

Cardiomioplastia celular

JUAN C. CHACHQUES¹, JESUS HERREROS GONZALEZ², JORGE C. TRAININI³

RESUMEN

El objetivo de la cardiomioplastia celular es el de limitar las consecuencias de la disminución en la función contráctil que produce el infarto de miocardio. La terapéutica celular para el tratamiento de la escara posisquémica es particularmente atractiva debido a la potencialidad en la regeneración miocárdica que una variedad de células miogénicas y angiogénicas presentan, como los mioblastos esqueléticos, células madre mesenquimáticas de la médula ósea, células progenitoras circulantes en sangre, células musculares lisas, células endoteliales vasculares y células madre embrionarias. La cardiomioplastia celular con empleo de mioblastos esqueléticos autólogos se realizó en nuestros centros en 18 pacientes. Hasta el momento, en todo el mundo se ha efectuado en más de cien casos. El criterio de inclusión consiste en pacientes con fracción de eyección del ventrículo izquierdo baja y con escaras posinfartos acinéticas y no viables. La terapia celular con células miogénicas puede reducir el tamaño y la fibrosis del área infartada, lo cual limita el remodelado posisquémico y restaura la contractilidad regional miocárdica en pacientes que han sufrido infartos extensos. Se han desarrollado técnicas de cultivo de mioblastos esqueléticos expandidos *ex vivo* con suero autólogo obtenido por plasmaféresis. Estas técnicas son capaces de producir 300 millones de células en tres semanas, las cuales contienen más del 70% de mioblastos. La viabilidad celular en el momento del implante es mayor del 90%. El beneficio de usar suero humano autólogo en el cultivo es el de que evita el riesgo de contaminación con priones, virus o zoonosis. Tradicionalmente, las técnicas de cultivo emplearon el suero fetal bovino como medio de crecimiento. El contacto de células humanas con suero fetal bovino luego de tres semanas da por resultado la fijación de proteínas animales sobre la superficie celular, que conforman antígenos para que se produzcan efectos inmunológicos adversos. En estos casos se produce una reacción inflamatoria con la posterior fibrosis. De esta manera, en pacientes cuyas células fueron cultivadas con suero fetal bovino se ha observado arritmia ventricular severa y muerte súbita. En muchas oportunidades esta complicación requirió el implante de desfibriladores. En este artículo presentamos las técnicas para regeneración cardíaca y sus resultados clínicos preliminares.

REV ARGENT CARDIOL 2003; 71: 138-145

Dirección para separatas:

Dr. Jorge C. Trainini, Brandsen
1690 - 3º C1287AAJ Buenos Aires,
Tel./Fax: 4302-3810

Palabras clave

> Trasplante celular - Insuficiencia cardíaca - Infarto de miocardio

INTRODUCCION

La cardiomioplastia celular consiste en el implante de células *in situ* con el fin de inducir el crecimiento de nuevas fibras musculares y el desarrollo de angiogénesis en el miocardio lesionado. Esta facultad puede contribuir a mejorar tanto la función ventricular sistólica como diastólica y a revertir el proceso de remodelado posisquémico. (1, 2) El miocardio adulto es incapaz de reparar en forma efectiva su lesión después de un infarto debido a la escasez de células madre. (3-5) Por esta razón se han diseñado estrategias de trasplante celular para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca (miocardiopatías isquémicas y dilatadas) con

el fin de reemplazar las células perdidas con otras células que puedan realizar el trabajo cardíaco. Las posibilidades crecientes en la terapia celular para lograr la regeneración miocárdica son el trasplante dentro del miocardio dañado de diferentes tipos de células como los mioblastos autólogos (de origen esquelético), las células madre derivadas del estroma de la médula ósea, las células circulantes en sangre derivadas de células progenitoras, las células del músculo liso, las células del endotelio vascular y las células madre del embrión. (6-9)

Mientras que varias células donantes se han estudiado para inducir miogénesis después del infarto de miocardio, recientemente el interés se ha puesto de

¹ Hospital Europeo Georges Pompidou, París, Francia

² Universidad de Navarra, Pamplona, España

³ Hospital Presidente Perón, Avellaneda, Argentina

manifiesto en promover angiogénesis cardíaca por medio de trasplantes de células endoteliales vasculares o células progenitoras endoteliales, retiradas directamente o movilizadas desde la médula ósea. (10-13) Esta posibilidad encierra un potencial importante como coadyuvante del trasplante celular miogénico, con el fin de inducir angiogénesis en el miocardio lesionado, debido a que la mortalidad de las células después del implante en las áreas fibróticas puede ser alta, ya que el oxígeno y los nutrientes son limitados. De allí que la terapia basada en células angiogénicas es un desarrollo importante para tratar la isquemia del miocardio y las extremidades debido a la inestabilidad y las respuestas adversas que se presentan a los vectores angiogénicos de la terapia génica (14, 15) y las limitaciones en el empleo de los factores de crecimiento, los cuales presentan riesgos de efectos sistémicos (problemática angiogénesis en la retina, hiperplasia de la íntima arterial con desarrollo de placas de ateromas y potenciación en el crecimiento y en las metástasis de tumores ocultos). (16, 17)

Nuestros quince años de experiencia clínica con el músculo dorsal ancho en cardiomioplastia y aortomioplastia dinámicas (2, 18, 19) y seis años de trabajo en la cardiomioplastia celular (6, 17, 20, 21) proveen el soporte necesario para la indicación y el manejo de asistencias biológicas. La cardiomioplastia celular aparece como una técnica promisoriosa capaz de restaurar la función ventricular y revertir el remodelado en pacientes con extensos infartos de miocardio. El propósito de este artículo es el de revisar el papel de terapias celulares y angiogénicas en las enfermedades miocárdicas. En este desarrollo se presentan además resultados clínicos preliminares.

SELECCION CELULAR

Una de las mayores cuestiones pendientes que conciernen a la terapia celular en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca es qué tipo de célula es la apropiada para la regeneración miocárdica. La siguiente enumeración describe los tipos celulares que se han demostrado experimentalmente, como asimismo los utilizados en la faz clínica, los cuales han tenido resultados primarios satisfactorios.

Células musculares esqueléticas. Son capaces de regenerarse después de una injuria debido a la presencia de células satélite (mioblastos). La mayor ventaja de este tipo celular es que son muy resistentes a la isquemia, se multiplican después de la injuria y presentan un alto poder para mitosis múltiples. (21-23) En su diferenciación terminal los mioblastos de músculo esquelético forman miotubos multinucleados, proceso éste que es de fusión, crucial para el desarrollo del músculo esquelético y, en el adulto, para la hipertrofia y el reparo muscular. Además, los mioblastos esqueléticos autólogos cultivados no presentan inconvenientes inmunológicos, éticos, de génesis tumoral o los problemas que conlleva la disponibilidad del do-

ABREVIATURAS

G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos
HSC	Células madre hematopoyéticas
MAPC	Células progenitoras adultas multipotentes
MSC	Células madre mesenquimáticas
NYHA	New York Heart Association
PEC	Células progenitoras endoteliales

nante. A continuación del implante en una lesión previamente infartada, los mioblastos forman miotubos dentro de la escara, de modo que disminuye la fibrosis. Sin embargo, las conexiones histológicas y electromecánicas con el miocardio huésped, lo cual permitiría la contractilidad sincrónica, aún no se han demostrado.

Células de la médula ósea. Hay cuatro líneas celulares que pueden aislarse de la médula ósea: células madre hematopoyéticas (HSC), células madre mesenquimáticas (MSC), (7) células progenitoras adultas multipotentes (MAPC) (24) y células progenitoras endoteliales (PEC). (13) Las células madre mesenquimáticas, llamadas también células del estroma de la médula ósea, son capaces de dar múltiples líneas celulares. Estas células pueden tener un papel potencial para el tratamiento de enfermedades degenerativas o genéticas que afecten a células de origen mesodérmico, principalmente en el campo de la regeneración de hueso, cartílago y tejido cardíaco. Las células del estroma de la médula ósea (CD133+) pueden diferenciarse en células endoteliales en el proceso de neoformación de vasos sanguíneos para perfundir el miocardio.

Después del implante en una escara fibrótica miocárdica, la diferenciación de células madre en cardiomiocitos todavía no se ha establecido claramente. Los mayores problemas pendientes con este tipo celular son que después del implante en una escara fibrótica las células pueden diferenciarse en fibroblastos, con el riesgo de volverse “una escara dentro de una escara”. De allí la importancia del medio donde se realiza el implante. Aparentemente, en muchos estudios la transformación de las células madre se debió solamente a la fusión celular con las células parenquimatosas, que dotó a dichas células madre de una función especializada.

Células madre en sangre periférica. Son similares a las obtenidas por aspiración de la médula ósea (p. ej., células madre pluripotentes positivas para anticuerpo AC133). Estas células autólogas mononucleares pueden mobilizarse previamente por administración de citoquinas en la forma de factores estimulantes de crecimiento, por ejemplo el producto G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor* [factor estimulante de colonias de granulocitos]). (13) Las estatinas también pueden utilizarse para la movilización celular.

Células musculares lisas. Pueden obtenerse de un segmento de arteria, del apéndice cecal o del útero a través de una laparoscopia. Estudios experimenta-

les se han demostrado satisfactorios en la expansión de estas células *in vitro*. Luego del implante en el miocardio patológico, las células musculares lisas proliferan y se hipertrofian en respuesta a las contracciones cardíacas. (8)

Cardiomiocitos fetales y neonatales. Estas células se han injertado satisfactoriamente dentro del miocardio después de la expansión *in vitro* en estudios experimentales. La presencia de discos intercalares y *connexin43*, los cuales son marcadores de unión intracelular requeridos para el acoplamiento eléctrico, se demostró en forma experimental entre los cardiomiocitos injertados y los nativos. Las uniones desarrolladas entre el miocardio huésped y las células injertadas dan por resultado una mejor función tanto sistólica como diastólica. Por otra parte, hay situaciones no resueltas que incluyen su disponibilidad, problemas inmunológicos derivados de su aplicación clínica y cuestiones éticas inherentes a su utilización. (10)

Cardiomiocitos adultos. Presentan varios inconvenientes para su uso en la regeneración miocárdica debido a la dificultad para expandirse en un medio de cultivo. En efecto, los cardiomiocitos adultos no se dividen por ser células diferenciadas terminales. (25) Además, estas células requieren suplencia vascular adecuada para sobrevivir en áreas infartadas, en contraste con los mioblastos esqueléticos, los cuales pueden tolerar un medio isquémico.

Células endoteliales vasculares. Pueden recogerse de arterias o venas autólogas con el fin de ser utilizadas para producir angiogénesis y neovascularización. (12) Se han trasplantado experimentalmente células maduras endoteliales expandidas *ex vivo* en miocardio isquémico y en extremidades. Esta posibilidad tiene la ventaja de iniciar y promover angiogénesis sin las limitaciones de liberar a la circulación simples proteínas (VEGF, bFGF). Las células endoteliales inducen un extenso plexo capilar, pero no pueden promover la formación de vasos suficientes para regenerar el miocardio isquémico. La asociación de terapia celular miogénica y angiogénica podría ser beneficiosa, ya que la prevascularización de escaras miocárdicas infartadas indudablemente debe mejorar las condiciones locales para la sobrevida de las células (precondicionamiento).

Células madre embrionarias. Pueden aislarse solamente desde la masa celular interna de la blástula a partir del sexto día del desarrollo, puesto que la masa celular externa da origen a la placenta. Estas células están caracterizadas por su capacidad para proliferar en un estado indiferenciado a través de un tiempo prolongado de cultivo. Pueden diferenciarse en cada tipo de tejido y formar derivados de las tres capas germinativas: ectodermo, mesodermo y endodermo. Desafortunadamente, su aplicación clínica debe vencer barreras inmunológicas y dilemas éticos. (9) Recientemente se ha demostrado que los cardiomiocitos puros pueden ser generados de células derivadas de embriones manipulados genéticamente, pero en estos casos existen posibilidades de desarrollo tumoral.

Líneas celulares. Derivadas de diferentes tipos celulares (células madre, células endoteliales, etc., son producidas comercialmente por laboratorios de biología celular. El principal inconveniente de estas líneas celulares de cultivos miogénicos inmortalizados es la potencialidad en la génesis tumoral que conllevan. A menos que este tema sea resuelto, aún constituye una limitación para su aplicación clínica.

Cardiomiocitos auriculares como marcapasos cardíaco. La importancia de esta eventualidad consiste en trasplantar cardiomiocitos dentro del ventrículo izquierdo con una alta posibilidad de automatismo intrínseco. Por lo tanto, estas células pueden actuar como un marcapaso ectópico acoplado funcionalmente a los cardiomiocitos nativos. Dentro de la pared libre del ventrículo izquierdo pueden implantarse cardiomiocitos auriculares fetales disociados, incluso células del nódulo sinusal. Estudios experimentales demostraron la sobrevida de las células injertadas, la formación de uniones intercelulares entre las células donantes y las del huésped y la generación espontánea de señales eléctricas dentro de una morfología de complejos QRS en ritmos de escape. (26) El trasplante de cardiomiocitos como marcapasos cardíaco puede abrir una nueva perspectiva en el tratamiento de las arritmias cardíacas, apertura ésta que alcanza desde aquellos infantes y prematuros con bloqueos congénitos auriculoventriculares hasta los pacientes con bloqueos adquiridos.

MECANISMOS DE ACCION

El mecanismo por el cual las células implantadas mejoran la función cardíaca permanece en controversia. Varios factores se han involucrado directa o indirectamente como contribuyentes en los beneficios estructurales y funcionales luego del trasplante celular. Estudios experimentales han demostrado que el injerto de células musculares aumenta la elasticidad regional y cambia la matriz extracelular, lo cual previene el remodelado ventricular. Clínicamente, los mecanismos mencionados en los efectos benéficos de la cardiomioplastia celular son la reducción del tamaño y la fibrosis de las escaras infartadas, la limitación del remodelado ventricular posisquémico, el mejoramiento tanto en el espesor de la pared del ventrículo izquierdo como en su distensibilidad y el aumento en la contractilidad regional del miocardio (Tabla 1).

SELECCION DEL PACIENTE

Criterios de inclusión

La aplicación clínica para el trasplante celular recae en pacientes que presentan insuficiencia ventricular izquierda con escaras posisquémicas (acinéticas y metabólicamente no viables). La inyección celular precoz luego de un infarto de miocardio puede beneficiar la prevención de una escara fibrótica amplia. Sin embargo, parece razonable inyectar células solamente

Tabla 1
Cardiomioplastia celular. Mecanismos de acción

Remodelado ventricular

Reduce el tamaño y la fibrosis de las escaras infartadas
 Disminuye la dilatación ventricular
 Aumenta el espesor de la pared miocárdica
 Induce modulación en el remodelado de la matriz extracelular

Función diastólica

Mejora la tensión parietal del miocardio y su elasticidad
 Mejora la rigidez dinámica
 Invierte el deslizamiento diastólico

Función sistólica

Mejora el movimiento regional ventricular
 Incrementa la presión
 ¿Mejora la contracción ventricular global?

después de que la reacción inflamatoria se halle en retroceso.

Criterios de exclusión

Los pacientes con enfermedades del músculo esquelético deben ser excluidos del implante de mioblastos. Enfermos que tienen una historia de taquicardia ventricular sostenida o fibrilación, así como aquellos que tienen un cardiodesfibrilador implantable o son candidatos potenciales para su colocación deben ser evaluados cuidadosamente, ya que el trasplante celular induce arritmias como complicación potencial. También deben excluirse los candidatos que cursen una enfermedad infecciosa activa o con pruebas positivas de enfermedad viral.

EXPERIENCIA CLINICA

En un intento de reparar el daño miocárdico y de mejorar la función cardíaca hemos trasplantado células musculares esqueléticas (mioblastos autólogos) dentro de áreas ventriculares izquierdas infartadas en 18 pacientes. Todos ellos se encontraban dentro de los criterios de inclusión.

Pacientes

Los procedimientos de trasplante celular se realizaron en 18 pacientes (90% de sexo masculino), con una edad promedio de 61 ± 7 años. Los pacientes tenían un promedio en su clase funcional (NYHA) de 2,6, con una fracción de eyección medida por radioisótopos del $32\% \pm 5\%$. Presentaban escaras posisquémicas acinéticas y no viables en la pared del ventrículo izquierdo y tenían indicación quirúrgica para cirugía de revascularización en áreas remotas isquémicas y viables. El procedimiento fue aprobado por los Consejos Institucionales de Ética y antes de cada procedimiento se obtuvo el consentimiento escrito por parte del paciente.

Procedimientos

Luego de la inclusión del enfermo dentro de los criterios de admisión, bajo anestesia local se tomó una muestra para biopsia de 12 ± 3 gramos del músculo vasto lateral. En el laboratorio de biología celular las células madre del músculo esquelético (mioblastos) se aislaron y expandieron *in vitro* en un plazo de 17 ± 4 días hasta alcanzar la cantidad de 300 ± 20 millones (Figura 1). Las células se cultivaron sin citoquinas en un medio humano; éste consistió en el suero obtenido del propio paciente desde una unidad de sangre (5 casos) o por plasmaféresis (13 casos). Luego sufrieron un paso previo al trasplante en el sexto día del cultivo, el cual consistió en la depleción del cultivo de fibroblastos. Las muestras en las cuales la pureza de mioblastos fue menor del 30% fueron sometidas a selección para CD56 células positivas, para lo cual se usaron métodos micromagnéticos de inmunocuentas. En el momento del implante, el promedio de mioblastos era del $78 \pm 5\%$ y el porcentaje de células viables, del $95 \pm 3\%$. Luego las células se diluyeron en albúmina humana y medios de cultivo y se colocaron en una jeringa lista para ser inyectada. La solución incluyó células musculares (5 ml), que se injertaron a través de 12 ± 4 puntos de inyección dentro del ventrículo izquierdo en las áreas infartadas con una aguja oftálmica retrobulbar de 25G x 40 mm. Las inyecciones se realizaron durante el tiempo de la cirugía de revascularización; estos enfermos tenían un promedio de 1,9 puente coronario por paciente.

Resultados preliminares

Todos los pacientes tuvieron una buena recuperación posoperatoria con un tiempo de estadía en la Unidad de Cuidados Intensivos de $3 \pm 2,2$ días. En el seguimiento promedio de 9 ± 3 meses no se observó mortalidad, arritmias ni desarrollo de enfermedades malignas. La ventriculografía radioisotópica ha demostrado un incremento en la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (del $32\% \pm 5\%$ al $51\% \pm 3,7\%$, $p = 0,03$). Por su parte, los estudios ecocardiográficos demostraron una mejoría en el índice de motilidad parietal de 1,72 a 1,25 ($p = 0,04$). El tamaño de la escara del infarto se redujo significativamente: de 19 ± 5 cm² a 7 ± 3 cm² ($p < 0,05$). Las pruebas de viabilidad miocárdica demostraron áreas nodulares de regeneración.

Los pacientes pasaron de una clase funcional (NYHA) promedio de 2,6 a 1,3. Los mejores resultados se obtuvieron en aquellos pacientes que presentaban un área de infarto heterogéneo (apariencia en parche), es decir, con combinación de tejido miocárdico viable y múltiples pequeñas escaras. De este modo, una "fibrosis vascularizada" parece ser la mejor indicación para la cardiomioplastia celular más que un área posinfarto "no vascularizada".

La asociación de cirugía coronaria con la cardiomioplastia celular fue impuesta por el Consejo Institucional de Ética y de este modo la contribución

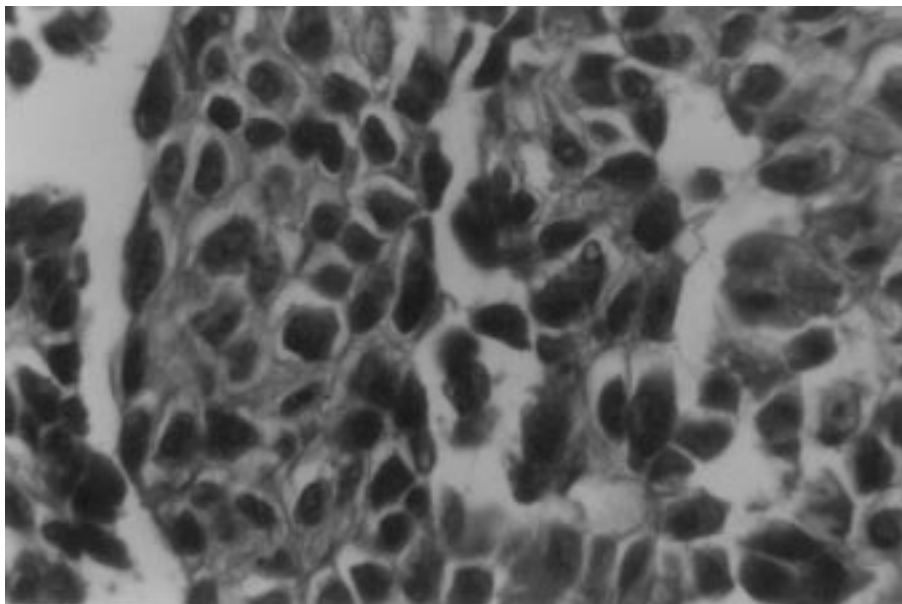


Fig. 1. *Mioblastos cultivados durante 3 semanas.*

de cada procedimiento –revascularización miocárdica e injerto celular– no es fácil de elucidar, más allá de que los implantes se realizaron en zonas sin ninguna actividad metabólicamente viable.

ESTUDIOS CLINICOS

Desde junio de 2000 se han tratado más de 100 pacientes con enfermedad miocárdica isquémica en todo el mundo en varios estudios clínicos de terapia celular. El número de pacientes tratados con mioblastos esqueléticos autólogos fue equivalente a aquellos tratados con células madre de la médula ósea. La mayoría de estos estudios clínicos son conducidos por investigadores independientes. (21, 27-34) Las distribuciones geográficas son las siguientes:

Europa

En Francia se realizaron estudios clínicos (Assistance Publique, Hopitaux de París) en los que 15 pacientes isquémicos recibieron implante de mioblastos esqueléticos asociados con cirugía coronaria. En España, los mioblastos se implantaron quirúrgicamente en 13 casos realizados en Pamplona y Salamanca y también se logró el implante en forma percutánea de células de la médula ósea en 3 casos en Valladolid. En Holanda (Thorax Center, Rotterdam), los procedimientos de implantes de mioblastos se efectuaron en 13 pacientes con métodos específicos de cardiología intervencionista (Myocath Bioheart and Myostar Cordis, Johnson & Johnson). En Alemania se implantaron células del estroma de la médula ósea a través de las arterias coronarias después de angioplastias percutáneas (Dusseldorf Clinic) y también quirúrgicamente (Rostock University). En Frankfurt, 20 pacientes con infarto agudo de miocardio reperfundidos fueron

aleatorizados y recibieron infusión intracoronaria de médula ósea ($n = 9$) o células progenitoras circulantes en sangre dentro de la arteria obstruida. Las inyecciones celulares se realizaron $4,3 \pm 1,5$ días después del infarto. En Italia (Hospitales de Padua y Milán) se implantaron células del estroma de la médula ósea en escaras infartadas en 5 pacientes. En Polonia (Poznan University Hospital) se injertaron mioblastos en 10 pacientes durante el curso de cirugías de revascularización miocárdica. En la Universidad de Leicester (Reino Unido), en el momento de la cirugía se implantaron células mononucleares autólogas de la médula ósea obtenidas por aspiración esternal en tejidos cardíacos fibróticos en 14 pacientes.

América

Desde septiembre de 2000, en los Estados Unidos (Temple University Hospital, UCLA, Cleveland Clinic Heart Center, University of Michigan and Arizona Heart Institute) se han realizado implantes clínicos de mioblastos dentro de áreas infartadas en colaboración con Diacrin, Inc. (Charlestown, MA). En esta fase I, los estudios clínicos fueron no ciegos y el injerto de mioblastos autólogos dentro del miocardio isquémico se realizó durante la cirugía coronaria o la colocación de un aparato de asistencia ventricular izquierda. En el Arizona Heart Institute se llevaron a cabo en 16 casos, en 11 oportunidades durante la cirugía coronaria y en los 5 restantes en el momento del implante de asistencia mecánica. Estos pacientes presentaban infartos miocárdicos previos y una fracción de eyección del ventrículo izquierdo menor del 30%. Recientemente, la Food and Drug Administration aprobó un estudio clínico con la firma Bioheart Inc. (implante quirúrgico de mioblastos) para ser realizados en el Mount Sinai Hospital (New York), Duke University

(Durham, NC) y American Cardiovascular Research Institute (Atlanta, GA). Genzyme Corporation, por su parte, anunció un estudio clínico con implantes quirúrgicos de mioblastos en 300 pacientes, para ser realizados en América y Europa (Myoblasts Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy: MAGIC Clinical Trial). En los estudios clínicos de Genzyme y Bioheart está contemplada la asociación de desfibriladores cardioimplantables.

En la Argentina (Hospital Presidente Perón) se implantaron durante la realización de cirugía coronaria 5 pacientes. En esta experiencia se utilizó un protocolo basado en la revascularización de cara anterior sin circulación extracorpórea y el implante concomitante de 200/300 millones de mioblastos en áreas remotas y comprobadas no viables por dos métodos como mínimo. El objetivo de este estudio es la reactivación de la motilidad parietal en áreas absolutamente acinéticas. En este mismo hospital últimamente se injertó un sexto paciente con *stem cells* derivadas de la médula ósea (cresta ilíaca).

En Brasil (Incor, San Pablo) se implantaron células madre de médula ósea en 3 pacientes mediante un abordaje percutáneo.

Asia

En Japón (Yamaguchi University, Ube) 10 pacientes recibieron implantes de células del estroma de la médula ósea durante la realización de cirugía coronaria. En China (Hong Kong University), 8 pacientes fueron implantados con células del estroma de la médula ósea mediante un catéter; mientras que 3 casos se llevaron a cabo en la Nanjing Medical University. En Singapur (National University Hospital) se realizó el implante quirúrgico de mioblastos en un caso.

DISCUSION

La cardiomioplastia celular en nuestra experiencia clínica se realizó con el empleo de mioblastos autólogos expandidos con suero humano autólogo. Los beneficios mayores de lograr la expansión celular con suero humano autólogo estriba en que puede efectuarse sin riesgos de contaminación por priones, virus o zoonosis. Las técnicas tradicionales de cultivo comprenden el uso de suero fetal bovino para conseguir el crecimiento celular. El contacto de las células humanas con suero fetal bovino provoca después de tres semanas de cultivo la fijación de las proteínas animales en la superficie celular, lo cual representa un antígeno con posibilidades de efectos adversos. Luego del implante celular, la reacción inflamatoria produce la consecuente fibrosis. Los estudios anatomopatológicos realizados posteriormente a la cardiomioplastia celular con el uso de suero fetal bovino demostraron que las células trasplantadas fueron absorbidas dentro de la fibrosis sin neovascularización. (35, 36) Esta configuración histológica representa un riesgo por la posibilidad de establecer un circuito de microrreentrada, capaz de indu-

cir arritmias ventriculares severas por generación ectópica de impulsos. La experiencia clínica actual con la cardiomioplastia celular ha demostrado arritmias ventriculares severas significativas y muertes súbitas en pacientes en quienes sus células se cultivaron con suero bovino. Debido a esto, en algunos estudios clínicos (Genzyme Corp., Bioheart Inc.) se han indicado desfibriladores cardíacos implantables. Sin embargo, experiencias clínicas como la nuestra indican que cuando los cultivos de mioblastos fueron expandidos con el uso de suero humano autólogo, el riesgo de arritmia desaparece, lo cual evita la necesidad de cardiodesfibriladores. (37-39)

Las técnicas de abordaje utilizadas para implantar las células pueden influir en la eficacia de la cardiomioplastia celular. En efecto, la mortalidad celular que sigue a un implante celular parece muy importante cuando se colocan en el centro de una escara altamente fibrótica, debido a la disminución del oxígeno y de nutrientes que conlleva el miocardio isquémico. El implante de células preferentemente en áreas periféricas (zonas intermedias entre escaras y miocardio normal) y la asociación con la angiogénesis terapéutica pueden mejorar la sobrevida celular. Sin embargo, es posible que puedan llegar a ser necesarios repetidos y periódicos implantes de células para reducir progresivamente el tamaño del infarto en miocardiopatías isquémicas o gradualmente mejorar la enfermedad en miocardiopatías no isquémicas. Esta opción deberá simplificarse con el desarrollo de un catéter percutáneo con el fin de injertar las células (Tabla 2).

Las explicaciones en el mecanismo por el cual las células mejoran la *performance* del corazón son discutidas. Varios factores, en forma directa o indirecta, contribuyen a lograr los beneficios estructurales y funcionales. El implante de células musculares incrementa la elasticidad regional y modifica la matriz celular con el fin de prevenir el remodelado ventricular. De este modo, las células injertadas en el área del infarto contribuyen a tratar de evitar el adelgazamiento de la escara y la dilatación del ventrículo (efecto de bastidor). El mecanismo que demuestre la

Tabla 2
Vías de abordaje para implante celular

Epicárdico

Quirúrgico: convencional o mínimamente invasivo
Toracoscopia

Endoventricular

Cateterismo, con la siguiente guía de procedimiento
- Mapeo electromecánico 3D
- Fluoroscopia biplana y guía ultrasónica

Intravasculares

Intracoronario
Intravenosa coronaria
Intravenosa sistémica

transmisión y la propagación de los impulsos eléctricos desde el corazón nativo a las células injertadas aún no se ha elucidado. Respuestas al estímulo mecánico ejercidas por los cardiomiocitos circundantes pueden ser las responsables de inducir esta contracción. De allí que el mejoramiento en la función ventricular se obtiene a través de una combinación de factores.

PERSPECTIVAS

El trasplante celular se está reconociendo como una estrategia factible para mejorar la viabilidad miocárdica y limitar el infarto. Por otra parte, el trasplante celular combinado con el marcapaseo cardíaco actualmente está en investigación en nuestros grupos. En un modelo experimental de infarto de miocardio se está realizando implante de mioblastos junto con marcapaseo auricular biventricular sincronizado con el uso de electrodos epicárdicos. Estos estudios demostraron mejoría en la distribución celular, desarrollo de miotubos y aumento de cadenas lentas de miosina, las cuales implican una mejor adaptación al trabajo cardíaco. Este abordaje combinado de resincronización auriculoventricular resulta en un mejoramiento de los síntomas de insuficiencia cardíaca. (20, 21) La electroestimulación en la cardiomioplastia celular debería tener un papel importante en la transformación de un procedimiento celular pasivo en un "soporte celular dinámico".

Las mejores perspectivas para programas experimentales futuros son el acondicionamiento para la diferenciación de las células madre antes del trasplante, el mejoramiento del acoplamiento electromecánico entre las células implantadas y las nativas y la optimización en el promedio de células que sobrevivan al procedimiento del trasplante. La asociación de terapéuticas angiogénicas previo a la miogénesis celular parece estar justificada en la facultad de inducir prevascularización en escaras posinfarto. Nosotros esperamos que en un futuro cercano las células autólogas puedan ser utilizables como un recurso cotidiano para la regeneración de los tejidos en los pacientes con miocardiopatías. (40) Es posible que deban ser necesarias repetidas y periódicas inyecciones celulares por procedimientos a través de un catéter para recolonizar progresivamente escaras miocárdicas con tejidos vivos. La regeneración miocárdica por medio de la cardiomioplastia celular conlleva la promesa de restaurar la función ventricular en aquellos pacientes que presentan un infarto miocárdico extenso o una miocardiopatía dilatada idiopática. (41, 42)

SUMMARY

Cellular cardiomyoplasty

The goal of cellular cardiomyoplasty (*i.e.*: intramyocardial cell grafting) is to limit the consequences of the decreased contractile function and compliance of damaged ventricles

following myocardial infarction. A cell-based therapeutic approach for post-ischemic scars is particularly attractive due to the potential for myocardial regeneration of a variety of myogenic and angiogenic cell types: skeletal myoblasts, bone marrow-derived mesenchymal stem cells, circulating blood-derived progenitor cells, smooth muscle cells, vascular endothelial cells, and embryonic stem cells. Cellular cardiomyoplasty using autologous skeletal myoblasts was performed by our centers in 18 patients. Over 100 patients have been treated worldwide. Inclusion criteria for adult patients were: a low ejection fraction, akinetics and non-viable post-infarction scar. Cell-based myogenic therapy seems to reduce the size and fibrosis of infarct scars, limit post ischemic remodeling, and restore regional myocardial contractility in patients following extensive myocardial infarction. Techniques for skeletal myoblasts culture and *ex vivo* expansion using autologous patient serum (obtained from plasmapheresis) have been developed. These techniques yield over 300 million cells in 3 weeks, of which more than 70% are myoblasts. Cell viability at the moment of injection is greater than 90%. The main benefits of human autologous serum cell culture is that it can be performed without risk of prion, viral or zoonoses contamination. Traditional cell cultures techniques involve the use of fetal bovine serum for cell growth. Contact of human cells with fetal bovine serum results after 3-week in fixation of animal proteins on the cell surface, representing an antigenic substrate for immunological adverse events. After cell implantation an inflammatory reaction occurs in these cases with subsequent fibrosis. Malignant ventricular arrhythmias and sudden deaths have been reported following serum bovine-cultivated cell therapy; in many cases this complication required the implantation of cardioverter-defibrillators. In this article we present a total autologous cell culture technique for myocardial regeneration and preliminary clinical results.

Key words: Cell transplantation - Heart failure - Myocardial infarction

BIBLIOGRAFIA

1. Carpentier A, Chachques JC, Grandjean P. Cardiac Bioassist. New York: Futura Publishing; 1997. p. 1-632.
2. Chachques JC, Shafy A, Duarte F, Cattadori B, Goussef N, Shen L, et al. From dynamic to cellular cardiomyoplasty. *J Card Surg* 2002;17:194-200.
3. Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, Finato N, Beltrami CA, Nadal-Ginard B, et al. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med* 2002;346:5-15.
4. Trainini JC, Cichero D, Bustos N. Cardioimplante celular autólogo. *Rev Argent Cardiol* 2002;70:137-142.
5. Taylor DA, Hruban R, Rodríguez ER, Goldschmidt-Clermont PJ. Cardiac chimerism as a mechanism for self-repair: does it happen and if so to what degree? *Circulation* 2002;106:2-4.
6. Rajnoch C, Chachques JC, Berrebi A, Bruneval P, Benoit MO, Carpentier A. Cellular therapy reverses myocardial dysfunction. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001;121:871-8.
7. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001;410:701-5.
8. Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, Merante F, Mickle DA. Smooth muscle cell transplantation into myocardial scar tissue improves heart function. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31:513-22.
9. Min JY, Yang Y, Sullivan MF, Ke Q, Converso KL, Chen Y, et al. Long-term improvement of cardiac function in rats after infarction by transplantation of embryonic stem cells. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;125:361-9.

10. Chiu RC. Therapeutic cardiac angiogenesis and myogenesis: the promises and challenges on a new frontier. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001;122:851-2.
11. Kawamoto A, Tkebuchava T, Yamaguchi J, Nishimura H, Yoon YS, Milliken C, et al. Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circulation* 2003;107:461-8.
12. Kim EJ, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Jia ZQ, Tomita S, et al. Angiogenesis by endothelial cell transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001;122:963-71.
13. Chachques JC, Duarte F, Herreros J, Prosper F, Giambroni R, Julia P, et al. Cellular myogenic and angiogenic therapy for patients with cardiac or limb ischemia. *Basic Appl Myol* 2003;13:29-38.
14. Lee RJ, Springer ML, Blanco-Bose WE, Shaw R, Ursell PC, Blau HM. VEGF gene delivery to myocardium: deleterious effects of unregulated expression. *Circulation* 2000;102:898-901.
15. Marshall E. Gene therapy. What to do when clear success comes with an unclear risk? *Science* 2002;298:510-1.
16. Huang B, Dreyer T, Heidt M, Yu JC, Philipp M, Hehrlein FW, et al. Insulin and local growth factor PDGF induce intimal hyperplasia in bypass graft culture models of saphenous vein and internal mammary artery. *Eur J Cardiothorac Surg* 2002;21:1002-8.
17. Chachques JC, Duarte F, Shafy AB, Cattadori B, Lila N, Giambroni R, et al. Angiogenic growth factors and/or cellular therapy for myocardial regeneration: a comparative study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003 (in press).
18. Chachques JC, Marino JP, Lajos P, Zegdi R, D'Attellis N, Fornes P, et al. Dynamic cardiomyoplasty: clinical follow-up at 12 years. *Eur J Cardiothorac Surg* 1997;12:560-7.
19. Trainini J, Cabrera Fischer EI, Barisani J, Christen AI, Mouras J, de Paz J, et al. Dynamic aortomyoplasty in treating end-stage heart failure. *J Heart Lung Transplant* 2002;21:1068-73.
20. Chachques JC, Shafy A, Cattadori B, Duarte F, Shen L, Meimoun P, et al. Electrostimulation enhanced fatigue resistant myosin expression in cellular cardiomyoplasty. *Circulation* 2001;104:555-6.
21. Chachques JC, Cattadori B, Herreros J, Prosper F, Trainini JC, Blanchard D, et al. Treatment of heart failure with autologous skeletal myoblasts. *Herz* 2002;27:570-8.
22. Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P, Jones TR, Reedy MC, Hutcheson KA, et al. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med* 1998;4:929-33.
23. Trainini JC, Lago N, de Paz J, Cichero D, Giordano R, Mouras J, et al. Trasplante de mioblastos esqueléticos para reparo de necrosis miocárdica. *Rev Argent Cardiol* 2002;70:324-7.
24. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-González XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418: 41-9.
25. Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Jia ZQ, Kim EJ, Sakai T, et al. Autologous porcine heart cell transplantation improved heart function after a myocardial infarction. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000;119:62-8.
26. Ruhparwar A, Tebbenjohanns J, Niehaus M, Mengel M, Irtel T, Kofidis T, et al. Transplanted fetal cardiomyocytes as cardiac pacemaker. *Eur J Cardiothorac Surg* 2002;21:853-7.
27. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernández A, Sorg RV, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002;106:1913-8.
28. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, et al. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002;106:3009-17.
29. Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, et al. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 2001;357:279-80.
30. Hamano K, Nishida M, Hirata K, Mikamo A, Li TS, Harada M, et al. Local implantation of autologous bone marrow cells for therapeutic angiogenesis in patients with ischemic heart disease: clinical trial and preliminary results. *Jpn Circ J* 2001;65:845-7.
31. Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, et al. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003;361:45-6.
32. Tse HF, Kwong YL, Chan JK, Lo G, Ho CL, Lau CP. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet* 2003;361:47-9.
33. Galinanes M, Loubani M, Davies J, Chin D, Pasi J, Bell P. Safety and efficacy of transplantation of autologous bone marrow into scarred myocardium for the enhancement of cardiac function in man. *Circulation* 2002;106:II-463.
34. Dib N, McCarthy P, Campbell A, Dinsmore J, Yeager M, Pagani FD, et al. Safety and feasibility of autologous myoblast transplantation in patients with ischemic cardiomyopathy: Interim results from the United States experience. *Circulation* 2002;106:II-463.
35. Hagege AA, Carrion C, Menasche P, Vilquin JT, Duboc D, Marolleau JP, et al. Viability and differentiation of autologous skeletal myoblast grafts in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet* 2003;361:491-2.
36. Pagani FD, DerSimonian H, Zawadzka A, Wetzel K, Edge AS, Jacoby DB, et al. Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischemia-damaged myocardium in humans. Histological analysis of cell survival and differentiation. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:879-88.
37. Cosin Sales J, Herreros J, Pérez A, Rabago G, Prosper F, Chachques JC. Regeneración cardíaca y terapia celular. *Corazón y Circulación* 2001;1:5-9.
38. Prosper F, Perezi A, Merino J, Rabago G, Chachques JC, Hernández M, et al. Adult stem cells for myocardial repair. *Basic Appl Myol* 2003;13:15-22.
39. Trainini JC, Cichero D, Lago N, Giordano R, de Paz J, Elenchwaj B, et al. Autologous cellular cardiac-implant. *Basic Appl Myol* 2003;13:39-44.
40. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet*. 2002;360:427-35.
41. Kao RL, Chiu RC. Cellular cardiomyoplasty: myocardial repair with cell implantation. New York: Landes Bioscience and Chapman & Hall Publishers; 1997. p. 1-194.
42. Chachques JC, Carpentier A. Cellular myoplasty: what are we really trying to achieve? *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002;123:583-4.