

ARTÍCULO ORIGINAL

► ESTUDIO COMPARATIVO CON EL USO DE MATRIZ BIOLÓGICA EN PACIENTES CON INFARTO DE MIOCARDIO TRATADOS CON CÉLULAS MADRE*

H.I.G.A. PRESIDENTE PERÓN. SARANDÍ. AVELLANEDA.

AUTOR:

DR. EDUARDO LUIS CARDINALI, N. LAGO, J. BORDONE, O. MASOLI, J. HERREROS, J. C. CHACHQUES, J. MOURAS, R. GIORDANO, S. CHADA, J. DE PAZ, J. L. BARISANI, A. CHRISTEN, B. ELENCAWJG, N. LÓPEZ CABANILLAS, V. J. PARDO, J. L. PAREDES, A. TRAININI, J. CONTRERAS, F. R. JAIMES, J. C. TRAININI.

Recibido: Octubre 2009

Aceptado: Noviembre 2009

Correspondencia: cardinalieluis@gmail.com

RESUMEN

Objetivos: Estudiar los cambios producidos por el cardioimplante de células mononucleares de la médula ósea con y sin la asociación de una matriz de colágeno en pacientes con cardiopatía isquémica.

Material y Métodos: 22 pacientes consecutivos intervenidos de cirugía de revascularización coronaria se distribuyeron en dos grupos. Grupo I: 12 pacientes (53.75 ± 10.76 años) con implante transepicárdico de células mononucleares de médula ósea (34 ± 8.6 inyecciones, 5.1 ± 1.7 ml, $202 \pm 11 \times 10^6$ células CD 34+: 0.7 %). Grupo II: 10 pacientes (56.1 ± 7.63 años) que recibieron 15.7 ± 4.5 ml con $716 \pm 324 \times 10^6$ células CD 34+: 1.2%. En el Grupo II, el 40% del volumen se inyectó por vía transepicárdica (21.5 ± 7.5 inyecciones) y con el 60% restante se impregnó una matriz de colágeno. Se ha realizado un seguimiento de 357 ± 162 días con el Grupo I, y 297 ± 128 días con el Grupo II.

Resultados: No hubo complicaciones. En el Grupo I, la clase NYHA pasó de 2.4 ± 0.5 a 1.1 ± 0.3 ($p < 0.0001$), la fracción de eyección del ventrículo izquierdo aumentó de 24.8 ± 6.0 % a 36.3 ± 13.4 % ($p = 0.003$) y el diámetro diastólico disminuyó de 63.5 ± 9.2 mm a 60.5 ± 9.1 mm ($p = ns$). En el Grupo II, la clase NYHA pasó de 2.5 ± 0.7 a 1.2 ± 0.4 ($p < 0.0001$), la fracción de eyección del ventrículo izquierdo aumentó de 31.6 ± 14.9 % a 39.3 ± 18.4 % ($p = 0.01$) y el diámetro diastólico disminuyó de 63.2 ± 8.7 mm a 60.2 ± 9.7 mm ($p = 0.02$).

Conclusiones: No existen diferencias significativas entre los grupos en la clase funcional y fracción de eyección, observándose una tendencia a la reducción del diámetro diastólico ventricular en los pacientes del Grupo II. La asociación de la matriz de colágeno parece reforzar la escara fibrótica limitando el remodelado ventricular.

Palabras Clave: células mononucleares de médula ósea, células madre, cardiopatía isquémica, matriz de colágeno.

*1er. PREMIO XVIII CONGRESO ARGENTINO DE CIRUGÍA CARDIOVASCULAR Y ENDOVASCULAR, BARILOCHE 2009.

RESUMO

ESTUDO COMPARATIVO COM O USO DE MATRIZ BIOLÓGICA EM PACIENTES COM INFARTO DE MIOCÁRDIO TRATADOS COM CÉLULAS TRONCO. H.I.G.A. PRESIDENTE PERÓN. SARANDÍ. AVELLANEDA.

Objetivos: Estudar as mudanças produzidas pelo implante das células mononucleares da medula óssea, com e sem a associação de uma matriz de colágeno em pacientes com cardiopatia isquêmica.

Material e Métodos: Vinte e dois pacientes consecutivos que sofreram uma intervenção cirúrgica de revascularização coronária, foram distribuídos em dois grupos. Grupo I: 12 pacientes (53.75 ± 10.76 anos) com implante transepicárdico de células mononucleares da medula óssea (34 ± 8.6 injeções, 5.±1 ± 1.7ml, 202 ± 11 x 10⁶ células CD 34+: 0.7%). Grupo II: 10 pacientes (56.1 ± 7.63 anos) que receberam 15.7 ± 4.5ml com 716 ± 324 x 10⁶ células CD 34+: 1.2%. No Grupo II, 40% do volume foi injetado por via transepicárdica (21.5 ± 7.5 injeções), e com o 60% restante impregnou-se uma matriz de colágeno. O seguimento foi de 357 ± 162 dias no Grupo I, e de 297 ± 128 dias no Grupo II.

Resultados: Não houve complicações. No Grupo I, a classe NYHA passou de 2.4 ± 0.5 para 1.1 ± 0.3 ($p < 0.0001$), a fração de ejeção do ventrículo esquerdo aumentou de 24.8 ± 6.0% para 36.3 ± 13.4% ($p = 0.003$), e o diâmetro diastólico diminuiu de 63.5 ± 9.2mm para 60.5 ± 9.1mm ($p = ns$). No Grupo II, a classe NYHA passou de 2.5 ± 0.7 para 1.2 ± 0.4 ($p < 0.0001$), a fração de ejeção do ventrículo esquerdo aumentou de 31.6 ± 14.9% para 39.3 ± 18.4% ($p = 0.01$), e o diâmetro diastólico diminuiu de 63.2 ± 8.7mm para 60.2 ± 9.7mm ($p = 0.02$).

Conclusões: Não há diferenças significativas entre os grupos na classe funcional e fração de ejeção, observando-se uma tendência à redução do diâmetro diastólico ventricular nos pacientes do Grupo II. A associação da matriz de colágeno parece reforçar a escara fibrótica, limitando o remodelado ventricular.

Palabras Clave: células mononucleares de medula óssea, células madre, cardiopatía isquémica, matriz de colágeno.

ABSTRACT

COMPARATIVE STUDY WITH THE USE OF BIOLOGICAL MATRICE IN PACIENTS WITH MIOCARDIC INFART TREATED WITH MOTHER CELLS. H.I.G.A. PRESIDENTE PERÓN. SARANDÍ. AVELLANEDA.

Background: We evaluated the feasibility and safety of cell therapy associated with a cell-seeded collagen scaffold grafted onto ventricles.

Method: In 22 consecutive patients presenting with myocardial scars and indication for coronary bypass surgery, bone marrow cells were implanted associated to revascularization surgery with left mammary artery. The patients were distributed in two groups. Group I: 12 patients (53.75 ± 10.76 years). At the end for surgery the implantation of the bone marrow cell was performed (34 ± 8.6 injections, 5.±1 ± 1.7ml, 202 ± 11 x 10⁶ células CD 34+: 0.7%). Group II: 10 patients (56.1 ± 7.63 years), 15.7 ± 4.5ml of bone marrow cells (716 ± 324 x 10⁶ cells CD 34+: 1.2%) was implanted. The 40% of volume was injected into the scar (21.5 ± 7.5 injections) and the 60% was utilized for seeded the collagen matrix in Group II.

Results: There was any related adverse events (follow-up 357 ± 162 and 297 ± 128 days respectively). In Group I, the NYHA functional class improved from 2.4 ± 0.5 to 1.1 ± 0.3 ($p < 0.0001$), the left ventricle ejection fraction improved from 24.8 ± 6.0% to 36.3 ± 13.4% ($p = 0.003$), and the left

ventricular diastolic diameter progressed from $63.5 \pm 9.2\text{mm}$ to $60.5 \pm 9.1\text{mm}$ ($p=\text{ns}$). In Group II, the functional class improve from 2.5 ± 0.7 to 1.2 ± 0.4 ($p<0.0001$), the ejection fraction from $31.6 \pm 14.9\%$ to $39.3 \pm 18.4\%$ ($p=0.01$), and the diastolic diameter progressed from $63.2 \pm 8.7\text{mm}$ to $60.2 \pm 9.7\text{mm}$ ($p=0.02$).

Conclusions: Autologous intramyocardial injection of mononuclear bone marrow cells and fixation of a cell seeded matrix onto the epicardium is a feasible and safe procedure. The cell-seeded collagen matrix increase the functional capacity, limiting ventricular remodeling and improving diastolic function.

Key Words: bone marrow, stem cell, collagen scaffold, ischemic cardiopathy.

INTRODUCCIÓN

Los estudios clínicos con células madre sin selección de poblaciones son un procedimiento sencillo, no necesitan una capacidad proliferativa *in vitro* y evitan descartar células útiles(1-2). Se han desarrollado ensayos, tanto en infartos agudos como crónicos, por vía epicárdica, intracoronaria o endoventricular percutánea. Estos estudios clínicos demostraron una eficacia sobre la función cardíaca, pero lo más importante ha sido documentar una mejor viabilidad tisular en el seguimiento(3-6). Se piensa que las células mononucleares de la médula ósea (CMNMO) generan angiogénesis, al contrario de los mioblastos que tienen una acción de miocardiogénesis(7-12). Si nos remitimos a la biología cardíaca vemos que ésta se halla compuesta por cardiomiocitos y matriz extracelular. Los cardiomiocitos adultos son células altamente diferenciadas que no pueden sintetizar ADN rápidamente, y que presentan una síntesis proteica pausada. Ellos constituyen el 30% de la masa muscular cardíaca. El 70% restante es patrimonio de la matriz extracelular, es decir no miocitos, conformada por fibroblastos y células endocárdicas, epicárdicas y endoteliales. Los cardiomiocitos presentan una vida de cinco años, mientras que los no miocitos alcanzan a existir entre 80 y 120 días, siendo posible la aceleración de esta condición en circunstancias patológicas como sobrecarga o estrés. Este intersticio se halla en un estado de continuo recambio, indicando una inestabilidad creadora. Por otra parte un 25% de los cardiomiocitos son binucleados; son tetraploides la mitad de ellos y un cuarto diploides(13-14). Estas cifras aumentan en la hipertrofia y con la edad, indicando un esfuerzo indudable ha-

cia la división celular(15). Se plantea en este momento del conocimiento de estos datos ¿cómo un órgano tan activo desde el punto de vista funcional pueda sostenerse a lo largo de los años sin ningún indicio de capacidad reproductiva?(16-18).

El colágeno es el componente principal de la matriz extracelular. Las funciones de una malla de este material son el aporte y la alineación de las células implantadas, proporcionando una base para mejorar la elasticidad diastólica. Una matriz extracelular sería beneficiosa para favorecer al crecimiento de las células injertadas dentro de una geometría tridimensional. La utilización de matrices fue propuesta en la década de 1990 por Vacanti y Langer(19). Este método presenta la ventaja de poder constituir tejidos de distintas formas y dimensiones, posicionando las células en una matriz soluble compuesta por fibras de colágeno.

El objetivo de este estudio clínico es evaluar y comparar los cambios anatomofuncionales

ABREVIATURAS UTILIZADAS EN ESTE ARTÍCULO

AK: Segmentos ventriculares aquinéticos
CMNMO: Células mononucleares de la médula ósea
CRM: Cirugía de revascularización miocárdica
DDVI: Diámetro diastólico de ventrículo izquierdo
DK: Segmentos ventriculares disquinéticos
FEVI: Fracción de eyección de ventrículo izquierdo
NYHA: New York Heart Association

que se producen por el cardioimplante de CMNMO autólogas con y sin la aposición sobre la superficie de la escara fibrótica, de una matriz de colágeno biodegradable, embebida con una suspensión concentrada de CMNMO en pacientes con cardiopatía isquémica y disfunción sistólica ventricular izquierda.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los pacientes de este estudio clínico presentaban una miocardiopatía isquémica necrótica con indicación de revascularización por presentar isquemia residual. Los criterios de inclusión y exclusión son:

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

1. Disfunción sistólica del ventrículo izquierdo con una fracción de eyección de ventrículo izquierdo (FEVI) $\leq 40\%$, analizada por ecocardiografía.
2. Clase funcional II-III. (NYHA)
3. Antecedente de infarto de miocardio con segmentos ventriculares aquinéticos (AK) o disquinéticos (DK), no viables, demostrados por dos métodos de estudio diferentes.
4. Grosor de la pared ventricular ≥ 5 mms. en la escara fibrótica.
5. Indicación de cirugía de revascularización miocárdica (CRM) por evidencia de isquemia residual.
6. Paciente no candidato a angioplastia coronaria percutánea y excluido de trasplante cardíaco.
7. Edad ≥ 21 años.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

1. Infarto de miocardio con un tiempo de evolución menor de 6 meses.
2. Serología positiva para virus de la inmunodeficiencia humana, hepatitis B o C.
3. Enfermedad infecciosa activa.
4. Enfermedad neoplásica en los 5 años previos o sin alta oncológica.
5. Enfermedad psiquiátrica comprobada o deficiencia cognitiva.
6. Patología de la médula ósea.
7. Embarazo o lactancia.

PACIENTES:

Nuestra experiencia ha incluido 22 pacientes consecutivos tratados con CMNMO entre abril del 2003 y julio del 2006, que se distribuyeron en dos grupos de estudio de acuerdo con la asociación o no de una matriz biodegradable de colágeno (Tabla 1).

- **Grupo I (sin matriz):** constituido por los 12 primeros pacientes del estudio (53.75 ± 10.76 años), a los cuales se les realizó CRM a la arteria descendente anterior, asociada con implante intramiocárdico de CMNMO, mediante la aplicación de 34 ± 8.6 inyecciones transepicárdicas. El volumen inyectado fue 5.1 ± 1.7 ml conteniendo $202 \pm 11 \times 10^6$ de CMNMO. El 0.7% implicaba células CD 34+. (Tabla 2A)
- **Grupo II (con matriz):** constituido por los 10 pacientes restantes (56.1 ± 7.63 años), a los cuales después de la CRM

	Grupo I	Grupo II
Edad (años)	53.75±10.76	56.1±7.63
Sexo femenino	0	1
Sexo masculino	12	9
Hipertensión Arterial	10 (83%)	9 (90%)
Diabetes Tipo II	4 (33%)	3 (30%)
Dislipidemia	10 (83%)	9 (90%)
Tabaquismo	7 (58%)	7 (70%)
Puente Mamario a la arteria DA	12	10

Tabla 1. Datos Comparativos pre-implante de los Grupos I y II

a la arteria descendente anterior, se implantó 15.7 ± 4.5 ml de una suspensión conteniendo $716 \pm 324 \times 10^6$ de CMN-MO, correspondiendo el 1.2% a células CD 34+. El 40% de esta suspensión se inyectó por vía transepicárdica en 21.5 ± 7.5 sitios en forma perimetral y en el interior de la escara. El 60% restante se utilizó para embeber la matriz de colágeno de origen bovino, biodegradable, de

$5 \times 7 \times 0.6$ cm que fué colocada sobre la escara fibrótica (Tabla 2B).

Todos los pacientes tenían síntomas clínicos de insuficiencia cardíaca en clase funcional II-III y evidencias de isquemia miocárdica en el territorio de la arteria descendente anterior, demostrada por angina y/o test funcionales ecográficos y radioisotópicos. El resto de las arterias coronarias no eran revascularizables.

N°	Sexo	Edad (años)	FEVI Eco (%)	DDVI Eco (mm)	Clase Funcional (NYHA)	FEVI Gamma (%)
1	M	69	29	63	3	26.7
2	M	47	21	68	2	21
3	M	47	40	45	2	26
4	M	54	19	56	3	19
5	M	44	21	60	2	21
6	M	43	19	59	2	19
7	M	53	22	71	3	15
8	M	78	33	65	2	33
9	M	52	30	57	2	30
10	M	56	26	74	3	26
11	M	59	35	64	2	35
12	M	43	22	80	3	26
		53.75±10.76	26.04±6.93	63.5±9.21	2.4±0.5	24.8±6.01

Tabla 2(A). Características pre-procedimiento. Grupo I

N°	Sexo	Edad (años)	FEVI Eco (%)	DDVI Eco (mm)	Clase Funcional (NYHA)	FEVI Gamma (%)
1	M	52	18	56	2	16
2	M	54	36	59	2	58
3	M	50	40	55	2	42
4	M	63	37	64.2	2	42
5	M	69	15	77	3	12.5
6	M	42	39	57	2	45
7	M	63	37	57.9	3	29
8	F	57	20	61	3	24
9	M	57	30	65	2	31
10	M	54	16	80	4	16.4
		56.1±7.06	28.8±10.35	63.21±8.72	2.5±0.7	31.59±14.89

Tabla 2(B). Características pre-procedimiento. Grupo II

Los datos preoperatorios promedio de estos pacientes se detallan en las Tablas 1 y 2. Este protocolo fue aprobado por el Comité de Ética de la Institución. Los pacientes incluidos recibieron extensa explicación del procedimiento y firmaron el consentimiento.

ESTUDIOS PREOPERATORIOS:

Los pacientes realizaron la rutina correspondiente al preoperatorio de CRM (exploración analítica, ecocardiografía doppler, ecografía de troncos supraaórticos, interconsultas clínicas y odontológicas, vacunación, cinecoronariografía). Se estableció la FEVI pre y post quirúrgica cuyo análisis se realizó con el método radioisotópico Gated-SPECT(99m)Tc sestamibi. El estudio de las imágenes obtenidas fueron procesadas y analizadas en: a) eje corto; b) eje largo y c) eje largo vertical. Se utilizó un *score* basado en la cuantificación de los defectos de perfusión, evaluados en cada segmento que oscila entre 0 y 4; 0 = perfusión normal; 1 = hipoperfusión leve; 2 = hipoperfusión moderada; 3 = hipoperfusión severa y 4 = aperfusión.

OBTENCIÓN, PREPARACIÓN Y AISLAMIENTO DE CMNMO:

Cuatro horas previas a la cirugía cardíaca, bajo condiciones de asepsia y anestesia local se realizaron múltiples punciones aspirativas en ambas crestas ilíacas póstero-superiores, con agujas 11G x 10cm y orificios laterales. En el Grupo I (sin matriz) se extrajeron 60ml de médula ósea y en en el Grupo II (con matriz) 120ml. Las células recogidas en ambos grupos fueron colocadas en un recipiente que contenía medio de cultivo RPMI y heparina para ser procesadas en el laboratorio en campana de flujo laminar(20). Las muestras fueron analizadas con un recuento de CMNMO por Coulter hematológico y un recuento de células CD 34+ por citometría de flujo; sistema

equipado con un láser de argón y un software Cell Quest. Las muestras fueron colocadas en tubos de 50ml para ser centrifugadas durante 20 minutos a 2000G, obteniendo la separación entre el plasma y los glóbulos sedimentados resultando una monocapa de células en el nivel medio. Esta monocapa celular se resuspendió con plasma autólogo hasta alcanzar un volumen de 5.1 ± 1.7 ml para el Grupo I, y de 15.7 ± 4.5 ml para el Grupo II. Posteriormente, se volvieron a tomar muestras para un recuento final de CMNMO y de CD 34+. Al ser dos poblaciones con requerimiento de volumen distinto, las diferencias entre los recuentos de CMNMO y CD 34+ no pueden ser analizados comparativamente, haciendo simplemente la descripción del procedimiento de obtención celular para el implante y los recuentos obtenidos en cada grupo. La cuantificación de la celularidad está representada en la Tabla 3.

CIRUGÍA DE REVASCULARIZACIÓN CARDÍACA E IMPLANTE CELULAR:

Los pacientes fueron intervenidos quirúrgicamente realizándose a todos CRM a la arteria descendente anterior con la arteria mamaria interna izquierda sin circulación extracorpórea; con el objetivo de evitar agregar variables de perfusión que invalidaran los resultados. Después de realizar la CRM, las células se inyectaron dentro y alrededor de las escaras, utilizando jeringas de 1ml y aguja calibre 27G en todos los segmentos comprometidos. Las punciones fueron realizadas en forma tangencial para reducir el riesgo que el contenido celular se derramara en la cavidad ventricular. Al Grupo II, se le agregó la colocación de una matriz de colágeno en la superficie epicárdica del área infartada embebida en CMNMO.

PREPARACIÓN Y COLOCACIÓN DE LA MATRIZ DE COLÁGENO:

La matriz de colágeno utilizada en el Grupo

	Vol. Final (ml)	CMNMO (10 ⁹)	CD34+ (%)
Grupo II (matriz)	15.7 ± 4.5	0.716 ± 0.32	1.2
Grupo I	5.1 ± 1.7	0.202 ± 0.11	0.7

Tabla 3. Cuantificación de la celularidad

II fue preparada con un compuesto aprobado por la Comunidad Europea* (EMEA). El tamaño es de 5 x 7 x 0.6mm, con microporos de 50-100 µm permitiendo el anclaje de las CMNMO. La matriz fue introducida en una cápsula de Petri y se embebió con la suspensión de CMNMO; posteriormente se colocó en un agitador orbital a 120rpm durante 10 minutos para lograr una adecuada homogeneización de la suspensión celular en el interior de la matriz, tras lo cual se adosó a la superficie epicárdica sobre la escara fibrótica, fijándola con puntos simples de polipropileno 4-0. Los pacientes fueron tratados, en el postoperatorio, con metilprednisolona 125mg durante 3 días endovenosa, seguida de prednisona 30mg/día vía oral en dosis decreciente hasta completar el primer mes.

ESTADÍSTICA:

Los resultados de las variables se expresaron como porcentaje o valor medio y su desvío standard. Para realizar la comparación pretratamiento y postratamiento se realizó el Test de Student para muestras apareadas en las variables continuas y en las no paramétricas el Test de Mann Witney.

Se consideró un valor de *p* menor a 0.05 para dar la significación estadística.

RESULTADOS

POSTOPERATORIO INMEDIATO:

No hubo complicaciones referidas a la punción medular ni tampoco a la CRM asociada con el implante de CMNMO. No se registraron arritmias malignas ni fallecimientos relacionados con el procedimiento. La asociación del implante celular no modificó la evolución postoperatoria ni tampoco prolongó la estancia hospitalaria. Los pacientes fueron dados de alta entre los 7 y 15 días sin diferencias entre los grupos.

SEGUIMIENTO:

Grupo I (sin matriz). Con un seguimiento

de 357 ± 162 días, la clase funcional NYHA pasó de 2.4 ± 0.5 a 1.1 ± 0.3 ($p < 0.0001$), la FEVI aumentó de 24.8 ± 6.0 a $36.3 \pm 13.4\%$ ($p = 0.003$) y el DDVI disminuyó de 63.5 ± 9.2 a $60.5 \pm 9.1\text{mm}$ ($p = \text{ns}$) (Tabla 4A).

Grupo II (con matriz). Con un seguimiento de 297 ± 128 días, la clase funcional NYHA pasó de 2.5 ± 0.7 a 1.2 ± 0.4 ($p < 0.0001$), la FEVI aumentó de 31.6 ± 14.9 a $39.3 \pm 18.4\%$ ($p = 0.01$) y el DDVI disminuyó de 63.2 ± 8.72 a $60.2 \pm 9.7\text{mm}$ ($p = 0.02$) (Tabla 4B).

DISCUSIÓN

PROTOCOLO:

Desde un punto de vista ético se actuó sobre pacientes que debían operarse y que secundariamente eran injertados con células en un modelo, cuya única variable alejada del análisis de viabilidad, era la revascularización de la arteria descendente anterior. Con esta estrategia, se evita la circulación extracorpórea y la posibilidad del síndrome inflamatorio por la circulación extracorpórea así como también las revascularizaciones múltiples.

La cirugía coronaria constituye una limitante en este protocolo a pesar que los pacientes presentaban únicamente isquemia en el área anteroseptal, remota a las escaras injertadas. Por otra parte, sabemos que no más de un 10% de segmentos no viables tienen la expectativa de mejorar con la revascularización miocárdica aislada lo cual significa un contraste con el 50% de segmentos recuperados en experiencias previas publicadas(3, 4, 6).

Además, los segmentos fibrosos tienen menos de un 25% de cardiomiocitos viables. Debido a que se necesita, por lo menos el 50%, de miocitos funcionalmente viables para que la revascularización sea exitosa, se debe reflexionar en que este cambio de la viabilidad en los segmentos disquinéticos y aquinéticos, pudo deberse al implante celular.

COMPONENTES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR. BIOMATERIALES:

La matriz extracelular está constituida por una red de proteínas y proteoglicanos que mantienen la estructura de los tejidos y regu-

*Pangen 2. Laboratorio Urgo. Chenôve. Francia.

lan la expresión de funciones específicas de las células con las que interaccionan.

Hay un activo intercambio entre las células y la matriz. Las primeras organizan la matriz y ésta efectúa la regulación celular(21).

La matriz extracelular contiene como componentes la sustancia fundamental amorfa (glucosaminoglucanos, proteoglucanos); proteínas fibrosas (colágeno); proteínas de adhesión (fibronectina, laminina, tenascina, nidógeno); células fijas (fibroblastos, fibrocitos, mesenquimales) y células errantes (macrófagos). A su vez, el colágeno tipo I (80%) tiene a su cargo el soporte estructural y el alineamiento espacial de los cardiomiocitos; mientras que el colágeno tipo III (10%) desarrolla su papel en el acortamiento del miocito interrelacionado con la función ventricular eyectiva(22).

Las interacciones entre los cardiomiocitos y los no miocitos se realizan a través de señalizaciones compuestas de proteínas (fibronectina, laminina, vitronectina), moléculas de adhesión (integrinas), proteínas citoesqueléticas (actina, alfa-actinina) y otros mediadores como las kinasa de adhesión local.

El gradiente de materia y energía entre la

matriz extracelular y los cardiomiocitos, es decir, entre células menos diferenciadas y más diferenciadas, mantiene un flujo de comportamiento que va desde lo menos estable y más lejos del equilibrio hacia lo más estable y cercano al equilibrio. Dicha matriz genera sustancias químicas (señalizadores) que estimulan el crecimiento y a la vez ofrece soporte físico a las células.

La elección de los biomateriales posee un papel principal en la ingeniería de tejidos porque deben servir no sólo de apoyo físico a las células, sino también tienen que proveer las sustancias químicas y biológicas necesarias para guiar el crecimiento, diferenciación, implantación, distribución y organización de las células. Igualmente, los biomateriales que podrían ser denominados biomiméticos, deben ser capaces de responder a estímulos celulares específicos, facilitar la formación de una red vascular capaz de proporcionar oxígeno y nutrientes necesarios al metabolismo celular y finalmente favorecer a la actividad electromecánica eventualmente desarrollada por las células(23-29).

Entre los biomateriales empleados y las células en ellos implantadas deben establecerse

Nº	DD		Clase		FEVI		Cámara Gamma (%)	
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
1	63	48	3	1	26.7	52		
2	68	68.1	2	1	21	35		
3	45	55	2	1	26	54		
4	56	57	3	1	19	20		
5	60	60.7	2	1	21	24		
6	59	56	2	1	19	28		
7	71	63	3	2	15	30		
8	65	48.5	2	1	33	59		
9	57	57	2	1	30	46		
10	74	67	3	1	26	29		
11	64	65.5	2	1	35	38		
12	80	80.5	3	2	26	21		
	63.5±9.21	60.52±9.07	2.4±0.5	1.16±0.38	24.8±6.01	36.33±13.43		
	p=ns		p<0.0001		p<0.003			

Tabla 4(A). Grupo I

interacciones a nivel molecular y ultraestructural, capaces de mimetizar los procesos fisiológicos que se verifican en los tejidos de nuestro organismo. Los compuestos constitutivos de las matrices deben poseer la especificidad biológica de los componentes fundamentales de la matriz extracelular, tales como colágeno de tipo I y tienen que tener propiedades físico-químicas de manera que permitan asegurar una resistencia adecuada durante un período determinado para dar lugar finalmente a la integración funcional y a la degradación que debe realizarse con una cinética adecuada; sin originar productos de degradación tóxicos ni desencadenar una respuesta inmunológica en el tejido huésped. A pesar de los progresos efectuados en los últimos años, no existe al momento actual, biomateriales que presenten todas las características anteriormente mencionadas, habiéndose utilizado numerosos componentes en la ingeniería de tejidos(30).

Se ha demostrado recientemente, en un modelo murino y ovino de infarto de miocardio, que la utilización combinada de terapia celular mediante la inyección intramiocárdica de células medulares y de ingeniería de tejidos por medio de una matriz de colágeno de tipo I y III embebida con el mismo tipo de células, aumenta la FEVI y reduce el remodelado ventricular(31). En esta investigación se

hallaron cambios significativos en el tiempo de desaceleración de llenado del ventrículo izquierdo que en el grupo con matriz aumentó de $162 \pm 7\text{mm}$ a $198 \pm 9\text{mm}$ ($p=0.001$); mientras que el grupo control pasó de $159 \pm 5\text{mm}$ a $167 \pm 8\text{mm}$.

Una de las propiedades de la matriz celular es la capacidad de acoger y formar una red vascular, capaz de proporcionar el aporte energético y nutritivo necesario al metabolismo celular. Considerando que todas las células son, en menor o mayor grado, sensibles a la isquemia; las matrices deben contar con una red capilar desarrollada antes o inmediatamente después de ser implantadas en los órganos afectados. A tal fin, sería viable incorporar a la matriz embebida con células, distintos factores angiogénicos como ser: el factor derivado de los fibroblastos (bFGF), el factor de crecimiento derivado del epitelio vascular (VEGF) y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), con el objetivo de estimular la angiogénesis. Asimismo, con el objetivo de estimular el crecimiento, la proliferación, la diferenciación celular y de la matriz extracelular se encuentran desarrollando nuevas estrategias como la utilización de la proteína ósea morfogenética (BMP), la cual podría estimular dichos parámetros(32).

N°	DD		Clase		FEVI		Cámara Gamma (%)	
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
1	56	55	2	1	16	38		
2	59	53	2	1	58	68		
3	55	51.8	2	1	42	50		
4	64.2	59.4	2	1	42	51		
5	77	74.5	3	2	12.5	15.4		
6	57	48	2	1	45	63		
7	57.9	57.5	3	1	29	38		
8	61	64.8	3	1	24	27		
9	65	60.6	2	1	31	27		
10	80	78	4	2	16.4	15.8		
	63.21±8.72	60.26±9.71	2.5±0.7	1.2±0.42	31.59±14.89	39.32±18.45		
	$p<0.02$		$p<0.0001$		$p<0.01$			

Tabla 4(B). Grupo II

RESULTADOS:

Luego de la experimentación animal correspondiente fue posible organizar este estudio con la inclusión de pacientes con cardiopatías isquémicas. El proyecto de *Myocardial Assistance by grafting a New Bioartificial Upgraded Myocardium (MAGNUM)* se basa en el uso de una matriz extracelular biodegradable, proangiogénica y ausente de propiedades de rechazos; es rectangular de 7 x 5 x 0.6cm, microporosa y está formada por colágeno tipo I y III. Las células madre son injertadas sobre esta matriz para servir de plataforma de crecimiento del nuevo tejido en forma tridimensional como sucede en la naturaleza.

En la miocardiopatía isquémica se produce una alteración en el nivel de colágeno tipo I que disminuye del 80 al 40% y también del colágeno tipo III que se incrementa del 10 al 35%. Estos cambios contribuyen al remodelado ventricular, a la dilatación sistólica y también a la disfunción diastólica.

Nuestra experiencia con cardiopatía isquémica necrótica tratada con implante de CM-NMO y CRM en cara anterior del miocardio (Grupo I) y asociada con matriz de colágeno (Grupo II) demuestra buenos resultados funcionales y hemodinámicos. En el Grupo II (con matriz) los resultados fueron significativos en la clase funcional NYHA, FEVI, DDVI. En el Grupo I (sin matriz), estos cambios se mostraron significativos en el análisis de la clase funcional y de la FEVI; no así en el DDVI. La matriz parece reforzar la escara fibrótica del infarto, limitando el remodelado ventricular. Así en el 90% de los pacientes se redujo el DDVI alcanzando significación estadística.

CONCLUSIONES

La utilización de la matriz celularizada de colágeno tiende a la reducción del diámetro diastólico ventricular y parece reforzar la escara fibrótica; lo que contribuiría a limitar el remodelado ventricular. La asociación de las técnicas de revascularización miocárdica, implante celular y colocación de matrices de colágeno biodegradable pueden mejorar los beneficios que cada tratamiento ofrece individualmente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Prosper F, Herreros J. Perspectivas futuras de tratamiento en la insuficiencia cardíaca: del trasplante a la regeneración cardíaca. *Rev Esp Cardiol* 2004; 57:981-8
2. Chachques JC, Acar C, Herreros J, Trainini JC, Prosper F, D'Atellis N, et al. Cellular cardiomyoplasty: Clinical Application. *Ann Thorac Surg* 2004; 77:1121-30
3. Lago N, Trainini JC, Genovese J, Barisani JL, Mouras J, Guevara E, et al. Tratamiento de la disfunción ventricular postinfarto mediante el cardiimplante de mioblastos autólogos. *Rev Argent Cardiol* 2004; 72:124-30
4. Trainini J, Lago N, Klein G, Mouras J, Guevara E, et al. Cardiomioplastia celular con médula ósea autóloga en pacientes con miocardiopatía isquémica. *Rev Argent Cardiol* 2004; 72:418-25
5. Kang H-J, Kim H-S, Zhang S-Y, Park K-W, Cho H-J, Koo B-K, et al. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilized with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomized clinical trial. *Lancet* 2004; 363:751-6
6. Trainini JC, Lago N, Masoli O, Mouras J, Guevara E, Barisani J, et al. Implante cardíaco de mioblastos. Resultados en el seguimiento a tres años. *Rev Argent Cardiol* 2006; 74:304-7
7. Prosper Cardoso F, Herrero González J, Alegría Ezquerro E. Perspectivas futuras de tratamiento en la insuficiencia cardíaca. Utilización de las células madre para la regeneración cardíaca. *Rev Arg Cir Cardiovasc* 2003; 1:15-23
8. Herreros J, Prosper F, Perez A, Gaviria JJ, García-Velloso MJ, Barba J, et al. Autologous antramyocardial injection of cultured skeletal muscle-derived stem cells in patients with non acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2003; 24:2012-20
9. Hagege AA, Carrion C, Menasché 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
10. Trainini JC, Cichero D, Lago N, Giordano R, De Paz J, Elencwajc B, et al. Autologous callular cardiac-implant. *Basic Appl Myol (BAM)* 2003; 13:39-44
11. Trainini J, Lago N, De Paz J, Cichero D, Gior-

dano R, Mouras J, et al. Transplantation of skeletal myoblast for repair of myocardial necrosis. *J Heart Lung Transplant* 2004; 23:503-5

12. Chachques JC, Herreros J, Trainini JC, Juffé A, Rendal E, Prosper F, et al. Autologous human serum for cell cultura avoids the implantation of cardioverter-defibrillators in cellular cardiomyoplasty. *Int J Cardiol* 2004; 95 (Suppl I) S29-S33

13. Anversa P, Kajstura J. Ventricular myocytes do not terminally differentiate in the adult mammalian heart. *Cir res* 1996; 78:536-46

14. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Joaknik I, Anderson SM, Lee B, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410:701-5

15. Nadal-Ginard B. Inducción de nuevos cardiomiocitos en el corazón adulto: futuro de la regeneración miocárdica como alternativa al trasplante. *Rev Esp Cardiol* 2001; 54:543-50

16. Trainini JC. Modelo termodinámico en la regeneración cardíaca. *Rev CONAREC* 2004; 74:59-64

17. Laflamme MA, Myerson D, Saffitz JE, Murry CE. Evidence for cardiomyocyte repopulation by extracardiac progenitors in transplanted human hearts. *Circ Res* 2002; 90:634-40

18. Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Shao-Min Y, Finato N, Bussani R, et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2001; 344:1750-7

19. Vacanti JP, Langer R. Tissue engineering: the design and fabrication on living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet* 1999 (Suppl I), 354:SI 32-S34

20. Griesel C, Heuft HG, Herrmann D, Arseniev L. Good manufacturing practice-compliant validation and preparation of bone marrow cells for the therapy of acute myocardial infarction. *Cytotherapy* 2007; 9:35-43

21. Shimizu T, Yamato M, Isoi Y, Akutsu T, Setomaru T, Abe K, et al. Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. *Circ Res* 2002; 90:e40

22. Trainini JC, Chachques JC, Lago N, Asistencia mecánica con matrices artificiales. *Rev Argent Cardiol* 2006; 74:401-5

23. Leor J, Cohen S. Myocardial tissue engineering: creating a muscle patch for a wounded heart. *Ann NY Acad Sci* 2004; 10015:312-9

24. Leor J, Patterson M, Quinones MJ, Kedes LH, Kloner RA. Transplantation of fetal myocardial tissue into the infarcted myocardium of rat. A potential method for repair of infarcted myocardium?. *Circulation* 1996; 94:II 332-II 336

25. Eschenhagen T, Didie M, Munzel F, Schubert P, Schneiderbanger K, Zimmermann WH. 3D engineered heart tissue for replacement therapy. *Basic Res Cardiol* 2002; 97 (Suppl I):I 146-I 152

26. Kofidis T, Akhyari P, Boublik J, Theodorou P, Martin U, Puhparwar A, et al. In vitro engineering of heart muscle: artificial myocardial tissue. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002; 124:63-9

27. Dar A, Shachar M, Leor J, Cohen S. Optimization of cardiac cell seeding and distribution in 3D porous alginate scaffolds. *Biotechnol Bioeng* 2002; 80:305-12

28. Akhyari P, fedak PW, Weisel RD, Lee TY, Verma S, Mickle DA, et al. Mechanical stretch regimen enhances the formation of bioengineered cardiac muscle grafts. *Circulation* 2002; 106:I 137-I 142

29. Chandy T, Rao GH, Wilson RF, Das GS. The development of porous alginate/elastin/PEG composite matrix for cardiovascular engineering. *J Biomat Appl* 2003; 17:287-301

30. Zimmermann WH, Melnychenko I and Eschenhagen T. Engineered heart tissue for regeneration of diseased hearts. *Biomaterials* 2004; 25:1639-47

31. Cortes Morichetti M, Fratti G, Chachques JC. Aplicación de ingeniería de tejidos en Cardiología: Miocardio bioartificial. En "Regeneración Cardíaca", Chachques JC, Herreros J, Trainini JC Ed. Magister Eos ED., Bs. As., 2005, pp 199-205

32. Hench LL, Xynos ID, Polak JM. Bioactive glasses for in situ tissue regeneration. *J Biomater Sci Polym Ed* 2004; 15:543-62