

Cardioimplante autólogo de células madre de médula ósea en territorios miocárdicos necróticos

Roberto J. Bonafede¹, Roberto Vallés², Rodolfo Nieto³, Sergio Felici⁴, Walter Ferrara⁵,
Martín Altamirano⁶, Montserrat Cruzado⁷

Resumen

Introducción. El concepto clásico de que el corazón era un órgano no regenerativo ha cambiado en la actualidad, por el de ser un órgano en regeneración continua, constituyendo una evidencia sólida de que el tejido cardíaco se encuentra en un proceso continuo de crecimiento, muerte y renovación.

Material y método. Se protocolizaron doce pacientes desde el 29 de Mayo de 2004 al 30 de Agosto de 2007. Se excluyeron cinco y de los 7 restantes, cinco fueron evaluados. Se extrajeron por punción de la cresta ilíaca de cada paciente en condiciones estériles 60 cm³ de médula ósea, y se obtuvieron por sedimentación células madre que se identificaron por inmunomarcación con anticuerpo monoclonal anti-CD34 en citómetro de flujo. La evaluación de la viabilidad miocárdica pre y post implante se realizó con PET-FDG. Finalizadas las anastomosis, se implantaron las células madre directamente por punción en territorios no viables.

Resultados. Se expresan como porcentajes (variables categóricas) y como media con su desvío estándar (variables continuas). Para evaluar significancia en el cambio de la fracción de eyección se utilizó el *test* de Wilcoxon. Se consideró significativa una $p < 0,05$. De los 15 segmentos no viables, se implantaron 11 (73%) y se recuperaron 4 (36,36%). La fracción de eyección de ventrículo izquierdo media evaluada por SPECT gatillado fue del $30,2 \pm 4,9\%$ en el pre procedimiento y del $34,8 \pm 9,5\%$ en el post procedimiento, la mejoría fue de 4,6 puntos ($p = 0,34$), el 60% de los pacientes mejoraron.

Conclusiones. Hay una relación entre la concentración de CD34+ (que fue baja: 0,76% de media) y la viabilidad miocárdica. La aparición de viabilidad miocárdica en el 36,36% de los segmentos implantados fue el hallazgo más importante. El método demostró ser seguro, efectivo y reproducible. La utilización de PET-FDG en todos los pacientes para evaluación de viabilidad pre y post implante como método *gold standard* fue evidencia de regeneración tisular.

Insuf Card 2013;(Vol 8) 4: 157-164

Palabras clave: Cardioimplante - Células madre - Insuficiencia cardíaca - Miogénesis

¹ Coordinador del Proyecto Cardioimplante. Coordinador de la Unidad de Insuficiencia Cardíaca. Hospital Central de Mendoza.

Docente de la Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Cuyo. Ciudad de Mendoza. Mendoza. República Argentina.

² Director del Instituto de Inmunología del Hospital Central de Mendoza. Docente de la Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Cuyo. Ciudad de Mendoza. Mendoza. República Argentina.

³ Jefe del Servicio de Hemoterapia del Hospital Central de Mendoza. Docente de la Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Cuyo. Ciudad de Mendoza. Mendoza. República Argentina.

⁴ Jefe del Servicio de Cirugía Cardiovascular del Hospital Central de Mendoza. Adjunto del Departamento de Medicina Quirúrgica. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Cuyo. Ciudad de Mendoza. Mendoza. República Argentina.

⁵ Médico Cirujano Cardiovascular. Servicio de Cirugía Cardiovascular. Hospital Central de Mendoza. Docente de la Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Cuyo. Ciudad de Mendoza. Mendoza. República Argentina.

⁶ Médico Cirujano Cardiovascular. Servicio de Cirugía Cardiovascular. Hospital Central de Mendoza. Ciudad de Mendoza. Mendoza. República Argentina.

⁷ Docente e Investigadora del Área de Química Biológica. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Cuyo. Ciudad de Mendoza. Mendoza. República Argentina.

Institución: Instituto de Inmunología, Servicio de Hemoterapia, Servicio de Cirugía Cardiovascular, Unidad de Insuficiencia Cardíaca y Área de Química Biológica. Hospital Central. Ciudad de Mendoza. Mendoza. República Argentina.

Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Cuyo. Ciudad de Mendoza. Mendoza. República Argentina.

Correspondencia: Dr. Roberto J. Bonafede

La Patagonia 2101, Barrio SUPE, Godoy Cruz, Mendoza, Argentina, CP 5547.

E-mail: bonaso2002@yahoo.com.ar Cel: 2615079893 - Tel: 02614271483

Recibido: 04/08/2013

Aceptado: 10/10/2013

Insuf Card 2013; (Vol 8) 4:157-164

Disponible en <http://www.insuficienciacardiaca.org>

Summary

Cardiac implant autologous bone marrow stem cells in necrotic myocardial territories

Introduction. Currently, the classical concept that the heart was a non-regenerative organ has changed, by being an organ in continuous regeneration constitute strong evidence that cardiac tissue is in a continuous process of growth, death and renewal.

Materials and methods. Twelve patients were protocolized from May 29, 2004 to August 30, 2007. We excluded five. Of the 7 remaining, five were evaluated by puncturing of the iliac crest from each patient under sterile conditions 60 cm³ extracted bone marrow and stem cells were obtained by sedimentation and identified by immunostaining with anti-CD34 monoclonal antibody in the flow cytometer. The assessment of myocardial viability before and after implantation was performed with PET-FDG. After the completion anastomosis, the stem cells were implanted directly by puncture nonviable territories.

Results. They are expressed as percentages (categorical variables) and as mean with standard deviation (continuous variables). To assess significance in changing ejection fraction was used the Wilcoxon test. Was considered significant at $p < 0.05$. We implanted 11 (73%) of the 15 segments non-viable were recovered 4 (36.36%). The ejection fraction of the left ventricle assessed by SPECT triggered average was $30.2 \pm 4.9\%$ in the pre procedure and $34.8 \pm 9.5\%$ in the post process, the improvement was 4.6 points ($p=0.34$), 60% of the patients improved.

Conclusions. There is a relationship between the concentration of CD34 + (which was low 0.76% on average) and myocardial viability. The appearance of myocardial viability in 36.36% of the implanted segments was the most important finding. The method proved to be safe, effective and reproducible. The use of PET-FDG in all patients for viability assessment before and after implantation as gold standard method was evidence of tissue regeneration.

Keywords: Cardiac implant - Stem cells - Heart failure - Myogenesis

Resumo

Implante de células-tronco cardíacas autólogas da medula óssea em áreas de necrose miocárdica

Introdução. O conceito clássico que o coração era um órgão não regenerativo mudou agora, por ser um órgão em regeneração contínua constituem fortes provas de que o tecido cardíaco é um processo contínuo de crescimento, morte e renovação.

Material e método. Doze pacientes foram incluídos em um protocolo de pesquisa a partir de 29 de Maio de 2004 a 30 de Agosto de 2007. Cinco excluídos. Dos restantes sete, cinco foram avaliados por punção da crista ilíaca do paciente em condições estéreis, foram obtidos 60 cm³ de medula óssea. As células-tronco foram recolhidos por sedimentação e identificados por imunomarcagem com o anticorpo monoclonal anti-CD34 no citómetro de fluxo. A avaliação da viabilidade miocárdica antes e após a implantação foi realizada com PET- FDG. Após o término das anastomoses, as células-tronco foram implantadas diretamente por punção em territórios não viáveis.

Resultados. Eles são expressos como porcentagens (variáveis categóricas) e média com desvio padrão (variáveis contínuas). Para avaliar a importância na mudança de fração de ejeção foi utilizado o teste de Wilcoxon. Considerou-se significativa $p < 0,05$. Dos 15 segmentos não viáveis, foram implantados 11 (73%) e quatro (36,36%) foram recuperados. A fração de ejeção do ventrículo esquerdo avaliada pelo SPECT foi de $30,2 \pm 4,9\%$ na fase pré e de $34,8 \pm 9,5\%$ no processo de pós, a melhoria foi de 4,6 pontos ($p=0,34$), 60% dos pacientes melhoraram.

Conclusões. Existe uma relação entre a concentração de células CD34+ (baixa: 0,76 %, em média) e a viabilidade do miocárdio. A incidência da viabilidade do miocárdio em 36,36% dos segmentos implantados foi o achado mais importante. O método demonstrou ser seguro, eficaz e reprodutível. O uso de PET-FDG em todos os pacientes para avaliação de viabilidade, antes e depois da implantação como método padrão-ouro, foi evidência de regeneração de tecidos.

Palavras-chave: Implante cardíaco - Células-tronco - Insuficiência cardíaca - Miogênese

Introducción

El concepto clásico de que el corazón era un órgano no regenerativo ha cambiado en la actualidad por el de ser órgano en regeneración continua, fundado en datos obte-

nidos en animales experimentales y en humanos. Constituyendo una evidencia sólida de que el tejido cardíaco no es estático, como se había creído hasta ahora; sino que se encuentra en un proceso continuo de crecimiento, muerte y renovación.

Los tipos de células que poseen potencialidad para regeneración o angiogénesis cardíaca son:

- 1.- **Cardiomiocitos embrionarios y fetales**, cuya utilización en la práctica clínica es muy complicada, ya que deben ser obtenidos de embriones o fetos, creando problemas en cuanto a su disponibilidad, problemas inmunológicos y cuestiones éticas inherentes a su utilización^{1,2}.
- 2.- **Cardiomiocitos adultos**, que son células terminales diferenciadas, por lo cual no se dividen y no se logra expandirlos en medios de cultivo³. Aunque se ha identificado una población de cardiomiocitos que proliferan en el corazón adulto, aumentando la expectativa, si se logra estimularlos *in vivo* o aislarlos y multiplicarlos *ex vivo*, para utilizarlos en la regeneración de tejido cardíaco enfermo⁴.
- 3.- **Células madre (CM) o troncales (*stem cells*)** con capacidad de auto-renovación, diferenciación⁵, capacidad funcional de implantación persistente en tejidos sanos y enfermos⁶, auto-mantenimiento (mecanismo que controla de forma estricta el número de células madre que existe en un determinado órgano), quiescencia (la mayoría de las células que no participan activamente en el proceso de regeneración y mantenimiento de la funcionalidad se encuentra en un estado de reposo que las protege de agresiones externas y del proceso de envejecimiento celular), sucesión clonal⁷ (cuando las células madre, que están contribuyendo, agotan su potencial y desaparecen, siendo sustituidas paulatinamente por la progenie de otras nuevas que se activan). Pertenecen a este grupo (*stem cells*):
 - a) **Células madre embrionarias**, pueden aislarse de la masa celular interna del embrión en estadio de blastocisto (7-14 días), y son capaces de generar “todos” los tipos celulares del cuerpo, es decir, son células pluripotenciales. Tienen la capacidad de 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 germinales: ectodermo, mesodermo y endodermo⁸. De estas células se deriva, tras muchas divisiones celulares, otro tipo de

células: las células madre órgano-específicas. *In vitro*, estas células pueden diferenciarse espontáneamente a cardiomiocitos y a células endoteliales^{9,10}. A pesar de sus ventajas, los problemas éticos mayores con las células embrionarias humanas limitan su desarrollo y las aplicaciones terapéuticas.

b) **Células madre fetales** (se obtienen de las gónadas de los fetos) y **del cordón umbilical** (se obtienen de la sangre del cordón umbilical).

c) **Células madre adultas (CMA)**. Las CMA han sido aisladas de diferentes tejidos del adulto: de músculo esquelético y hematopoyético las más utilizadas, también de músculo cardíaco, gastrointestinal, renal, epidérmico, adiposo, hígado, pulmón, páncreas, etcétera. Eran consideradas multipotenciales, es decir, su capacidad de diferenciación estaría más limitada, de forma tal que una célula derivada del tejido mesodérmico sólo podía dar lugar a tejidos derivados mesodérmicos. Sin embargo, estudios recientes describiendo la plasticidad de las CMA, han conducido a intensas discusiones, donde parecería que alguna o todas las CMA tendrían capacidad pluripotencial, similar a las células madre embrionarias. Aunque no hay una definición totalmente aceptada de la plasticidad de las células madre, podría ser definida como la capacidad de dar origen a células adquiriendo características morfológicas y funcionales de un tejido diferente de aquel del que la célula originariamente derivó^{11,12}.

Las células madre hematopoyéticas (utilizadas en este trabajo) son capaces de diferenciarse en tejidos como músculo cardíaco, endotelio, o en tejidos derivados de las tres capas embrionarias^{12,13}. El trasplante de CM de la médula ósea en el miocardio no viable ofrece una nueva posibilidad de restauración de la disfunción cardíaca en corazones infartados^{14,15}. Las células madre adultas pueden aislarse de la médula ósea o de tejidos extramedulares. Todos los tipos celulares se resumen en la Figura 1. Finalmente, podemos decir que el implante celular en áreas cardíacas no viables, ha tenido amplio desarrollo en la investigación básica con resultados favorables y se

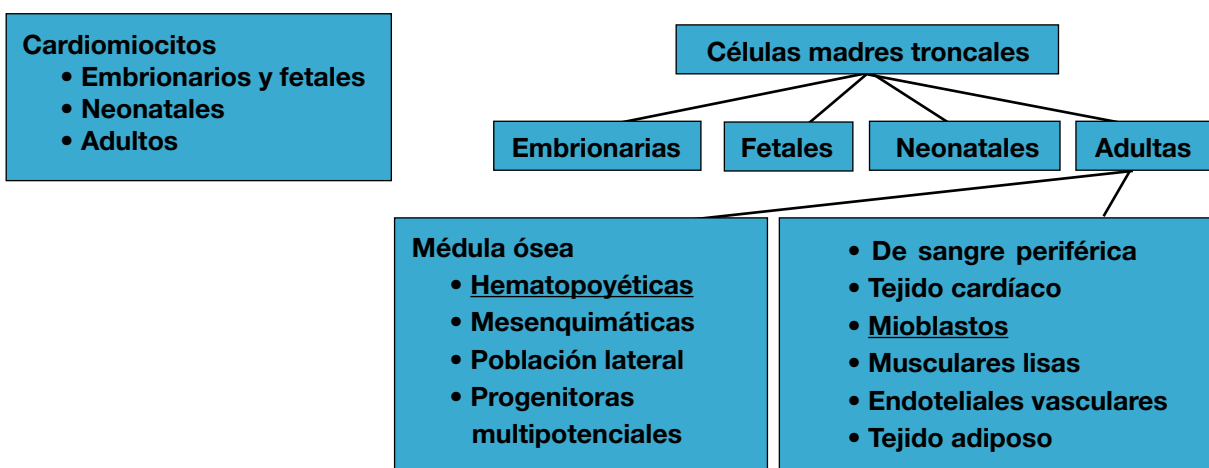


Figura 1. Tipos de células que poseen potencialidad para regeneración y/o angiogénesis cardíaca.

encuentra actualmente en período de investigación clínica, pudiendo ser a futuro una terapéutica innovadora para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca irreversible y de la cardiopatía isquémica.

Material y métodos

El estudio fue aprobado por el Comité de Docencia e Investigación Institucional y los sujetos intervinientes firmaron el consentimiento informado.

Se protocolizaron desde el 29 de Abril de 2004 al 30 de Agosto de 2007 doce pacientes. Se excluyeron por distintos motivos cinco. De los cardioimplantados (siete), dos fallecieron sin poder ser evaluados por motivos no relacionados al procedimiento y cinco pudieron ser evaluados. Se obtuvieron por punción de médula ósea de cresta ilíaca 60 cm³ de material de cada paciente, que fue procesado en gabinete de flujo laminar, obteniéndose por gradiente de densidad: células mononucleares (células madre) que quedaron en el sobrenadante después de sedimentar glóbulos rojos con una amilopectina modificada llamada poli-hidroxi-etil-almidón. Este sobrenadante se centrifugó para enriquecer la muestra y el material obtenido se diluyó en suero homólogo rico en plaquetas, quedando 7,5 cm³ del material a utilizar. Se evaluó en la muestra la cantidad de células madre, identificándolas por inmunomarcación con anticuerpo monoclonal anti-CD34 en citómetro de flujo (Becton-Dickinson). La evaluación de viabilidad miocárdica pre y post implante se realizó con PET-FDG (tomografía por emisión de positrones= PET: *Positron Emission Tomography* - radiofármaco 18F-fluor-desoxiglucosa: 18F-FDG o FDG). Realizadas todas las anastomosis, se implantaron las células madre en forma directa por punción, en territorios previamente determinados como no viables (Figura 2). Se utilizó para evaluación de viabilidad, motilidad y función ventricular izquierda, PET-FDG, *test* de perfusión SPECT-*gated* con Tc-sestamibi y ecocardiograma Doppler.

Se inyectaron 49 cm³ en total de solución de suero homólogo conteniendo 6000 a 16000 células nucleadas no eritroides/mm³ pre-concentración, 15 a 20% de ellas fueron mononucleares (en esta serie estaban las células progenitoras hematopoyéticas CD34+). Post-concentración se contabilizaron 10000 a 50000/mm³, 20 a 30% fueron mononucleares donde se encontraban las CD34+. El porcentaje medio de CD34+ fue del 0,76±0,43% en los pacientes evaluados y del 0,72% si se incluyen los dos pacientes fallecidos. En los pacientes que no mejoraron (dos), la concentración fue del 0,12% en uno y del 0,71% en el otro, en quien la mitad de la solución se inyectó en territorio necrótico del ventrículo derecho que no es evaluado por imágenes. Se realizaron 255 inyecciones intramiocárdicas en segmentos no viables.

De los 15 segmentos no viables diagnosticados por PET, se implantaron 11 (73%), el resto eran territorios septales no accesibles.

Los autores poseen acceso completo a los datos y toman

la responsabilidad de su integridad. Todos los autores han leído y acuerdan con el manuscrito que a continuación se reporta.

Resultados

Los dos primeros pacientes fallecieron por causas ajenas al procedimiento, el primero era un paciente obeso que tuvo un postoperatorio complicado con insuficiencia respiratoria. El segundo sufrió un accidente cerebrovascular el día previo al alta programada, falleciendo a las 48 hs.

En los cinco restantes no se produjeron arritmias malignas ni otras complicaciones.

De los 11 segmentos implantados (73% de los diagnosticados como no viables) se recuperaron 4 (36,36%).

La concentración media obtenida de células CD34+ fue del 0,76±0,43%, la mayor del 1,28% y la menor del 0,12%.

La fracción de eyección media de ventrículo izquierdo (FEVI) evaluada por SPECT gatillado fue del 30,2±5,65% pre procedimiento (cardioimplante y revascularización) y del 34,8±9,89% post procedimiento, siendo la mejoría promedio de 4,6 puntos porcentuales (p=0,34), mejoró la FEVI el 60% de los pacientes.

Todos los pacientes mejoraron un estadio de clase funcional (CF), todos estaban en CF III antes y quedaron en CF II post procedimiento.

El total de segmentos isquémicos por SPECT-sestamibi antes de la revascularización fue de 9 segmentos y post revascularización 1 segmento, mejoraron 8 (89%).

Se realizaron en total 7 *by pass* mamarios sin circulación extracorpórea.

La media de tiempo transcurrido desde el implante al PET y SPECT post procedimiento fue de 147±28,28 días. Los datos se muestran en la Tabla 1.

Discusión

La llamada terapia de regeneración celular es un procedimiento terapéutico aún en etapa de experimentación clínica con excepción de su aplicación desde hace más de 50 años en el trasplante de médula ósea, en el que se utilizan células madre hematopoyéticas (CMH). Actualmente, se considera que es un procedimiento con gran potencialidad en el tratamiento de diversas patologías en base a la capacidad de las células madre de regenerar tejido pancreático, óseo, neurológico y cardíaco. Por lo tanto las expectativas de su utilización en enfermedades como la diabetes, tratamiento de enfermos parapléjicos o cuadripléjicos, como procedimiento para regenerar y alargar hueso cuando hubo importante pérdida de tejido y en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca de diversas etiologías y del infarto agudo de miocardio (IAM) son aún muy importantes.

El hecho de que siga vigente el entusiasmo en la investigación de muchos grupos en el mundo por este procedimiento no implica que el tema esté exento de controversia

Tabla 1. Datos de los pacientes

N (pacientes)	Concentración SC (CD34+)	Segmentos no viables	No viable -viables	FEVI (%)	FEVI (%)	By pass a	Tiempo al PET
1	0,71%	pre PET	post PET	pre SPECT	post SPECT	DA-Dg1	170 días
		Infero Medial	Infero Medial	28	24		
		Infero Apical	Infero Apical				
		Apical	Apical				
		Septo Apical	Septo Apical				
2	0,12%	Latero Apical	viable	28	40	DA	149 días
		Infero Apical	Infero Apical				
		Infero Medial	Infero Medial				
		Infero Basal	Infero Basal				
3	1,28%	Antero Apical	viable	21	28	DA	168 días
		Apical	Apical				
4	1,03%	Apical	viable	33	48	DA	104 días
5	0,66%	Antero Medial	Antero Medial	41	34	DA	144 días
		Antero Septal Medio	Antero Septal Medio			Dg1	
		Antero Septal Basal	Antero Septal Basal				
		Infero Septal Medio	viable				
		Segmentos no viables pre PET	Segmentos no viables post PET	FEVI pre SPECT	FEVI post SPECT	By pass	Tiempo al PET
Total		15	11	30,2%	34,8%	7 By pass	147 días
Segmentos implantados		11 de 15 no viables		73%			
Segmentos regenerados			4 de 11 implantados	36,36%			

SC: *stem cells*. FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo. DA: arteria coronaria descendente anterior. Dg1: arteria coronaria primera diagonal. PET: tomografía por emisión de positrones.

acerca del rol que las células progenitoras endógenas y exógenas tienen en la homeostasis cardíaca y en la regeneración siguiente a la injuria, pues sigue siendo discutido el desplazamiento en el paradigma de un corazón postmitótico terminalmente diferenciado a un órgano autorrenovable^{16,17}, este cambio en la concepción del corazón se produjo en los 40 y ha continuado por años^{18,19}. La razón de esta controversia no es clara, pero parece reflejar posiciones inflexibles basadas en preconceptos más que en cuidadosos análisis y consideraciones apropiadas de los resultados publicados²⁰. Los puntos principales de esta controversia están relacionados en primer lugar con la observación, porque las figuras mitóticas serían para algunos investigadores fibroblastos que pueden penetrar hasta la porción central de los miocitos (fibroblastos penetrantes), desplazando a su núcleo; pero los preparados fueron de

pobre calidad y los miocitos estaban hipercontraídos. Mayores avances fueron hechos con microscopía confocal e inmunomarcación que refutaron la hipótesis anterior, pero también se adujo que el microscopio de luz tradicional es muy superior a la microscopía confocal²¹.

En segundo lugar, otra evidencia de regeneración tisular es el llamado quimerismo cardíaco, también se discutió qué niveles de quimerismo eran correctos, las más obvias diferencias técnicas entre los estudios publicados fue el uso de microscopía de luz versus microscopía electrónica (ME). En tercer lugar, se dijo que los múltiples marcadores de reconstitución miocárdica por HSCs (*hematopoietic stem cell*) resulta de autofluorescencia y que el uso de marcación genética no reproducía los resultados iniciales, pero varios laboratorios han usado HSCs de animales transgénicos marcadas genéticamente para promover la

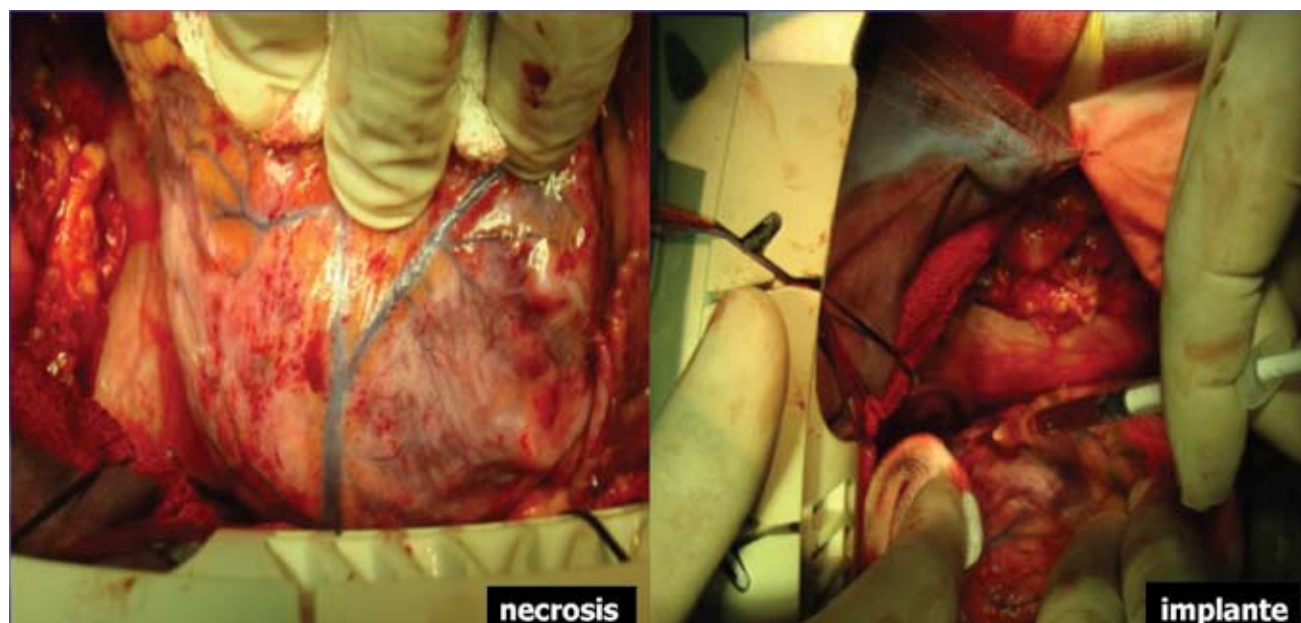


Figura 2. Fotografía que muestra el foco de necrosis y el posterior implante celular.

restauración de miocardio infartado experimentalmente para identificar formas progenitoras. La detección de proteína marcada con fluoresceína verde (EGPF), cromosoma Y (quimerismo), células bromo 2-deoxyuridina +, factores de transcripción y proteínas citoplasmáticas específicas de miocitos y células endoteliales fueron demostradas.

También se afirmó que “Desde que los miocitos no pueden ser regenerados, los preparados de CSCs (*smooth muscle cells*) deben ser el producto de un artefacto asociado con aislamiento *in vitro* y que las células que expresan cadenas pesadas de miosina cardíaca, conectina 43, caderina-N y responden a estimulación eléctrica con acortamiento y reestiramiento fueron en realidad fibroblastos”²¹.

Por último, hay también controversia acerca de si las células observadas son miocardio regenerado o si estas células se producen por transdiferenciación o fusión celular, una mezcla de la célula implantada y célula nativa de la periferia del territorio necrótico, y si los resultados observados son además la consecuencia del implante de estroma y de células vasculogénicas y no sólo miogénicas, atendiendo al concepto de que no hay posibilidad de regeneración miocítica sin estroma y sin irrigación²².

Otro punto a analizar es cómo se muestran los resultados en investigación clínica, ya que las técnicas para evaluar los resultados son diferentes a las utilizadas en ciencias básicas. En clínica, los distintos grupos han utilizado para evaluar resultados: parámetros clínicos (clase funcional), ecocardiográficos desde los básicos hasta los analizados en los métodos ecocardiográficos más modernos como el *strain rate* y *speckle tracking*, la hemodinamia y la medicina nuclear, la perfusión y/o estudio metabólico (PET) y la resonancia magnética nuclear (RMN), utilizándose también para sacar conclusiones. El beneficio de cada uno está en relación con la vía usada para el implante. La vía epicárdica quirúrgica (VEQ) fue la primera utilizada en la fase clínica, en pacientes con insuficiencia cardíaca

crónica (isquémica-necrótica)²³, la vía endoventricular, a través de catéteres especiales diseñados para tal fin, guiados mediante mapeo electromecánico, fluoroscopia biplana, ultrasonido o bajo RMN^{24,25}. La vía intravenosa sistémica tiene la desventaja de que la distribución de las células inyectadas no es selectiva²⁶. La vía intracoronaria (VIC) se basa en el potencial migratorio de las células, que son retenidas a través de la membrana basal. Esta vía es utilizada principalmente para los pacientes con IAM a los que se le realiza angioplastia primaria y luego se inyectan células madre en la arteria tratada. También, podría ser útil en cardiopatías no isquémicas²⁷. La vía intravenosa coronaria consiste en introducir un catéter especial en el seno coronario para luego avanzar el extremo del mismo hacia la vena interventricular anterior, y desde ésta realizar las microinfusiones de las células a través de múltiples punciones²⁹.

La VEQ y la VIC han sido las más utilizadas, ambas combinan revascularización e implante; por lo tanto, los parámetros clínicos, ecocardiográficos y hemodinámicos no permiten distinguir con rigor los beneficios obtenidos por la revascularización de los obtenidos por la regeneración tisular. Por lo cual creemos que es primordial determinar primero (siendo nuestro principal objetivo), si existe alguna constancia de regeneración tisular para lo cual los métodos más apropiados son la RMN y el PET-FDG y con menor especificidad los métodos de perfusión. Ésta fue la razón por la cual enfatizamos en la obtención de imágenes que nos permitieran comprobar la aparición de viabilidad post procedimiento, donde no la había previamente (Figura 2), independientemente de los cambios favorables o no observados en la CF y en la FEVI.

La mejoría en la viabilidad de nuestra serie (36,36%) fue menor pero comparable al 50% del trabajo publicado por el grupo del Dr. Trainini³⁰, pues si bien utilizaron distintos métodos (incluidos PET y perfusión) y las células implan-

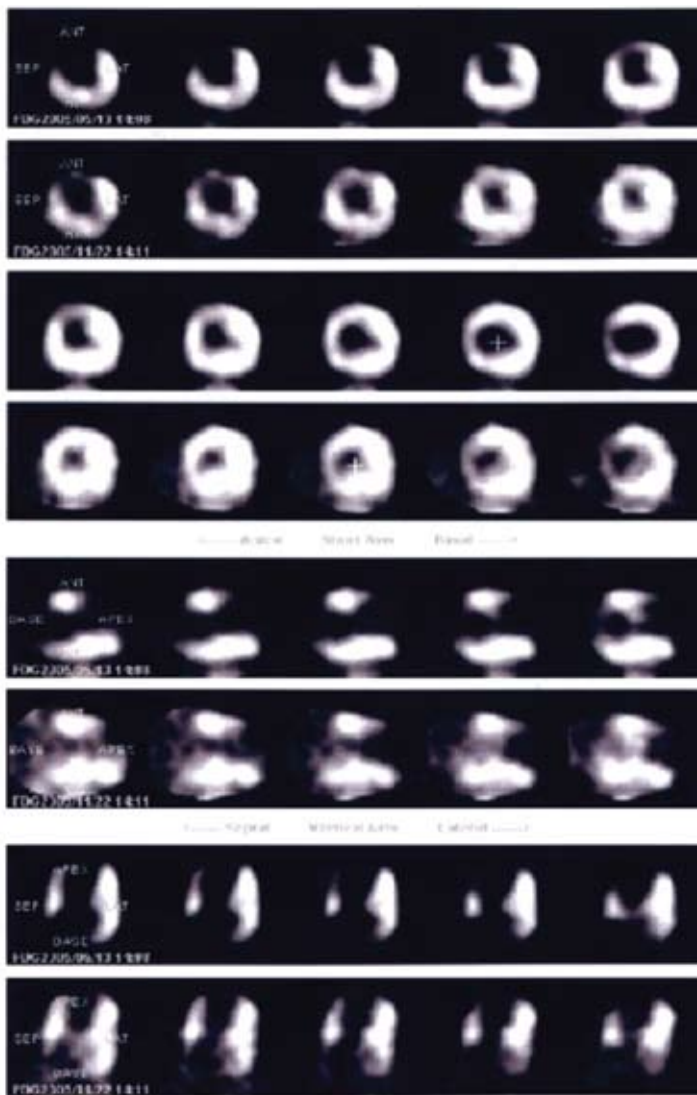
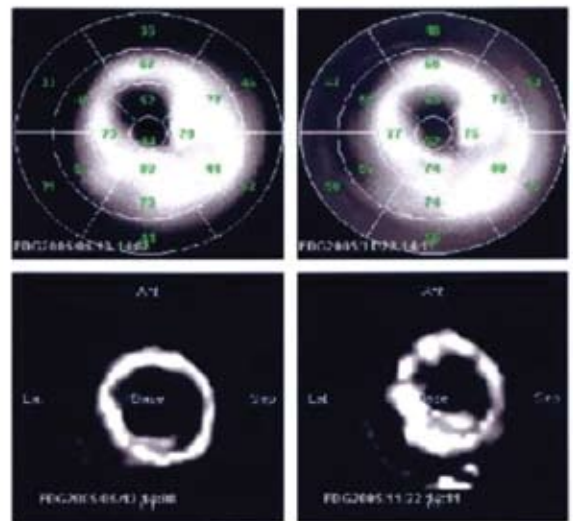


Figura 3. Tomografía por emisión de positrones con radiofármaco fluor-desoxiglucosa (PET-FDG). PET-FDG del 13-05-05 (pre-implante celular): necrosis sin criterios de viabilidad miocárdica en segmentos anteroapical y apical, con viabilidad miocárdica septal anterior medial y septoapical. Isquemia anteromedial. PET-FDG del 22-11-05 (post-implante celular): se observa aparición de viabilidad miocárdica anteroapical (franca mejoría de territorios isquémicos).



tadas eran mioblastos cultivados, utilizaron también VEQ, evaluando los cambios en la viabilidad porcentualmente y considerando a todos los segmentos como universo. Utilizaron también campana de flujo laminar y citómetro de flujo, siendo su primera serie publicada de cinco pacientes. A diferencia de la duda de si la mejora en la CF y la clínica es consecuencia de la revascularización de la isquemia o de ambas, la mejoría observada en la isquemia es claramente atribuible a la revascularización.

Conclusión

Finalmente, debido al pequeño número de pacientes, no se pueden sacar conclusiones, aunque se pudo constatar regeneración tisular. No fue suficiente la concentración de células madre obtenidas del material extraído en cada paciente por punción medular salvo en un paciente (Figura 3).

Hay una relación entre la concentración de CD34+ (que fue baja: 0,76% de media) y la viabilidad miocárdica. La aparición de viabilidad miocárdica en el 36,36% de los

segmentos implantados fue el hallazgo más importante. El método demostró ser seguro, efectivo y reproducible. La utilización de PET-FDG en todos los pacientes para evaluación de viabilidad pre y post implante como método *gold standard* fue evidencia de regeneración tisular. Creemos necesario evaluar la concentración de células CD34+ antes de realizar el procedimiento y realizar más extracciones de ser necesarias en las 24-48 horas previas al implante. Por lo tanto, dada la importancia del tema y los potenciales beneficios de esta terapia es necesario continuar con la investigación clínica.

Agradecimientos

Al Sr. Dr. Jorge Trainini y su grupo por formarnos en los distintos pasos utilizados para la realización de esta técnica de cardioimplante y por apoyarnos en la concreción de este proyecto.

A la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Cuyo por el subsidio otorgado.

A la Fundación Escuela de Medicina Nuclear, Servicio de

Cámara Gamma, Dr. Alfredo Astesiano por facilitarnos la realización de los estudios de perfusión y metabólicos. A la Dra. Adriana González por su colaboración con el análisis celular en citómetro de flujo.

Recursos financieros

Subsidio otorgado por la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza. República Argentina.

Realización de los estudios de perfusión y metabólicos por Dr. Alfredo Astesiano. Servicio de Cámara Gamma. Fundación Escuela de Medicina Nuclear.

Análisis celular en citómetro de flujo por la Dra. Adriana González.

Conflicto de intereses

Los autores no poseen conflicto de interés.

Referencias bibliográficas

1. Min JY, Sullivan MF, Yang Y, Zhang JP, Converso KL, Morgan JP, et al. Significant improvement of heart function by cotransplantation of human mesenchymal stem cells and fetal cardiomyocytes in postinfarcted pigs. *Ann Thorac Surg* 2002; 74(5): 1568-75.
2. Chiu RC. Therapeutic cardiac angiogenesis and myogenesis: the promises and challenges on a new frontier. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001; 122: 851-2.
3. Reinecke H, Zhang M, Bartosek T, Murry CE. Survival integration and differentiation of cardiomyocyte grafts. A study in normal and injured rat hearts. *Circulation* 1999; 100: 193-202.
4. Reinlib L, Field LJ. Cell transplantation as future therapy for cardiovascular disease? *Circulation* 2000; 101: 182-7.
5. Prósper F, Herreros J. Células madre adultas. *Rev Argent Cardiol* 2004; 72: 68-73.
6. Körbling M, Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair - A new therapeutic concept? *N Engl J Med* 2003; 349: 570-82.
7. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 2000; 100: 157-68.
8. Min JK, 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.
9. Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, Field LJ. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest* 1996; 98: 216-24.
10. Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A et al. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* 2001; 108: 407-14.
11. Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell* 2001; 105: 829-41.
12. Grant MB, May WS, Caballero S, Brown GA, Guthrie SM, Mames RN, et al. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med* 2002; 8: 607-12.
13. Krausse DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001; 105: 369-77.
14. Assmus B, Schächinger 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.
15. Tse HF, Kwong YL, Chan JK, Lo G, Ho CL, Lau CP. Angiogenesis in ischemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet* 2003; 361: 47-9.
16. Soonpaa MH, Field LJ. Survey of studies examining mammalian cardiomyocyte DNA synthesis. *Circ Res* 1998;83:15-26.
17. Rubart M, Field LJ. Cardiac regeneration: Repopulating the heart. *Annu Rev Physiol* 2006;68:29-49.
18. Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell* 2001; 105: 829-41.
19. Linzbach AJ. Heart failure from the point of view of quantitative anatomy. *Am J Cardiol* 1960; 5:370-382.
20. Anversa P, Kajstura J. Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart. *Circ Res* 1998;83: 1-14.
21. Anversa P, Kajstura J, Leri A et al. Life and death of cardiac stem cells. A paradigm shift in cardiac biology. *Circulation* 2006;113:1451-1463.
22. Anversa P, Leri A, Rota M, Hosoda T, Bearzi C, Urbanek K, Kajstura J, Bolli R. Concise Review: Stem Cells, Myocardial Regeneration, and Methodological. *Stem Cells* 2007;25:589-601.
23. Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 2004; 428(6983): 668-673.
24. Thompson R, Parsa J, Van den Bos VJ, Davis BH, Toloza EM, Klem I et al. Video-assisted thoracoscopic transplantation of myoblasts into the heart. *Ann Thorac Surg* 2004; 78: 303-7.
25. Perin E, Doman H, Borojevic R, Silva S, Sousa MD, Mesquita CT et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation* 2003; 107: 2294.
26. Garot J, Untersee T, Teiger E, Champagne S, Chazaud B, Gherardi R et al. Magnetic resonance imaging of targeted catheter-based implantation of myogenic precursor cells into infarcted left ventricular myocardium. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 1841-6.
27. Bittira B, Shum-Tim D, Al-Khaldi A, Chiu RC. Mobilization and homing of bone marrow stromal cells in myocardial infarction. *Eur J Cardiothorac Surg* 2003; 24: 393-8.
28. Thompson R, Parsa J, Van den Bos VJ, Davis BH, Toloza EM, Klem I et al. Video-assisted thoracoscopic transplantation of myoblasts into the heart. *Ann Thorac Surg* 2004; 78: 303-7.
29. Thompson CA, Nasser BA, Makower J, Houser S, Mc Garry M, Lamson T et al. Percutaneous transvenous cellular cardiomyoplasty. A novel nonsurgical approach for myocardial cell transplantation. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 1964-71.
30. Trainini J, Lago N, Giordano R, de Paz J, Genovese J, Barisani JL, Mouras J, Quintana M, Sena C, Christen A, Chada S. Cardioimplante de mioblastos autólogos en la insuficiencia ventricular postinfarto. *Rev Arg Cir Cardiovasc* 2003; 2:136-145.