

ARTICULO ORIGINAL

► CÉLULAS MADRE EN EL CORAZÓN CHAGÁSICO

AUTORES:

DRES. JORGE CARLOS TRAININI / NOEMÍ LAGO / JAVIER BORDONE

Recibido: Junio 2012*Aceptado:* Julio 2012*Correspondencia:* jctrainini@hotmail.com

RESUMEN

Objetivo: El objetivo de la presente investigación es valorar la seguridad y factibilidad, como así mismo analizar los cambios clínicos y de la función ventricular en pacientes portadores de IC secundaria a miocardiopatía dilatada de origen chagásico, sometidos a cardioimplante de células mononucleares de médula ósea por cateterismo intracoronario.

Material y Métodos: De los ocho pacientes tratados por enfermedad de Chagas-Mazza, esta muestra analizada comprende 5 pacientes consecutivos con el seguimiento necesario para las conclusiones (3 masculinos), edad promedio de 55.8 ± 8.1 años, que presentaban IC secundaria a cardiomiopatía chagásica. Todos ellos tenían tres reacciones serológicas positivas para enfermedad de Chagas. Dos pacientes tenían colocados marcapasos definitivos. Los datos preoperatorios promedio de estos pacientes indicaban una clase funcional (NYHA) de 2.6 ± 0.5 en promedio, mientras que la fracción del ventrículo izquierdo correspondía al $26.4 \pm 5.7\%$; el diámetro diastólico ventricular izquierdo era de 61.6 ± 5.6 mm y el diámetro sistólico del ventrículo izquierdo de 46.9 ± 6.3 mm. La suspensión celular obtenida de células mononucleares de la médula ósea contenía (valores promedio) 10.6 ± 7 ml con un conteo de 1.43 ± 0.6 ($E+08$) de células con una viabilidad mayor al 95%. Correspondían a la fracción CD34+, 5.07 ± 9.51 ($E+06$) y a la CD133+, 5.11 ± 4.3 ($E+06$). El tiempo de isquemia inducida fue de unos 20 minutos. No hubo complicaciones ni óbitos hospitalarios.

Resultados: A los 22.8 ± 13.3 meses de seguimiento promedio, todos los enfermos se hallaban vivos en clase funcional I. Un paciente falleció a los 17 meses de muerte súbita luego de completado este análisis. En este tiempo de evolución, no se observaron efectos adversos en ninguno de los pacientes referidos al implante celular. Los estudios realizados en el control postoperatorio fueron los mismos que los llevados a cabo en el preoperatorio. Con relación a la fracción de eyección, la misma notó un incremento de $26.4 \pm 5.7\%$ en el preimplante a $35.6 \pm 5.3\%$ ($p < 0.05$). Por su parte, la clase funcional pasó de 2.6 ± 0.5 a 1 ± 0 ($p < 0.005$). Los datos obtenidos en la medición de los diámetros sistólico y diastólico del ventrículo izquierdo no mostraron cambios estadísticos significativos. Consideramos que el escaso número de pacientes implica que esta situación debemos caracterizarla como una tendencia hacia la significancia.

Conclusiones: Nuestros pacientes toleraron bien el procedimiento, resultando éste seguro y factible. Hallamos una franca y sostenida mejoría de la clase funcional en el seguimiento alejado. Esto se asoció a un aumento de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo con discreta mejoría de los diámetros ventriculares. Obviamente, el pequeño número de casos hace que sólo podamos hablar de tendencia en los resultados.

Palabras clave: Chagas. Células madre. Cardiopatía. Insuficiencia cardíaca.

RESUMO

CÉLULAS TRONCO NO CORAÇÃO CHAGÁSICO

Objetivo: O objetivo deste trabalho de pesquisa é valorizar a segurança e factibilidade, além da análise de mudanças clínicas e da função ventricular em pacientes portadores de IC secundária à miocardiopatia dilatada de origem chagásica, submetidos a cardioimplante de células mononucleares de medula óssea por cateterismo intracoronariano.

Material e Métodos: Dos oito pacientes tratados por doença de Chagas-Mazza, esta amostra analisada compreende 5 pacientes consecutivos com o acompanhamento necessário para as conclusões (3 masculinos), média de idade, de 55.8 ± 8.1 anos, que apresentavam IC secundária à cardiomiopatia chagásica. Todos tiveram três reações serológicas positivas para a doença de Chagas. Dois pacientes eram portadores de marcapassos definitivos. A média dos dados pré operatórios destes pacientes indicava uma classe funcional de, em média, (NYHA) de 2.6 ± 0.5 , enquanto a fração do ventrículo esquerdo correspondia a $26.4 \pm 5.7\%$; o diâmetro diastólico ventricular esquerdo era de 61.6 ± 5.6 mm e o diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo de 46.9 ± 6.3 mm. A suspensão celular obtida de células mononucleares da medula óssea continha (valores médios) 10.6 ± 7 ml com uma contagem de 1.43 ± 0.6 ($E+08$) de células com uma viabilidade superior a 95%. Correspondiam à fração CD34+, 5.07 ± 9.51 ($E+06$) e à CD133+, 5.11 ± 4.3 ($E+06$). O tempo de isquemia induzida foi de 20 minutos aproximadamente. Não ocorreram complicações nem óbitos hospitalares.

Resultados: Após 22.8 ± 13.3 meses de seguimento médio, todos os doentes se encontravam em classe funcional I. Um paciente faleceu 17 meses depois, de morte súbita, após o término desta análise. Durante este tempo de evolução, não foram observados efeitos adversos em nenhum dos pacientes referidos ao implante celular. Os estudos realizados no controle pós operatório foram os mesmos que os realizados no período pré operatório. Com relação à fração de ejeção, esta apresentou um aumento de $26.4 \pm 5.7\%$ no período de pré implante: $35.6 \pm 5.3\%$ ($p<0.05$). Por sua parte, a classe funcional passou de 2.6 ± 0.5 para 1 ± 0 ($p<0.005$). Os dados obtidos na medição dos diâmetros sistólico e diastólico do ventrículo esquerdo não mostraram mudanças estatísticas significativas. Consideramos que o escasso número de pacientes implica que esta situação deve ser caracterizá-la como uma tendência à significância.

Conclusões: Nossos pacientes toleraram bem o procedimento, demonstrando ser seguro e factível. Observamos uma ampla e demonstrada melhora da classe funcional no seguimento à distância. Isto foi associado a um aumento da fração de ejeção do ventrículo esquerdo com discreta melhora dos diâmetros ventriculares. Devido ao pequeno número de casos, só podemos falar de tendência nos resultados obtidos.

Palavras chave: Chagas. Células Tronco. Cardiopatia. Insuficiência cardíaca.

ABSTRACT

STEM CELLS IN THE CHAGAS HEART

Purpose: The purpose of this research is to assess the safety and feasibility, as well as the clinical and ventricular function changes, in patients with heart failure secondary to Chagas dilated cardiomyopathy, of cardiac bone marrow mononuclear cell transplantation carried out by intracoronary catheterization.

Material and Methods: Out of eight patients with Chagas-Mazza disease, the sample analyzed includes 5 consecutive patients with the controls necessary to reach the conclusions (3 males), average age 55.8 ± 8.1 years, with heart failure secondary to Chagas cardiomyopathy. They all presented three positive serological reactions for Chagas disease. Two patients had a definitive

pacemaker placed. Average preoperative data of these patients indicated an average functional class (NYHA) of 2.6 ± 0.5 while the left ventricular ejection fraction corresponded to $26.4 \pm 5.7\%$; the left ventricular diastolic diameter was 61.6 ± 5.6 mm and the left ventricular systolic diameter was 46.9 ± 6.3 mm. The cell suspension obtained from bone marrow mononuclear cells contained (average values) 10.6 ± 7 ml, counting 1.43 ± 0.6 ($E+08$) cells with a viability over 95%.

5.07 ± 9.51 ($E+06$) corresponded to the CD34+ fraction, 5.11 ± 4.3 ($E+ CD133+$, 06) to the CD133+. The induced ischemia time was around 20 minutes. There were no hospital complications nor deaths.

Results: At 22.8 ± 13.3 months of average follow-up all patients were alive and in functional Class I. One patient died after 17 months due to a sudden death after completing this analysis. During the follow-up there were no side effects in any of the patients related to the cell transplantation. The tests carried out in the postoperative period were the same as in the preoperative one. In relation to the ejection fraction, it increased from $26.4 \pm 5.7\%$ before the transplantation to $35.6 \pm 5.3\%$ ($p < 0.05$). In turn, the functional class improved from 2.6 ± 0.5 to 1 ± 0 ($p < 0.005$). The data collected about the measurements of the left ventricular systolic and diastolic diameters did not show statistically significant changes. We believe that the small number of patients implies that this situation may be characterized as a trend towards significance.

Conclusions: Our patients tolerated the procedure well and it resulted to be safe and feasible. There was an overt and sustained improvement of the functional class in the long term follow up. This was associated to an increase in the left ventricular ejection fraction with a discrete improvement of ventricular diameters. Obviously, the small number of cases only allow us to indicate a trend in the results.

Key words: Chagas. Stem cells. Cardiomyopathy. Cardiac Insufficiency.

INTRODUCCIÓN

El tratamiento médico de la insuficiencia cardíaca (IC) ha mejorado sustancialmente el pronóstico de la mayoría de los pacientes. Sin embargo, indefectiblemente, la disfunción ventricular progresará, los síntomas limitarán progresivamente la calidad de vida con frecuentes internaciones por descompensación y el paciente terminará por ingresar al período refractario de la enfermedad.

Son pocos los enfermos que pueden tener el beneficio del trasplante cardíaco. Una posibilidad en estos casos es ofrecerle al paciente un tratamiento alternativo, que incluye revascularización miocárdica, técnicas de corrección de la insuficiencia mitral y/o reducción ventricular, asistencia biológica o asistencia mecánica prolongada(1). Últimamente, se ha agregado el implante de células o cardiomioplastia celular con el fin de promover la regeneración cardíaca y, de esta forma, actuar directamente sobre la masa cardíaca insuficiente(2-3).

El miocardio adulto es incapaz de reparar en forma efectiva su lesión después de un infarto, debido a la escasez de células madre residentes(4-5). Por esta razón, se han diseñado distintas estrategias de trasplante celular para el tratamiento de la IC con el fin de reemplazar las células perdidas con otras células que puedan realizar el mismo trabajo. Para lograr la regeneración miocárdica, se ha ensayado el trasplante con diferentes tipos de células, como mioblastos autólogos, células madre derivadas del estroma de la médula ósea, células progenitoras circulantes en la sangre, células del músculo liso, células del endotelio vascular y células madre del embrión(6-9).

Las miocardiopatías dilatadas no isquémicas son causa frecuente de IC con elevada morbimortalidad. En estas miocardiopatías en general no hay escara circunscripta y el área de disfunción ventricular anatomofuncional suele ser generalizada y homogénea. Sin embargo, no es excepcional que en la cardiomiopatía de origen chagásico, coexistan anomalías

regionales e incluso aneurismas de la punta del ventrículo izquierdo. La posibilidad de regeneración miocárdica, en estos casos, podría detener la evolución y mejorar los síntomas y la función ventricular global.

Estudios experimentales en modelos con miocardiopatía dilatada, demostraron que la incorporación de células progenitoras se tradujo en una mejoría de la función contráctil(10). De todas formas, la experiencia clínica con cardiimplante celular autólogo en la enfermedad de Chagas-Mazza es aún escasa.

El objetivo de la presente investigación es valorar la seguridad y factibilidad, como asimismo analizar los cambios clínicos y de la función ventricular en pacientes portadores de IC secundaria a miocardiopatía dilatada de origen chagásico, sometidos a cardiimplante de células mononucleares de médula ósea.

CÉLULAS DE LA MÉDULA ÓSEA (MO)

Las células madre fueron identificadas por primera vez en el sistema hematopoyético por Ernest Mc Culloch y James Till en 1961 en experimentos donde se mostraba que células aisladas de la MO de ratón podían proliferar y generar múltiples tipos diferenciados de células sanguíneas. Las células madre hematopoyéticas (CMH) están bien caracterizadas y la producción de células sanguíneas constituye un buen ejemplo del papel de la célula madre en el mantenimiento de las poblaciones celulares diferenciadas.

Se conoce que en la MO existe una población celular muy heterogénea, aunque los diversos tipos de células progenitoras, así como los mecanismos de control de su función y diferenciación, aún no están bien comprendidos. Se encuentran progenitores hematopoyéticos (CD 34+), precursores endoteliales (CD133+), las células mesenquimales (estromales) (CD 34-) y otras llamadas como población lateral y las células progenitoras adultas multipotentes, conocidas por su sigla en inglés como MAPC(11). Por lo tanto, de los diferentes tipos de células madre, las provenientes de la MO parecen ser, hasta el momento, las que han demostrado mayor capacidad de diferenciarse, sin un mecanismo totalmente claro hasta la actualidad. Aún se desconoce

cuál es el rol específico y si realmente son diferenciadas a cardiomiocitos o si generan una angiogénesis en el área del cardiimplante produciendo una reacción inflamatoria con liberación de citoquinas y atracción de células madre cardíacas (CMC) hacia la zona de neovascularización.

Las células madre hematopoyéticas (CMH) pueden obtenerse de la MO con el procedimiento habitual y ésta es la fuente más utilizada, pero son posible de obtenerse de la sangre periférica, luego de ser movilizadas mediante el uso de factores de crecimiento granulocítico(FC-G), el granulocito macrofágico (FC-GM), el "*stem cell factor*" (SCF) o una asociación de factores. Los dos antígenos de superficie para poder identificarlas y cuantificarlas son el CD 34+ y CD 133+ por citometría de flujo.

Las células madre mesenquimales (CMM) - llamadas así por Pittenger - determinaron su capacidad para transformarse en tejidos del mesodermo (adipositos, mioblastos, osteoblastos, etc.). En un principio, se vio su capacidad en muestras de MO *in vitro* que daban el soporte a la hematopoyesis a través de señales de adhesividad y producción de citoquinas generándole un microambiente a las CMH. Pero, posteriormente, se pudo establecer que *in vitro* también inducían, por diferentes vías, múltiples linajes celulares, incluidos cartílago, hueso y corazón.

Una segunda población de células madre adherentes no hematopoyéticas llamadas células progenitoras adultas multipotentes (MAPC) fueron descritas por Verfaillie y colaboradores(11). Estas células se obtienen después de meses de cultivo con una función de adherencia e *in vitro* son inducidas a múltiples vías de diferenciación, tanto mesenquimales como no mesenquimales. Sin embargo, las MAPC que provienen de MO de humanos tienen diferentes dificultades en su obtención ya que disminuyen la eficiencia de las mismas con la edad y requiere técnicas de cultivo específicas (prolongada baja densidad), creándose una barrera para su desarrollo en la práctica clínica. Por lo tanto, las CMM son en la actualidad las células del estroma hematopoyético que más se han utilizado en medicina regenerativa y enfermedad cardiovascular.

Las células madre endoteliales (CME) aso-

ciadas con el linaje de las CMH son definidas por citometría de flujo con los antígenos de superficie CD 34+/ VEGFR - 2 + (factor de crecimiento endotelio vascular) o CD 133+/ VEGFR -2+ y circulan en pequeña cantidad en individuos sanos (menos del 0,01% de células mononucleares). La propuesta específica de las CME es fisiológica en la reparación del daño endotelial, siendo atraídas hacia zonas de injuria por la secreción de atractores como el VEGF o factores derivados del estroma y, de esta manera, mantener la función endotelial normal y la homeostasis.

POSIBILIDADES DEL IMPLANTE CELULAR EN LA CARDIOMIOPATÍA DILATADA NO ISQUÉMICA

Considerable expectativa se observó desde el inicio de la Fase Clínica a partir del año 2000 con el implante celular en el intento de recuperar la viabilidad del miocardio, tanto en estadios agudos como crónicos de su patología. A pesar que su porvenir puede mirarse con optimismo, no hubo coherencia en su desarrollo metodológico. Se precipitó el tema hacia resultados “todo o nada”, incorporándolo a lo mediático, sin tener en cuenta el análisis de pautas metodológicas encadenadas con el fin de ser dilucidado. El recurso de regenerar tejidos utilizados por la naturaleza necesita ser revelado en su inteligibilidad en sus etapas fundamentales que se extienden desde la investigación básica hacia la aplicada.

Hasta el momento, se adoleció de estrategias de investigación que trataran de resolver adecuadamente la requisitoria primigenia: ¿el implante celular modifica la viabilidad en una cicatriz fibrosa? Fundamentalmente, se ha optado por el modelo de isquemia aguda que representa un atractor que nuclea a demasiadas variables de acción sincrónica, imposibles de investigar en forma independiente, las cuales enturbian el análisis de la utilización de células progenitoras de la médula ósea (v.gr. reperfusión por angioplastia, recirculación espontánea en la zona injuriada, actividad colagenolíticas de las metaloproteinasas, implante celular). Aquí cabe la aplicación del principio de incertidumbre de Heisenberg. Mientras aplicamos angioplastia a la zona re-

cientemente isquémica, de eficacia comprobada, desconocemos al mismo tiempo cuánto de evolución se debió a las *stem cell*. Y mientras utilizamos estas células, desconocemos la porción de beneficio correspondiente al reparo natural por reperfusión.

Es así que, primordialmente, se utilizaron modelos agudos que obviamente pueden ser más eficaces en la demostración de los resultados positivos, antes que apelar a desarrollos lógicos para revelar la razón de lo que estamos aplicando. En realidad, estos modelos dejan abierto el dilema sobre el incremento de la viabilidad real y topográfica. Centran su búsqueda en resultados funcionales que se hallan lejos del escalón inicial de la viabilidad orgánica que se debe demostrar con los modelos más puros posibles, tratando de alejarnos de la incertidumbre de mejorar la zona injuriada a través de varios procedimientos simultáneos. Vemos en ellos efectos casuales y sumatorios, no las causas que los producen.

En el modelo crónico fibrótico, el análisis estricto de la eficacia debe relacionarse en sus resultados con el objetivo básico planteado, el que consiste en observar los cambios producidos en las áreas no viables, metabólicamente inactivas e irrevascularizables, las cuales se implantaron con células. En este aspecto, son fundamentales los estudios que evidencien beneficios en los segmentos tratados, ya que estos pacientes son revascularizados concomitantemente. Esta situación constituye una limitante aún en este modelo, aunque ellos presenten únicamente isquemia en un área remota a las escaras injertadas.

Para avanzar en este tema, se debía contar con una metodología dentro de lo ético y que además dé pautas fundamentales en el cambio de la viabilidad de los segmentos tratados y que incluya el menor número de variables posibles para conservar la especificidad del análisis. Nuestro estrategia se basó en la selección de pacientes con una franja del ventrículo izquierdo viable, pasible de revascularizar la descendente anterior únicamente sin circulación extracorpórea, sin viabilidad ni arterias pasibles de cirugía en los segmentos restantes y con infartos de más de seis meses de constituidos para evitar la posibilidad de la recuperación espontánea. De esta forma, éticamente 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 descendente anterior. Con este modelo, se evitó la circulación extracorpórea y la posibilidad de síndrome inflamatorio post bomba, así como las revascularizaciones múltiples. Otro hecho de importancia en este análisis fue considerar los segmentos acinéticos y discinéticos. Los hipocinéticos, si bien fueron tratados con implante de células mononucleares en el mismo acto operatorio, se excluyeron del análisis para evitar el posible efecto benéfico sobre ellos de la cirugía de revascularización miocárdica.

Por otra parte, sabemos que no más de un 10% de segmentos no viables tienen la expectativa de mejorar con la revascularización miocárdica aislada. 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, es concebible reflexionar en que un cambio en la viabilidad de los segmentos discinéticos y acinéticos puede deberse al implante celular.

Volvemos a inferir que en ciencia es más factible ver los efectos que las causas. De los posibles modelos agudos (isquemias agudas) y crónicos (miocardios fibróticos, cardiomiopatías dilatadas, Chagas) es fundamental trabajar en los cambios de viabilidad en forma exhaustiva con comprobación por medio del SPECT, PET o RMN. Lograr la comprobación de un cambio en la viabilidad de los segmentos comprometidos significa el paso trascendental en este tema. Posiblemente deban utilizarse escalas de score adecuadas a cambios mínimos, en lugar de las actuales que establecen la viabilidad de segmentos demasiados amplios para los cambios que pueden introducir las células progenitoras.

En relación a la situación clínica, creemos que la experiencia acumulada en este último lustro ha demostrado algunos aspectos que avizoran una imagen a la espera de ser develada. Debemos contentarnos con lo parcial y lo provisional, a pesar de la tendencia que tiene el hombre en su reclamo de unidad y coherencia, en la visualización de un mundo que presenta como rasgo fundamental la diversi-

dad.

Distintos aspectos nos llevaron a establecer la posibilidad de regenerar tejido cardíaco en las miocardiopatías dilatadas, entre ellas la enfermedad de Chagas-Mazza. Y ellos fueron forjados a través del conocimiento que se adquirió con el desarrollo de la técnica en la patología arteriosclerótica y la interpretación de los resultados obtenidos. Estas etapas pueden ser ordenadas de acuerdo a lo siguiente:

1) Observación de la viabilidad con mioblastos en un período de seguimiento a tres años.

Si tomamos en cuenta en nuestro primer estudio clínico a los segmentos comprometidos en cinco pacientes tratados con mioblastos, y se los divide en infarto transmural, infarto no transmural, isquémicos y normales, hallamos que sobre 68 segmentos pasibles de estudio a los 33 ± 6.05 meses, se observó un claro retroceso de los segmentos con infarto transmural y un incremento en los segmentos no transmurales e isquémicos. En los segmentos con compromiso transmural, los mismos retrocedieron de 15 a 3, correspondiendo a un 80% de eficacia ($p < 0.005$). El análisis de los segmentos no transmurales debe ser exhaustivo. Si bien los mismos globalmente aumentaron de 7 a 10, aquellos segmentos no transmurales registrados originariamente en el preoperatorio descendieron de 7 a 2, un 72 %. Se puede explicar que el aumento global de estos segmentos no transmurales, correspondió a segmentos incorporados tanto por el avance de la enfermedad como a expensas de los transmurales, en claro retroceso del tejido fibrótico (3-12-13).

2) La introducción de las células madre de la médula ósea permitió trabajar con la vía de implante por vía intracoronaria por cateterismo.

Esta circunstancia se halla en relación al diámetro celular. Los 30 micrones de los mioblastos pueden precipitar por vía intracoronaria pequeños infartos, situación que las células de la médula ósea permanecen exentas al tener sólo la mitad, unos 15 micrones (9).

3) La experiencia con células madre de la médula ósea mostró una mejor perspectiva de regeneración en aquellos segmentos de infarto no transmural en relación a los transmurales

El análisis segmentario del corazón nos muestra que de los 74 segmentos tratados con implante de *stem cells* en 13 pacientes que sobrepasaron el año de seguimiento, se recuperaron 43 de ellos, es decir un 58% ($p < 0.0001$). De 8.2 ± 3.1 segmentos no viables por paciente se redujo a 3.4 ± 2 . Los segmentos fueron divididos por su viabilidad en necrosis transmurales y no transmurales. Del total de 74 segmentos no viables en estos pacientes, 54 presentaban compromisos transmural y 20 no transmurales. En los primeros, la recuperación alcanzó al 46% de ellos, mientras que en los no transmurales esta cifra se incrementó al 90%. Esta observación implica una posible concepción terapéutica tanto en lo que hace a la utilización precoz del cardioimplante celular en el curso de infartos completos/subcompletos, como a su uso en cardiomiopatía dilatada idiopática y en la enfermedad de Chagas-Mazza. La interpretación es que en los miocardios atigrados, con mosaico de zonas viables y no viables, la posibilidad de recuperación sería mayor que en el modelo necrótico,

constituido con extensa dilatación y escasas fibras extensas(14).

EXPERIENCIA EN CHAGAS

Selección de pacientes

En la Tabla 1 se resume el protocolo utilizado en nuestro hospital, para el trasplante de *stem cells* de médula ósea en pacientes con miocardiopatía dilatada de origen no coronario e IC avanzada. Los pacientes deben encontrarse en esta condición a pesar del cumplimiento estricto del tratamiento médico optimizado y estable durante al menos cuatro semanas con: diuréticos, digoxina, betabloqueantes, inhibidores de la ECA o antagonistas de la angiotensina y espironolactona. En el caso de realizarse en un paciente portador de cardiopatía de origen chagásico avanzada, la enfermedad deberá estar acreditada por análisis serológicos.

El enfermo deberá recibir, previo al implante, tratamiento parasitocida. A los pacientes tratados se les proporcionó, durante dos meses anteriores al implante, tratamiento con Beznidazol. Asimismo sus hábitat fueron desparasitados con fumigación y sometidos a con-

• Criterios de inclusión:

- Miocardiopatía dilatada idiopática, chagásica o de causa no reversible.
- Insuficiencia Cardíaca en Clase Funcional (NYHA) II-IV bajo tratamiento médico optimizado y estable en las últimas 4 semanas.
- Fracción de Eyección del Ventrículo Izquierdo menor o igual a 35 %.
- Coronarias angiográficamente normales o con lesiones no significativas.

• Criterios de exclusión:

- Candidato a trasplante cardíaco con buenas probabilidades.
- Insuficiencia hepática o renal severa.
- Miocarditis aguda.
- Etiología etílica u otras causas reversibles de disfunción ventricular.
- Serología viral positiva (VIH, citomegalovirus, hepatitis B y C, etc.)
- Embarazo o lactancia.
- Falta de adherencia al tratamiento y controles clínicos.

Tabla 1. Selección de pacientes para implante intracoronario de stem cell autólogas en miocardiopatía dilatada no isquémica. (Hospital Presidente Perón, Buenos Aires, Argentina)

troles periódicos con el fin de evitar la reinfección luego del implante celular.

Este protocolo tuvo aprobación del Comité de Ética de la Institución. Los pacientes incluidos recibieron extensa información y dieron su consentimiento al mismo.

Estudios pre y postoperatorios.

Se los analizó con ecocardiograma doppler, ventriculografía isotópica, cinecoronariografía y ventriculografía izquierda. Se realizó perfusión miocárdica en cámara SPECT gatillada con MIBI Tc 99m (reposo/dipiridamol) y ecostress con dobutamina para establecer la viabilidad miocárdica. La motilidad parietal segmentaria fue examinada en condiciones basales, a través de ecógrafos SONOS 2500 y SONOS 5500 (Hewlett Packard; Andover, Massachussets, USA), utilizando colorkinesis y armónicas de fusión, respectivamente. El puntaje (*score*) de movilidad parietal se dispuso según las normas de la American Heart Association de (segmentos cardíacos=17)(15). Los resultados de los estudios fueron analizados por dos especialistas diferentes tomando como segmentos no viables solamente aquellos en los que ambas evaluaciones coincidían. La evaluación postoperatoria fue realizada por los mismos operadores. Para este trabajo, se analizaron comparativamente los datos clínicos, ecocardiográficos y la fracción de eyección radioisotópica preoperatorios y en el seguimiento alejado.

Población

Desde diciembre de 2001, 96 pacientes fueron implantados con técnicas de regeneración. La etiología tratada fue aterosclerótica en 74 pacientes, cardiomiopatía dilatada idiopática en 11, Enfermedad de Chagas en 8, cardiomiopatía por Lupus en 2 y tóxica en el restante. El abordaje utilizado fue epicárdico en 57 pacientes e intracoronario en 39.

De los ocho pacientes tratados por enfermedad de Chagas-Mazza, esta muestra analizada comprende 5 pacientes consecutivos con el seguimiento necesario para las conclusiones (3 masculinos), edad promedio de 55.8 ± 8.1

años, que presentaban IC secundaria a cardiomiopatía chagásica. Todos ellos tenían tres reacciones serológicas positivas para enfermedad de Chagas. Dos pacientes tenían colocados marcapasos definitivos. Los datos preoperatorios promedio de estos pacientes indicaban una clase funcional (NYHA) de 2.6 ± 0.5 en promedio, mientras que la fracción del ventrículo izquierdo correspondía al 26.4 ± 5.7 %. El diámetro diastólico ventricular izquierdo era de 61.6 ± 5.6 mm y el diámetro sistólico del ventrículo izquierdo de 46.9 ± 6.3 mm (Tabla 2).

Preparación celular

Las células progenitoras de la médula ósea fueron obtenidas mediante la aspiración de 100 ml de médula ósea por punción de la cresta ilíaca realizada 4 horas previas al implante bajo anestesia local con lidocaína al 2%. En ese lapso, la muestra fue filtrada con el fin de remover detritos, tales como fragmentos grasos. A continuación, se centrifugó mediante un gradiente de Ficoll Hystopaque. La fracción mononuclear obtenida fue entonces diluida y centrifugada nuevamente con solución salina. Una porción mínima fue designada para test de viabilidad y citometría de flujo.

La porción restante fue resuspendida en solución de suero autólogo e inyectado por vía intracoronaria (descendente anterior, circunfleja y coronaria derecha). La suspensión celular obtenida de células mononucleares de la médula ósea contenía (valores promedio) 10.6 ± 7 ml con un conteo de 1.43 ± 0.6 ($E+08$) de células con una viabilidad mayor al 95%. Correspondían a la fracción CD34+, 5.07 ± 9.51 ($E+06$) y a la CD133+, 5.11 ± 4.3 ($E+06$). El tiempo de isquemia inducida fue de unos 20 minutos. No hubo complicaciones ni óbitos hospitalarios.

Estadística

Los resultados fueron evaluados como valores promedios \pm desvío estándar. Se realizó una comparación de datos preoperatorios y posoperatorios utilizando el t test, con una $p < 0.05$ como límite de significancia.

RESULTADOS

A los 22.8 ± 13.3 meses de seguimiento promedio, todos los enfermos se hallaban vivos en clase funcional I. Un paciente falleció a los 17 meses de muerte súbita luego de completado este análisis. En este tiempo de evolución, no se observaron efectos adversos en ninguno de los pacientes referidos al implante celular. Los estudios realizados en el control postoperatorio fueron los mismos que los llevados a cabo en el preoperatorio.

En relación a la fracción de eyección, la misma notó un incremento de 26.4 ± 5.7 % en el preimplante a 35.6 ± 5.3 % ($p < 0.05$); por su parte la clase funcional pasó de 2.6 ± 0.5 a 1 ± 0 ($p < 0.005$). Los datos obtenidos en la medición de los diámetros sistólico y diastólico del ventrículo izquierdo no mostraron cambios estadísticos significativos (Tabla 2). Consideramos que el escaso número de pacientes implica que esta situación debemos caracterizarla como una tendencia hacia la significancia.

DISCUSIÓN

Con los resultados previos discernimos que la Enfermedad de Chagas-Mazza era pasible de tratamiento, ya que ella se caracteriza por fibrosis miocárdica difusa e infiltrados compuestos de linfocitos, células plasmáticas y

macrófagos, indicando un proceso activo continuo de pérdida de miocitos y activación del colágeno. Debido a esta disposición diseminada en focos inflamatorios es factible lograr mejores resultados que con las escaras de tamaño considerable y ya constituidas que ofrece el modelo aterosclerótico luego de producido el infarto.

Además, en la Enfermedad de Chagas-Mazza se produce una elevada cantidad de citoquinas debido al foco persistente de inflamación. Estos factores ayudarían a la atracción celular y a la fijación de las células inyectadas hacia dichos focos, como asimismo en la diferenciación futura.

Definir las indicaciones de un procedimiento relativamente nuevo, donde aún no se han fijado los límites de sus resultados, es siempre conflictivo. Esto es más difícil al no haberse aclarado totalmente cuestiones éticas, técnicas y clínicas. Aún persiste el interrogante sobre cuál es el mejor tipo de célula para cada caso, cuál la vía de abordaje ideal y si se deben asociar o repetir los procedimientos.

Sin duda el escenario ideal para la demostración de resultados es la cardiopatía isquémica crónica con amplias zonas de fibrosis miocárdica y disfunción ventricular sintomática. De hecho, la mayor parte de los estudios clínicos se realizaron en este tipo de enfermos. En estos casos, si se asocian áreas isquémicas o viables y las coronarias tienen lechos

CF (NHYA)			Fey (%)		DDVI (mm)		DSVI (mm)	
paciente	pre	post	pre	post	pre	post	pre	post
1-F	III	I	21	39	65.4	56	58.1	46
2-F	III	I	22	34	65	61	47	47
3-M	II	I	29	42	64.3	64	51.4	49
4-M	II	I	35	35	52	51	38	38.2
5-M	II	I	25	28	61.6	61	51.3	50.4
Promedios	2.6±0.5	1±0	26.4±5.7	35.6±5.3	61.6±5.6	58.6±5.1	46.9±6.3	45.0±4.7
P	<0.005		<0.05		NS		NS	

Referencias. CF: Clase Funcional; Fey: Fracción de eyección del ventrículo izquierdo; DDVI: Diámetro diastólico del ventrículo izquierdo; DSVI: Diámetro sistólico del ventrículo izquierdo; F: femenino; M: masculino.

Tabla 2. Evaluación pre y post implante a los 22.8 ± 13.3 meses de seguimiento

aceptables para ser revascularizadas, los dos procedimientos deben ser combinados.

Tal vez el mayor interrogante lo presenten las miocardiopatías dilatadas no isquémicas como la enfermedad de Chagas-Mazza, con daño difuso del miocardio y pérdida progresiva y más o menos uniforme de cardiomiocitos. La escasa experiencia en estas patologías obligan a la prudencia en la selección de pacientes, escogiendo sólo los que se presentan sintomáticos a pesar del tratamiento médico optimizado, completo e individualizado y que presenten dificultades para ser trasplantados en un tiempo razonable.

En Argentina y en buena parte de Latinoamérica, la enfermedad de Chagas-Mazza sigue siendo un flagelo, por lo que es esperanzador pensar que tal vez este tipo de terapia pueda tener aplicación. La persistencia del parásito en el organismo, las arritmias ventriculares graves y los trastornos de conducción que suelen asociarse a esta cardiopatía, son un problema que seguramente limitarán y dificultarán su implementación.

Desde el punto de vista experimental, en ratones chagásicos implantados con células de la médula se observó reducción de infiltrados inflamatorios y desaparición de fibrosis intersticial característicos de la afección (16).

En la fase clínica, en Brasil se inyectaron por cateterismo 28 pacientes en Clase Funcional III-IV. Aunque esta experiencia fue referida con sólo dos meses de seguimiento, los pacientes mejoraron los índices de clase funcional, caminata de seis minutos y la calidad de vida. El número de latidos prematuros se incrementó pero sin hallarse aumento de episodios de taquicardia ventricular (17).

Si bien la experiencia de nuestro hospital se inició al mismo tiempo, nuestra estrategia se basó en realizar un estudio inicial pequeño y vigilar su seguimiento por un lapso más prolongado. El estudio demostró seguridad, no apareciendo efectos adversos atribuibles al procedimiento. En nuestra muestra, la única paciente fallecida a los 17 meses se hallaba en clase funcional I siendo la causa una muerte súbita. La misma vivía en un área endémica, a pesar de que su domicilio estuvo sometido a vigilancia epidemiológica. Si bien este óbito se produjo por arritmia ventricular, los controles periódicos en estos pacientes no refirieron

nuevos trastornos del ritmo ni aumento en los episodios de taquicardia ventricular. De todas formas, este aspecto de la enfermedad de Chagas-Mazza constituye un desafío vigente para estas posibilidades de terapia con células de la médula ósea.

Los pacientes incorporados a esta experiencia contaban con función ventricular y capacidad funcional disminuidas. En relación a los resultados observados, hallamos una franca mejoría de la clase funcional a un seguimiento apreciable de 22.8 ± 13.3 meses, de 2.6 ± 0.5 a 1 ± 0 ($p < 0.005$). Este efecto se corroboró con un aumento de la fracción de eyección, la cual se incrementó de 26.4 ± 5.7 % en el preimplante a 35.6 ± 5.3 % ($p < 0.05$). Los diámetros ventriculares, en cambio, mostraron índices de mejoría discretos, pero llamativamente no observaron incrementos en la dilatación, lo cual mejoraría una variable independiente de mortalidad. A pesar de hallarse en fases de capacidad funcional comprometida, estos pacientes mostraron una persistencia de su recuperación luego del tratamiento.

Es de destacar que el implante en enfermedades del corazón no ateroscleróticas adolece de la comprobación fundamental que dan los radioisótopos. A pesar de habérselos utilizados tanto en el preoperatorio como en el seguimiento, son de difícil interpretación, ya que no tienen áreas geográficas extensas y constituidas de destrucción muscular. Esto obliga a evaluaciones funcionales de la capacidad cardíaca las cuales pueden ser aleatorias y por lo tanto, menos fidedignas. Lo trascendente quizás sea lograr la comprobación de cambios en la viabilidad de los segmentos comprometidos. Posiblemente deban utilizarse escalas de score adecuadas a cambios mínimos, en lugar de las actuales que establecen la viabilidad de segmentos demasiados amplios para las variaciones que puedan introducir las células progenitoras.

Otro interrogante es conocer si las células madre o tronco pueden transdiferenciarse o actúan por fusión celular. Sin embargo, aunque no llegue a demostrarse una transdiferenciación, esta situación no excluye su beneficio, el cual ha sido observado clínicamente. Por otro lado, en relación a la fusión celular, la misma puede ser un mecanismo de reparación celular como existe en el músculo es-

quelético. El sitio de litigio es conocer si las células madre o tronco pueden transdiferenciarse o actúan por fusión celular. Sin embargo, el hecho de que no llegue a demostrarse una transdiferenciación no excluye su beneficio, el cual ha sido observado clínicamente. Por otro lado, en relación a la fusión celular, el mismo puede ser un mecanismo de reparación celular como existe en el músculo esquelético. Los trabajos en este aspecto y por lo menos in vitro han demostrado que es factible inducir fenómenos de transdiferenciación. No sabemos si in vivo esto ocurre realmente.

Hay evidentes pruebas en contra del mecanismo de fusión celular. Después de la oclusión coronaria en ratones, todas las células del miocardio lesionado mueren en menos de cinco horas, no habiendo por tal motivo células posibles para la fusión. Por otro lado, los cardiomiocitos adultos tienen un volumen de $25.000 \mu\text{m}^3$. Si hubiese un mecanismo de fusión, los nuevos cardiomiocitos deberían tener un volumen superior a $25.000 \mu\text{m}^3$ o por lo menos igual. Sin embargo, el volumen de los nuevos cardiomiocitos oscila entre $200-2500 \mu\text{m}^3$. Incluso en el ratón, la reconstitución del miocardio se caracteriza por la generación de quince millones de cardiomiocitos nuevos. Este número es cinco veces superior al número total de cardiomiocitos en el ventrículo izquierdo del ratón (3×10^6), y once veces más que el número de miocitos después de producido el infarto (1.4×10^6). También como hecho fundamental, el 92% de los miocitos residentes son binucleados, mientras que el 6% son mononucleados. Paradójicamente el 90% de los nuevos miocitos son mononucleados y menos del 10% son binucleados. La fusión celular implicaría la generación de miocitos con dos núcleos. Este no es el caso, por lo tanto se debe considerar que la fusión celular no está implicada en este proceso de cardiomioplastia celular. La fusión celular implicaría la constitución de una célula híbrida, la cual sería genéticamente inestable y con un reducido potencial de regeneración.

Un punto de confusión está dado en la creencia que las células madre de la médula ósea son únicamente hematopoyéticas. En este aspecto, las células AC133 o CD34 también son células madre hematopoyéticas pero no exclusivas, ya que es factible encontrar en

ellas a las endoteliales y también a las mesenquimales.

En relación a la situación clínica, creemos que la experiencia acumulada en este último lustro ha demostrado algunos aspectos que avizoran una imagen a la espera de ser develada. Debemos contentarnos con lo parcial y lo previsional, a pesar de la tendencia que tiene el hombre en su reclamo de unidad y coherencia, en la visualización de un mundo que presenta como rasgo fundamental la diversidad.

Si puede demostrarse la efectividad de la regeneración miocárdica, mediante la miogénesis y la angiogénesis -como prometen las recientes experiencias- seguramente las indicaciones del cardioimplante celular se ampliarán y estos podrán ser usados en etapas más precoces de las cardiopatías. Sin duda, el tiempo y el esfuerzo de investigación básica y clínica determinarán si existe posibilidad de ubicar a la terapia celular dentro del arsenal terapéutico y preventivo en patologías que llevan a la IC, entre ellas la enfermedad de Chagas-Mazza(18). Mientras tanto, adherimos al *Consensus Task Force-Stem Cells* cuando expresa "Sería una tragedia para el tratamiento de pacientes con miocardiopatía... y para los costos de salud, si la eficacia de este tratamiento no fuese completamente explorada"(19).

La cardiomiopatía dilatada no-isquémica es otro desafío que enfrenta esta técnica. No hay, en este aspecto, una experiencia tan manifiesta como en la patología necrótica-isquémica. Además, la evaluación es más engorrosa, al disminuir la eficacia de los estudios de viabilidad miocárdica en estas patologías. Deben ser monitoreadas con pruebas de función ventricular y capacidad funcional, convirtiendo a los resultados en propensos al riesgo de la aleatoriedad y complicando la interpretación del potencial terapéutico utilizado(20).

CONCLUSIONES

Hay pocas comunicaciones sobre el uso de células madre en enfermedad de Chagas-Mazza. Este trabajo representa el segundo en fase clínica sobre este mal endémico de América publicado en la literatura internacional.

Nuestros pacientes toleraron bien el proce-

dimiento, resultando éste seguro y factible. Hallamos una franca y sostenida mejoría de la clase funcional en el seguimiento alejado. Esto se asoció a un aumento de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo con discreta mejoría de los diámetros ventriculares. Obviamente, el pequeño número de casos hace que sólo podamos hablar de tendencia en los resultados.

Este estudio, como el presentado anteriormente por la cardiología de Brasil, abre un panorama de estudio, simplemente de trabajo. No hay decisiones definitivas. Sabemos que es factible y seguro. Su eficiencia deberá ser demostrada con estrategias que incluyen el compromiso no sólo de médicos, sino también aquellos derivados de aspectos multidisciplinarios y económicos. Tratándose de una enfermedad profundamente social, se deberá agregar el apoyo de las administraciones sanitarias a través de protocolos protegidos económicamente. Estos dos estudios presentados a la bibliografía médica no han fracasado, sino iniciado un camino que deberá explorarse en virtud de que sólo en Argentina hay unos tres millones de chagásicos, de los cuales un tercio padece de cardiopatía. La corroboración de estos hallazgos con controlados estudios clínicos debe indicarnos la posibilidad de mejorar la calidad de vida y la supervivencia en estos pacientes. El bajo costo que implica esta estrategia en nuestra experiencia, el no contar con riesgo de episodios de rechazo inmunológico, el hecho de ser una terapéutica menos agresiva y tener la factibilidad de poder utilizarse en forma masiva, quizás pueda servir a paliar esta "enfermedad de los pobres". El compromiso social del médico no debe hallarse exento de estas implicancias en el ejercicio de su arte.

Conflicto de intereses: no existen.

BIBLIOGRAFÍA

1. Trainini JC. El concepto de estructura "culpable" en la insuficiencia cardiaca. *Rev Argent Cardiol* 69:128-35, 2001
2. Menasché P, Hagège A, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D y col. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 357:279-80, 2001
3. Lago N, Trainini JC, Genovese JC, Barisani JL, Mouras J, Guevara E y col.. Tratamiento de la disfunción ventricular posinfarto mediante el cardioimplante de mioblastos autólogos. *Rev Argent Cardiol* 72:124-30, 2004
4. Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, Finato N, Beltrami CA, Nadal-Ginard B y col. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med* 346, 5-15, 2002
5. Nadal-Ginard B. Inducción de nuevos cardiomiocitos en el corazón adulto: futuro de la regeneración miocárdica como alternativa al trasplante. *Rev Esp Cardiol* 54, 543-50, 2001
6. Rajnoch C, Chachques JC, Berrebi A, Bruneval P, Benoit MO, Carpentier A. Cellular therapy reverses myocardial dysfunction. *J Thorac Cardiovasc Surg* 121, 871-8, 2001
7. Chachques JC, Shafy A, Duarte F, Cattadori B, Goussef N, Shen L y col. From dynamic to cellular cardiomyoplasty. *J Card Surg* 17, 194-200, 2002
8. Chachques JC, Herreros J, Trainini JC, Prosper F, Lajos P, Salanson-Lajos C y col. Clinical Cellular Cardiomyoplasty. En *Cardiac Bioassist 2002*, Ed. Shaker Verlag, 2003, chapter 3, p 49-56
9. Chachques JC, Herreros J, Trainini JC (eds). *Implante clínico de células madre*. Trainini JC, Chachques JC, Herreros J, Lago N, Christen AI. En «Regeneración Cardíaca». Magister-Eos Ed, Buenos Aires, 2005, p 109-26
10. Chachques JC, Acar C, Herreros J, Trainini J, Prosper F, D'Attellis N y col. Cellular cardiomyoplasty: clinical application. *Am Thorac Surg* 77,1121-30, 2004
11. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-González XR y col. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41-9, 2002
12. Trainini J, Lago N, de Paz J, Cichero D, Giordano R, Mouras J, Barisani JL. Transplantation of skeletal myoblasts for repair of myocardial necrosis. *J Heart Lung Transplant* 23: 503-5, 2004
13. Trainini JC, Lago N, Masoli O, Mouras J, Guevara E, Barisani JL y col. Implante Cardíaco de Mioblastos. Informe a tres años de seguimiento. *Rev Argent Cardiol* 74:304-7, 2006
14. Trainini JC, Lago N, Klein G, Mouras J, Masoli O, Barisani JL y col. Cardiomioplastia celular con médula ósea autóloga en pacientes con miocardiopatía isquémica. *Rev Argen Cardiol* 72:418-25, 2004
15. Standardized myocardial segmentation and nomenclature for tomographic imaging of the heart: a statement for healthcare professionals from the Cardiac Imaging Committee of the Council on Clinical Cardiology of the American Heart Association. *Circulation* 105, 539-42, 2002

16. Soares MB, Lima RS, Rocha LL, Takya CM, Pontes de Carvalho AC, Ribeiro dos Santos R. Transplantes bone marrow cells repair heart tissue and reduce myocarditis in chronic chagasic mice. *Am J Pathol* 164, 441-7, 2004

17. Vilas Boas F, Feitosa GS, Soares MBP, Pintho Filho JA, Mota A, Goncalvez Almeida AJ y col. Early results of bone marrow cell transplantation tp the myocardium of patients with heart failure due to Chagas disease. *Arq Bras Cardiol* 87, 159-66, 2006

18. Trainini JC, Lago N, Masoli O, Bordone J, Mouras J, Christen A y col. Bone marrow stem cells implant in myocardium segments. *Société Française de Chirurgie Thoracique et Cardio-Vasculaire, Journees d'Automne*. Paris, 2006, p 44

19. Consensus Task Force-Stem Cells. *Eur Heart J* 27,1338-40, 2006

20. Trainini JC, Barisani JL, Lago N, Bordone J, Mouras J, Ruiz A y col. Resultados alejados del implante miocárdico de células madre en la miocardiopatía chagásica. *Rev Argent Cardiol* 75,257-63; 2007