37 °C, y se separan a 32 °C. Utilizando este método, este grupo ha obtenido tejidos similares al miocardio, la córnea, la vejiga y el periodoncio.

Se encuentran en estudio biorreactores celulares, que permiten el cultivo de células en condiciones de agitación mecánica, ya que son sometidas a una velocidad de turbulencia. Las matrices con cardiomiocitos con este método han demostrado mejora en la actividad metabólica, el aspecto morfológico y el contenido de ADN. No obstante, sólo debe ser considerado dentro de la investigación experimental.

En un trabajo reciente, en el que se utilizaron modelos murino y ovino de infarto de miocardio, se ha demostrado que el uso combinado de terapia celular mediante la inyección intramiocárdica de células medulares, y de ingeniería de tejidos por medio de una matriz de colágeno de tipo I y III embebida con el mismo tipo de células, aumenta la fracción de eyección y reduce la remodelación ventricular. (15) En esta investigación se hallaron cambios manifiestos en el tiempo de desaceleración de llenado del ventrículo izquierdo (DT). En los animales con matriz, este tiempo pasó de 162 ± 7 mseg a 198 ± 9 mseg ($p = 0,01$), mientras que en el grupo testigo de 159 ± 5 mseg se modificó a 167 ± 8 mseg (NS). (3)

Dentro de las propiedades con que cuenta la matriz celularizada se encuentra la capacidad de acoger y formar una red vascular capaz de proporcionar el aporte energético y nutritivo necesario para el metabolismo celular. Visto que todas las células son en menor o mayor grado sensibles a la isquemia, las matrices deberían contar con una red capilar desarrollada antes de ser implantadas en los órganos afectados o inmediatamente después. Para tal fin sería viable incorporar a la matriz embebida con células distintos factores angiogénicos, como el factor de crecimiento derivado de los fibroblastos (bFGF), el factor de crecimiento derivado del epitelio vascular (VEGF) o el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), con el propósito de estimular la angiogénesis. Asimismo, con la finalidad de estimular el crecimiento, la proliferación y la diferenciación de las células y de la matriz extracelular, se está trabajando en nuevas estrategias como el uso de la proteína ósea morfogenética (BMP), la cual podría estimular dichos parámetros. (18)

EXPERIENCIA CLÍNICA ACTUAL

Durante los procesos cardíacos isquémicos se produce una alteración en el nivel del colágeno tipo I, el cual disminuye del 80% al 40% y también del colágeno tipo III, que se incrementa del 10% al 35%. Estos cambios contribuyen a la remodelación ventricular, a la dilatación sistólica y también a la disfunción diastólica.

Luego de la experimentación correspondiente en animales fue posible organizar un estudio multicéntrico que previó la inclusión de pacientes con cardiopatías isquémicas. El primer paciente fue operado en mayo de 2005 en el Hospital Perón de la Argentina, desarrollo que cuenta actualmente con varios implantes en dicho centro. El proyecto "Myocardial Assistance by Grafting a New Bioartificial Upgraded Myocardium" (MAGNUM) se basa en el uso de una matriz extracelular biodegradable, proangiogénica y ausente de propiedades de rechazos. Es microporosa y está formada por colágeno I y III. Tiene forma rectangular de $7 \times 5 \times 0,6$ cm. Las células madre se injertan sobre esta matriz para servir de plataforma de crecimiento del nuevo tejido en forma tridimensional, como sucede en la naturaleza. La matriz se coloca sobre el área a reparar y presenta autorización CE Mark (Comunidad Europea) (Figura 1).

En el Hospital Presidente Perón, esta matriz del proyecto MAGNUM se implantó en 13 pacientes con cardiopatía isquémica, la cual fue embebida con un promedio de células madre progenitoras de la médula ósea de $1,25 \pm 0,67 \times 10^8$ millones. El concentrado logrado contó con una citometría de flujo en relación con la CD34+ del 5,2%, mientras que en la AC133+ se observó un 2,8%. Estas matrices bioartificiales se colocaron en el área epicárdica a reparar y se sujetaron por suturas simples. De estos pacientes tratados, 5 de ellos con un promedio de edad de $52 \pm 7,6$ años ya tienen un seguimiento de 281 ± 108 días. A este tiempo, la frac-

ción de eyección se incrementó de $37,6 \pm 12,7\%$ a $45,8 \pm 12,6\%$ ($p = 0,05$), mientras que el diámetro diastólico del ventrículo izquierdo pasó de $57,4 \pm 2$ mm a $52,4 \pm 2,7$ mm ($p = 0,02$) (Figura 2).

CONCLUSIONES

La ingeniería tisular cardíaca se encuentra frente al gran desafío de reconstruir o regenerar las pérdidas anatómicas, de evitar o retardar la progresión de la remodelación ventricular y de bloquear o revertir la reducción funcional que se verifica después de un in-

farto de miocardio. Todos los esfuerzos realizados hasta el presente para obtener un tejido capaz de lograr estos objetivos han presentado un resultado limitado.

La supervivencia de las matrices celularizadas en condiciones de isquemia, el desarrollo de una vascularización y la integración funcional del tejido formado representan problemas cruciales por superar. Otro punto importante es la proyección y la construcción de catéteres que en un futuro permitan implantar de manera menos invasiva estas matrices (en forma soluble o de gel), a fin de evitar una intervención de cirugía cardíaca.

Los esfuerzos actuales de la ingeniería de tejidos parecen concentrarse en la obtención de un tejido capaz de desarrollar fuerzas de contracción eficaces a fin de mejorar la función ventricular sistólica. Sin embargo, en el momento actual podemos afirmar que análogamente al efecto de limitación de la remodelación ventricular que se obtiene con la terapia médica (betabloqueantes, diuréticos, etc.), la limitación de la progresión de la dilatación cardíaca constituye un objetivo fundamental de esta disciplina. La opinión de nuestro grupo es que para lograr esos dos objetivos se hace necesario reunir los esfuerzos paralelos de múltiples disciplinas. Con toda la prudencia pero al mismo tiempo con toda la rapidez que la solución del problema requiere, es necesario establecer protocolos de experimentación animal y luego clínicos, (19, 20) a fin de evaluar estrategias combinadas de terapia celular, de ingeniería de tejidos y de terapia molecular. La utilización complementaria de estas técnicas podría mejorar los beneficios que cada tratamiento presenta individualmente.

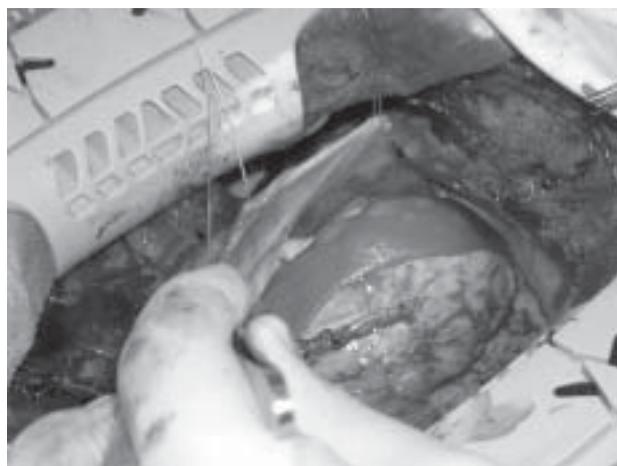


Fig. 1. Matriz extracelular implantada.

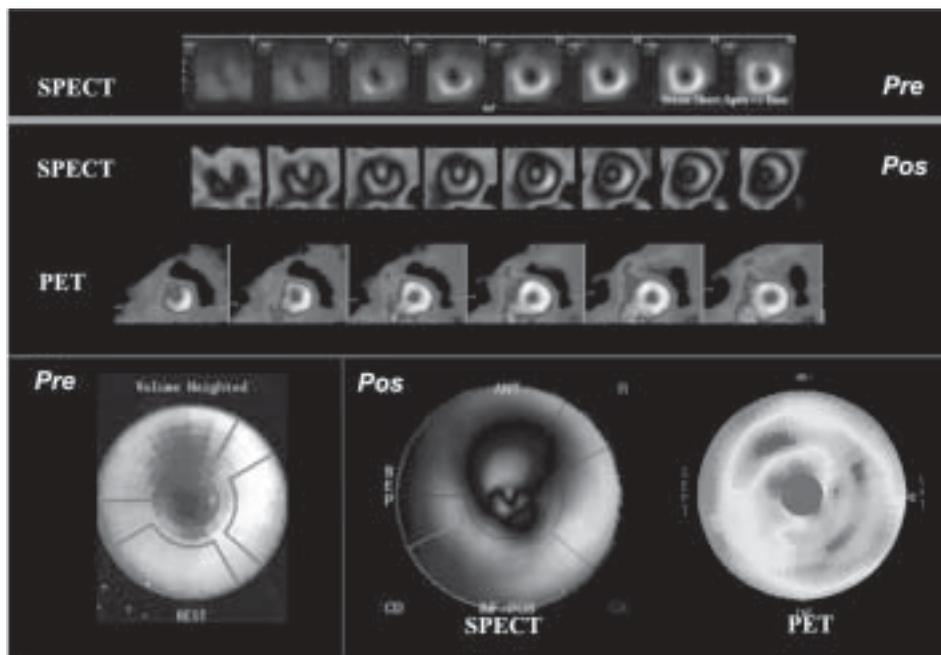


Fig. 2. Estudio de perfusión preoperatorio y posoperatorio en un paciente a los 8 meses de seguimiento. Se observa mayor perfusión en los segmentos anteriores (basal y medio) y en los segmentos apicales, inferior, inferoseptal y lateral, que se corresponden con viabilidad en PET.

SUMMARY
Myocardial Assistance with Bioartificial Matrices

The objective of cellular cardiomyoplasty is to regenerate the myocardium by implantation of living cells. However, in ischemic heart disease the extracellular myocardial matrix is modified; type I collagen (responsible for structural support) decreases from 80 to 40% while type III collagen increases from 10 to 35%. Therefore, it becomes important to associate the implanted cells to an extracellular bioartificial matrix. The purpose of this clinical study was to evaluate the performance of a biodegradable collagen matrix seeded with cells and grafted onto the left ventricular surface.

Key words > Heart Failure - Congestive - Stem Cells - Tissue Engineering

BIBLIOGRAFÍA

1. Anversa P, Kajstura J. Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart. *Circ Res* 1998; 83(1):1-14.
2. Trainini JC, Lago N, de Paz J, Cichero D, Giordano R, Mouras J, et al. Myoblast transplantation for myocardial repair: a clinical case. *J Heart Lung Transplant* 2004;23:503-5.
3. Cortes Morichetti M, Fratti G, Chachques JC. Aplicación de ingeniería de tejidos en cardiología: Miocardio bioartificial. En: Chachques JC, Herreros J, Trainini JC. *Regeneración Cardíaca*. Buenos Aires: Ed. Magister Eos; 2005. p. 199-205.
4. Trainini JC, Lago N, Chachques JC. La plasticidad en la regeneración cardíaca. *Rev Argent Cardiol* 2005;73:301-7.
5. Mathur A, Martin JF. Stem cells and repair of the heart. *Lancet* 2004;364:183-92.
6. Kim HE, Dalal SS, Young E, Legato MJ, Weisfeldt ML, D'Armeinto J. Disruption of the myocardial extracellular matrix leads to cardiac dysfunction. *J Clin Invest* 2000;106:857-66.
7. Eschenhagen T, Didie M, Munzel F, Schubert P, Schneiderbanger K, Zimmermann WH. 3D engineered heart tissue for replacement therapy. *Basic Res Cardiol* 2002;97:1146-52.
8. Kofidis T, Akhyari P, Boublik J, Theodorou P, Martin U, Ruhparwar A, et al. In vitro engineering of heart muscle: artificial myocardial tissue. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002;124:63-9.
9. Dar A, Shachar M, Leor J, Cohen S. Optimization of cardiac cell seeding and distribution in 3D porous alginate scaffolds. *Biotechnol Bioeng* 2002;80:305-12.
10. Akhyari P, Fedak PW, Weisel RD, Lee TY, Verma S, Mickle DA, et al. Mechanical stretch regimen enhances the formation of bio-engineered autologous cardiac muscle grafts. *Circulation* 2002; 106:1137-42.
11. Chandy T, Rao GH, Wilson RF, Das GS. The development of porous alginate/elastin/PEG composite matrix for cardiovascular engineering. *J Biomater Appl* 2003;17:287-301.
12. Leor J, Cohen S. Myocardial tissue engineering: creating a muscle patch for a wounded heart. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1015:312-9.
13. Leor J, Patterson M, Quinones MJ, Kedes LH, Kloner RA. Transplantation of fetal myocardial tissue into the infarcted myocardium of rat. A potential method for repair of infarcted myocardium? *Circulation* 1996;94:II332-6.
14. Vacanti JP, Langer R. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet* 1999;354:SI32-4.
15. Zimmermann WH, Melnychenko I, Eschenhagen T. Engineered heart tissue for regeneration of diseased hearts. *Biomaterials* 2004;25:1639-47.
16. Shimizu T, Okano T. Tissue engineering for ischemic heart disease. *Nippon Rinsho* 2003;61:710-5.
17. Shimizu T, Yamato M, Isoi Y, Akutsu T, Setomaru T, Abe K, et al. Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. *Circ Res* 2002;90:e40.
18. Hench LL, Xynos ID, Polak JM. Bioactive glasses for in situ tissue regeneration. *J Biomater Sci Polym Ed* 2004;15:543-62.
19. Chachques JC, Herreros J, Trainini J, Juffe A, Rendal E, Prosper F, et al. Autologous human serum for cell culture avoids the implantation of cardioverter-defibrillators in cellular cardiomyoplasty. *Int J Cardiol* 2004;95:S29-33.
20. Trainini JC. Modelo termodinámico en la regeneración cardíaca. *Rev Conarec* 2004;74:59-64.