

Cardioimplante celular autologo

JORGE C. TRAININI, DANIEL CICHERO, NORMA BUSTOS

RESUMEN

El infarto agudo de miocardio determina una disminucion tanto de la capacidad funcional de los miocitos como de la integridad estructural del corazon. Por otra parte, el trasplante celular para reparar o regenerar el miocardio lesionado es un nuevo impulso en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares. La ventaja clinica de este procedimiento, denominado cardioimplante celular, para la reparacion cardiaca es obvio como idea, debido a que la implantation autologa de mioblastos evita dificultades logisticas presentes en otros tratamientos. Los mioblastos autologos provenientes del musculo esqueletico constituyen las celulas mejor estudiadas para el reparo cardiaco. Hasta el momento, en el mundo se han tratado veinte pacientes. Sin embargo, la era del implante celular recién comienza. Que tipo de celula es la mejor y cual es su eficacia son cuestiones remanentes. Todavía no es bien conocido si el injerto puede desarrollar acoplamiento electromecanico con el resto del corazon para latir sincronicamente. El cardioimplante celular autogenico ofrece la posibilidad de restaurar la funcion regional en pacientes que sufrieron un infarto de miocardio. Estudios venideros deberan establecer la eficacia de este metodo pionero.

Palabras clave Cardioimplante celular - Cardiomioplastia celular - Regeneration cardiaca - Mioblastos

INTRODUCCION

La insuficiencia cardiaca es una causa importante de morbimortalidad. De acuerdo con el estudio Framingham, la sobrevivida anual para pacientes con falla cardiaca es del 57% para los hombres y del 64% para las mujeres, pero a los cinco años el seguimiento ha disminuido estas cifras al 25% y el 38%, respectivamente. (1)

La insuficiencia cardiaca cronica no es solamente un problema medico sino tambien social y economico. El trasplante cardiaco, la cirugia de revascularizacion miocardica, la correccion de la insuficiencia mitral, la resincronizacion biventricular, los procedimientos con utilizacion de musculos esqueleticos y los dispositivos mecanicos han solucionado algunos de los problemas, pero son escasos en relation con la necesidad que esta dificultad plantea. (2, 3) Tambien estos tratamientos son pasibles de complicaciones ciertas y de altos costos. (4)

Es bien conocido que el musculo cardiaco lesionado es reemplazado por tejido fibrotico. La hiper-

trofia celular puede compensar parcialmente la disminucion de la contractilidad, pero el cortejo de remodelado lleva al cuadro de la insuficiencia cardiaca progresiva. Marelli y colaboradores (5) utilizaron a partir de 1992 mioblastos indiferenciados cultivados para reparar tejido cardiaco no viable en trabajos de investigation. Luego de la fase previa experimental, (6) en el año 2000 se inicio la aplicacion de este procedimiento en seres humanos a traves de un grupo frances liderado por Menasche. (7) Hasta el momento en el mundo se ha llevado a cabo en 20 pacientes distribuidos en Francia, Japon, Holanda, Italia, Alemania, Estados Unidos y la Argentina.

La reparacion del tejido cardiaco con las propias celulas del organismo (reparo autogenico) ofrece un ambito fascinante en la consideration de una nueva conception terapeutica. (8, 9) La combination de la genetica con la biologfa celular ha posibilitado realizar cultivos celulares en el desarrollo de determinadas lineas filogeneticas para proceder al

autorreparo de organos afectados. No solo es factible en este paradigma medico -que puede inaugurar una nueva era en el tratamiento- encontrar soluciones para el corazon, sino tambien para otras areas como las enfermedades neurologicas, hepaticas, diabetes, miopatias y alteraciones osteoarticulares. (10-12)

REPARACION CARDIACA AUTOLOGA

El concepto clasico le asigna a los cardiomiocitos la capacidad de replicarse hasta los 3 a 4 meses de edad posnatal. (13) Es decir, a poco del nacimiento existe un numero determinado de cardiomiocitos y a partir de ese momento ya no podrian ser reemplazados y su cantidad decreceria gradualmente.

En la eventualidad de un infarto agudo de miocardio o en el curso de un proceso cronico como puede ser la hipertension arterial, es dable observar la muerte de cierta cantidad de cardiomiocitos. La zona muerta es reemplazada con una escara fibrosa, lo cual trae concatenado el remodelado ventricular. Todo este mecanismo forma parte del desarrollo gradual de la insuficiencia cardiaca. (14)

Sin embargo, este conocimiento no regenerativo del miocardio debe ser revisado a la luz de los ultimos hallazgos. (15-17) Es asf que Nada.l-Ginard (18) ha puesto de manifiesto el equilibrio que existe entre los estfmulos implicados en el crecimiento del tamano de los miocitos y los que llevan a la necrosis y la apoptosis.

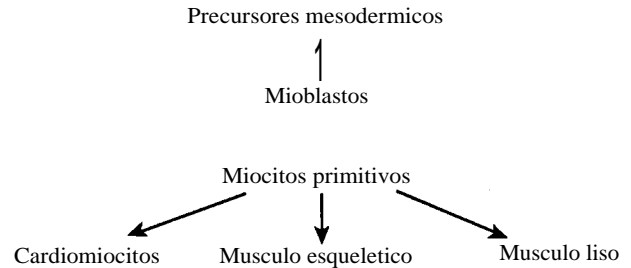
Los datos experimentales en ratones han mostrado que la tasa diferencial entre el nt mero de celulas cardiacas que mueren y la cantidad total de celulas que configuran la masa ventricular implican la posibilidad de un recambio activo. Si no hubiera esta suplencia, la perdida de la masa celular se haria insostenible. Este concepto implica una nueva vision sobre el envejecimiento cardiaco. El corazon se regeneraria completamente en un lapso menor a los 5 anos. (19)

El procedimiento de reparar en el corazon su zona fibrotica con celulas filogeneticamente emparentadas y cultivadas puede denominarse "cardioimplante celular autologo" y su fin es lograr la recuperacion estructural y funcional de la zona afectada.

Las celulas que poseen potencialidad para el desarrollo de la correccion cardiaca pueden ser de procedencia diversa. Obviamente, en este desarrollo tenemos en cuenta su derivacion autogenica y excluimos tanto las de origen alogenico como las transgenicas, las cuales se alejan del concepto de autorreparo.

Tipos celulares autogenicos

1. **Cardiomiocitos adultos.** Son de reproduccion dificil y el material deberfa obtenerse por biopsia endomiocardica. Requieren, ademas, una suplencia



Esquema 1. Línea evolutiva desde las células primitivas hasta las diferenciadas.

vascular mayor que la que necesitan los mioblastos. (20)

2. **Mioblastos.** Proviene del musculo esqueletico y se denominan tambien celulas satelite. Son de facil multiplicacion y las mas estudiadas, lo cual ha permitido su aplicacion en la fase clfnica. (21, 22) Estan ubicados en la membrana basal en caracter latente hasta que un estimulo puede disparar su replica. Los mioblastos se hallan en la lfnea celular que se extiende desde la celula indiferenciada mesodermica hasta las diferenciadas cardiaca, esqueletica y tambien del mdsculo liso (23) (Esquema 1).

Apesar de que estas celulas se implantan en areas infartadas, estas zonas nunca son del todo avasculares y por otra parte los mioblastos tambien son resistentes a la isquemia, lo cual permitiria el crecimiento y la multiplicacion en un medio optimo de nutricion.

Entre los mioblastos y los cardiomiocitos existen dos diferencias fundamentales. Los primeros no tienen conexiones intercelulares (*gap junctions*) ni receptores de dihidroperidinas.

Conexiones intercelulares. Las uniones entre celulas se denominan discos intercalares. (24) Proveen interdependencias electricas y mecanicas. (25) Estos discos incluyen tres estructuras especializadas: a) *Gap junction*. Esta union establece una conexion electrica y contiene una proteina llamada conectina 43. Las otras dos, b) *fascia adherens* y c) *desmosoma*, son las responsables de las dependencias mecanicas, a traves de las proteinas N-caderina y desmogleina respectivamente. La caderina y la conectina son los marcadores clasicos de las uniones celulares.

Receptores de dihidroperidinas. Son los responsables de transformar el impulso electrico en energia cinetica. Se ha trabajado en celulas satelite para conseguir, a traves de transformaciones geneticas, la integracion de este receptor.

3. **Celulas musculares lisas.** Proviene de las paredes arteriales.

4. **Celulas madre (stem cells).** Son celulas indiferenciadas, pluripotenciales y se hallan en la medula osea. (26, 27)

Trabajos de Ferrari y colaboradores (28) dieron origen al concepto de regeneracion del propio miocardio como alternativa al trasplante cardiaco. Este concepto se baso en la utilizacion de una celula muy primitiva ubicada en la estroma de la medula osea, capaz de diferenciarse en cualquier tipo celular. (29, 30) Esta celula es la llamada celula madre (*stem cell*) y su ubicacion histologica determina la diferenciacion en un tipo celular dado por la induccion del medio. Sorprendentemente, tambien se han hallado celulas madre en el corazon, las cuales se encuentran en latencia en el corazon normal, pero estimuladas con factores de crecimiento ingresan en division celular acelerada.

En el laboratorio se ha probado esta potencialidad y se ha logrado regenerar zonas de miocardio infartado-fibrotico, no solamente a nivel de los cardiomiocitos, sino tambien al de celulas endoteliales y celulas musculares lisas. Experiencias de Wang y colaboradores (31, 32) insinuan que en el miocardio normal estas celulas pueden generar cardiomiocitos, pero que en un medio de tejido fibrotico podrian desarrollar celulas con caracteristicas fibroblasticas.

Existen estudios experimentales sobre cardiomiocitos embrionarios-fetales y celulas embrionarias pluripotenciales a partir del mesodermo, las cuales se alejan del concepto de reparo autogenico, que implican ademas problemas eticos y necesidad de tratamiento inmunosupresor. Tambien se pue-

den incluir lfneas celulares obtenidas por ingenieria biologica, pero su inconveniente se halla dado por su potencialidad oncogenica.

Cultivo de mioblastos

El cultivo de mioblastos esqueléticos, aunque presenta algunas modificaciones, no se aparta demasiado del metodo utilizado para otro tipo de celulas. Es imprescindible una tecnica depurada y absolutamente esteril, lo cual es fundamental en el ambiente de trabajo, en los elementos de plastico y vidrio, en el manipuleo por parte del investigador y en las soluciones empleadas para el crecimiento celular.

El tejido que se emplea es un fragmento de musculo esquelético (vasto lateral externo, deltoides) de aproximadamente 2 cm³, equivalentes a 5 a 8 gramos (Figura 1). Todos los pasos del procedimiento deben llevarse a cabo bajo una campana de flujo laminar. Del fragmento de musculo deben separarse todos los tejidos aledanos (aponeurosis, septos fibrosos, tejido adiposo). Los pasos siguientes corresponden a la digestion enzimatica del macerado con enzimas (colagenasa, tripsina). Este tejido se siembra e incuba a 37°C con CO₂ al 5% y saturacion de humedad. Mediante observacion periodica al microscopio se detecta el grado de confluencia alcanzado (75% a 80%) con el fin de realizar los repiques necesarios hasta lograr un cultivo de alrededor de 200 a 250 millones de celulas (Figura 2). El proceso se completa en el miocardio fibrosado a traves de una serie de implantes, cuyo numero y orientacion esta regulado en funcion del tamano de la zona infartada.

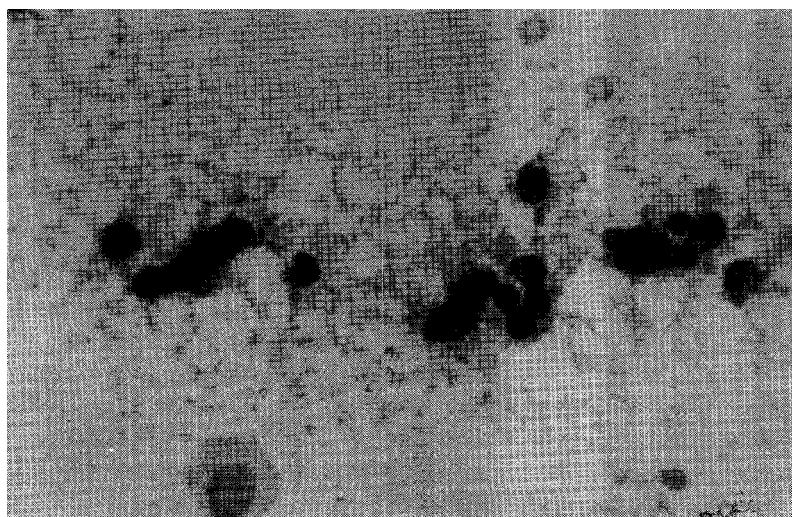


Fig. 1. Mioblastos en cultivo con tincion antidesmina (tecnica PAP, x 400 aumentos). Perteneciente al paciente de la Argentina al inicio del cultivo.

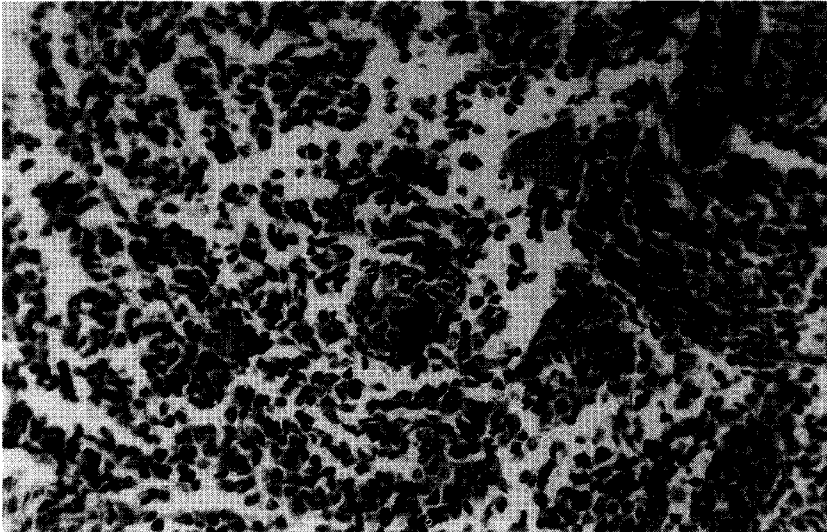


Fig. 2. Mioblastos en estado de confluencia con tendencia a la disposicion fascicular, cuatro semanas despues de la Figura 1 (tecnica HE, x 200 aumentos). Perteneciente al paciente de la Argentina en el momento de ser introducidos en el miocardio fibrosado.

MECANISMOS DE ACCION

En estudios experimentales, los cambios observados implican la organizacion de los mioblastos implantados en miotubos y miofibras, lo cual contribuye a la mejoría contractil observada en la investigación animal y en la fase clinica. Se han registrado otros datos:

- a) Incremento en la *performance* contractil medida con dP/dt *in vitro* o ecocardiografía y sonomicrometría *in vivo*.
- b) Mejoría en la función diastólica por reemplazo de tejido fibrotico con aumento de la elasticidad. (33)
- c) Incremento del grosor ventricular en la region del infarto.
- d) Disminucion de la posibilidad de dilatación ventricular.
- e) Producción de factores angiogenicos por las celulas injertadas.

Otra posibilidad para aumentar el rendimiento es la asociacion del trasplante celular a factores de crecimiento de fibroblastos (bFGF) y del endotelio vascular (VEGF).

El acoplamiento electromecánico entre el musculo cardiaco y las celulas implantadas aun debe demostrarse fehacientemente *in vivo*, debido a una baja regulacion de la N-caderina y la conectina 43 en las fibras esqueleticas. Se debe conseguir -de acuerdo con los trabajos experimentales desarrollados- la expresión persistente de estas proteínas, con el fin de comprobar la invasion de la barrera del tejido fibroso por las celulas implantadas. El control con un marcador especifico, como lo es la troponina, puede ser util en la evolucion del estado del injerto. Tambien se ha hallado, en estudios experimentales de regeneracion miocárdica con celulas satélite, el hallazgo histológico de actividad 13-galactosidasa si el implante permanece viable.

Los estudios experimentales y el desarrollo de la fase clinica se hallan referidos a modelos de zonas infartadas con escaras fibrosas. Aún no existen protocolos experimentales para avanzar con esta terapeutica sobre la cardiomiopatía dilatada idiopática.

EXPERIENCIA CLINICA

Los pacientes tratados en el mundo con esta tecnica suman 20, a partir de junio de 2000, cuando Menasche llevó a cabo en Paris el primer caso clinico. Hasta este momento Francia acumulo 10 casos, Japan 5 y un paciente cada uno Italia, Alemania, Holanda, los Estados Unidos y la Argentina.

Las experiencias de Francia y la Argentina se realizaron con cirugía de revascularización concomitante en áreas isquémicas que no tenían relación con la zona tratada mediante cardiimplante celular. El primer paciente de Paris paso de una clase funcional III y una fracción de eyección del 20% a clase funcional II y 30%, respectivamente, y se halló contracción en la cara inferior injertada con celulas. (7) En total, los 10 pacientes de ese grupo mejoraron la fracción de eyección en un 13% y 11 de los 18 segmentos tratados adquirieron contractilidad. En esta experiencia hubo una muerte temprana y alguna incidencia de arritmia.

El paciente de Holanda fue tratado en forma angiográfica a través del cateter especial "Bioheart", dentro de un programa que incluye 30 pacientes en tres hospitales. En los Estados Unidos, el paciente incluido se halla dentro de un protocolo de la FDA que utiliza corazones que son tratados con asistencia ventricular como un puente al trasplante cardiaco, a los cuales concomitantemente se les injertan celulas en áreas fibrosas para luego analizarlas cuando son explantados.

En Japon se utilizaron celulas madre autologas de la medula osea para efectuar el reparo cardiaco. El paciente de la Argentina fue sometido a cirugia de revascularizacion de la coronaria descendente anterior e injerto simultaneo de 250 millones de mioblastos en la cara inferior fibrotica.

CONCLUSIONES

El cardioimplante celular autologo inaugura una era promisoriosa en la terapeutica de las enfermedades cardiacas. (34) La sumatoria del conocimiento de disciplinas derivadas de la genetica y de la biologia celular permitiran instaurar en medicina un nuevo paradigma, el autorreparo celular no solo del corazon sino tambien de otros organos. Sin embargo, persisten varias cuestiones que aun deben dilucidarse para que esta posibilidad se transforme en terapeuticas posibles y habituales. LCual es la mejor celula para utilizar? LComo deben implantarse? implican preguntas para resolver mas ally de que por el momento los mioblastos en medios de cultivo constituyen las celulas mas estudiadas y confiables, incluso utilizadas en la experiencia clfnica.

Aspectos eticos derivados de una tecnica inicial hacen que el paciente elegido para este procedimiento no contemple unicamente el implante celular en las zonas fibroticas, sino tambien la revascularizacion de areas revascularizables en forma sincronica.

Solucionadas estas cuestiones habra que comprobar su eficacia real, comparandola con las tecnicas convencionales. Desde el punto de vista funcional, es de importancia la demostracion completa del acoplamiento electromecanico. Si bien se hallaron discos intercalares, responsables de las uniones intercelulares, en los implantes sobre territorios miocardicos normales, estos hallazgos no fueron comprobados ampliamente en las areas fibroticas.

La funcion ventricular regional no es de facil valoracion, como asimismo si la zona reparada con el implante celular adquiere la capacidad de latir al unisono con el resto del corazon. Estas dificultades deberan resolverse con la ayuda de diversos metodos de estudios (sonomicrometrfa, tomograffa con emision de tecnecio 99m, ecocardiografias). En resumen, esta modalidad del reparo cardiaco con celulas del propio organismo puede alcanzar una envergadura medica insospechada. Para que llegue a los niveles de factibilidad clfnica e indices de eficacia deba ampararse en Jas demostraciones histologicas y funcionales necesarias. El derrotero hacia la construccion de nuevas terapeuticas se podra recorrer si se halla contemplado el concepto multidisciplinario al que debe propender toda ciencia, parangonando al poeta frances Arthur Rimbaud en su sentencia "nuestra palida razon nos oculta el infinito". Una simbiosis entre ciencia y fe.

SUMMARY

AUTOLOGOUS CELL CARDIAC-IMPLANT

Acute myocardial infarction leads to loss of functional myocytes and structural integrity of heart. On the other hand, cell transplantation to repair or regenerate injured myocardium is a new development in the treatment of cardiovascular disease. The clinical advantage of his approach called cellular cardiac-implant for myocardial repair is obvious because autologous myoblast implantation avoids logistic difficulties present in cardiac transplant, as well as the immunosuppressive therapy. Autologous skeletal myoblasts appear to be the best characterized, the most appropriate and best first generation cells for cardiac repair. At present twenty patients have been operated with this technique all over the world. However the era of cell transplantation has just begun. What type of cell is the best? and What is the efficacy of the procedure? are major questions remaining unanswered. Besides it is not known whether cardiac muscle can develop electromechanical junctions with skeletal muscle and induce its synchronous contraction.

Autologous cellular cardiac implant offers the promise of restoring regional function for infarcted patients. Further studies are necessary to assess the efficacy of this approach.

Key words Autologous cellular cardiac-implant - Cellular cardiomyoplasty - Cardiac regeneration - Myoblast

BIBLIOGRAFIA

1. Ho KK, Anderson KM, Kannel WB y col. Survival after the onset of congestive heart failure in Framingham Heart Study subjects. *Circulation* 1993; 88: 107-115.
2. Trainini JC, Barisani JC, Cabrera Fischer EL y col. Chronic aortic counterpulsation with latissimus dorsi in heart failure: Clinical follow-up. *J Heart Lung Transplant* 1999; 18: 1120-1128.
3. Chachques JC, Grandjean P, Schwartz K y col. Effect of latissimus dorsi dynamic cardiomyoplasty on ventricular function. *Circulation* 1988; 78: 111-203-216.
4. Trainini JC. El concepto de "estructura culpable" en la insuficiencia cardfaca. *Rev Argent Cardiol* 2001; 69: 128-135.
5. Marelli D, Desrosiers C, el-Alfy M y col. Cell transplantation for myocardial repair: An experimental approach. *Cell Transplant* 1992; 1: 383-390.
6. Li RK, Jia ZQ, Weisel RD y col. Smooth muscle cell transplantation into myocardial scar tissue improves heart function. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31: 513-522.
7. Menasche P, Hagege A, Scorsin M y col. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 2001; 357: 279-280.
8. Tam SK, Gu W, Nadal-Guinard B. Molecular cardiomyoplasty: Potential cardiac gene therapy for chronic heart failure. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995; 109: 918-924.
9. Clarke DL, Johanson CB, Wilbertz J y col. Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* 2000; 288: 1660-1663.

10. Rajnoch C, Chachques JC, Berrebi A y col. Cellular therapy reverses myocardial dysfunction. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001; 121: 871-878.
11. Atkins BZ, Lewis CW, Kraus WE y col. Intracardiac transplantation of skeletal myoblast yields two populations of striated cells in situ. *Ann Thorac Surg* 1999; 67: 124-129.
12. Murry CE, Kay MA, Bartosek T y col. Muscle differentiation during repair of myocardial necrosis in rats via gene transfer with MyoD. *J Clin Invest* 1996; 98: 2209-2217.
13. Zak R. Development and proliferative capacity of cardiac muscle cells. *Circ Res* 1974; 35: 17-26.
14. Oliveri R. Apoptosis en la insuficiencia cardiaca. *Rev Argent Cardiol* 2000; 68: 603-607.
15. Anversa P, Kajstura J. Ventricular myocytes are not terminally differentiate in the adult mammalian heart. *Circ Res* 1998; 83: 1-14.
16. Sadoshima J, Izumo S. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Ann Rev Physiol* 1997; 59: 551-571.
17. Anversa P, Palackal T, Sonnenblick EH y col. Myocyte cell loss and myocyte cellular hyperplasia on the hypertrophied aging rat heart. *Circ Res* 1990; 67: 871-885.
18. Nadal-Ginard B. Inducción de nuevos cardiomiocitos en el corazón adulto: Futuro de la regeneración miocárdica como alternativa al trasplante. *Rev Esp Cardiol* 2001; 54:543-550.
19. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000; 182: 311-322.
20. Murry CE, Wiseman RW, Schwartz SM. y col. Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis. *J Clin Invest* 1996; 98: 2512-2523.
21. Chin RCJ, Zibaitis A, Kao RL. Cellular cardiomyoplasty: Myocardial regeneration with satellite cell implantation. *Ann Thorac Surg* 1995; 60: 12-18.
22. Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P y col. Regenerating functional myocardium: Improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med* 1998;4: 929-933.
23. Fishman MC, Olson EN. Parsing the heart genetic modules for organ assembly. *Cell* 1997; 91: 153-156.
24. Soonpaa MH, Kon GY, Klug MG y col. Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium. *Science* 1994; 264:98-101.
25. Reinecke H, MacDonald GH, Hauschka SD y col. Electro-mechanical coupling between skeletal and cardiac muscle. Implications for infarct repair. *J Cell Biol* 2000; 149: 731-740.
26. Vogel C. Cell biology. Stem cells: New excitement persistent questions. *Science* 2000; 290: 1672-1674.
27. Caplan AL. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991; 9: 641-650.
28. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M y col. Muscle regeneration by bone marrow derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279: 1528-1530.
29. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S y col. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001;410:701-705.
30. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S y col. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999; 103: 697-705.
31. Wang JS, Shum-Tim D, Chedrawy E y col. Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: The importance of microenvironment for milieu dependent differentiation. *Circulation* 2000; 102 (18 Suppl II): 11-683 (abstract).
32. Wang JS, Shum-Tim D, Galipeau J y col. Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: Feasibility and potential clinical advantages. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000; 120: 999-1005.
33. Atkins BZ, Hueman MT, Meuchel J y col. Cellular cardiomyoplasty improves diastolic properties of injured heart. *J Surg Res* 1999; 85: 234-242.
34. Tam SK, Gu W, Mahdavi V y col. Cardiac myocyte terminal differentiation. Potential for cardiac regeneration. *Ann NY Acad Sci* 1995; 752: 72-79.