

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DEL PODER ANGIOGÉNICO DE CÉLULAS
MONONUCLEARES DE MÉDULA ÓSEA AUTÓLOGA EN UN MODELO OVINO
DE INFARTO DE MIOCARDIO**

Por

Verónica SOTELO

TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de
Doctor en ciencias Veterinarias
Orientación: Medicina Veterinaria

MODALIDAD: Ensayo experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2015**

PÁGINA DE APROBACIÓN:

Tesis aprobada por:

Presidente de mesa

Dr. Carlos Rodríguez

Segundo miembro (Tutor)

Dr. Alejandro Benech

Tercer miembro

Dr. Kevin Yaneselli

Fecha:

_____25/6/2015_____

Autor

Br. Verónica Sotelo Castro

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor Alejandro por todo el apoyo brindado a mi formación, no solo en la tesis sino durante la carrera.

A mis compañeros de investigación en el área cirugía el Dr. Carlos Rodríguez, Dr. Sebastián Ado, Dr. Luis Cal, Dr. Victor Dayan, Br. Valentina Delfino, Br. Natalia Delgado; por el aprendizaje y los momentos compartidos.

A mi familia y amigos quienes estuvieron a mi lado en el transcurso de la carrera y me apoyaron siempre.

A mi amor, por su compañía y respaldo.

Tabla de contenido	Página
PÁGINA DE APROBACION	2
AGRADECIMIENTOS	3
TABLA DE CONTENIDOS	4
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	6
1. RESUMEN	7
2. SUMMARY	8
3. INTRODUCCIÓN	9
3.1 Antecedentes.....	9
3.2 Terapia celular en patología cardiovascular	9
3.3 Las células troncales (células madre o stem cell).....	9
3.3.1 Células madre embrionarias.....	10
3.3.2 Células madre adultas	11
3.4 Clasificación según su plasticidad	12
3.5 Mecanismo de acción de las células madre adultas.....	13
3.6 Plasticidad de las células madre adultas	14
3.6.1 Heterogeneidad de las células madre somáticas	14
3.6.2 Fusión de células trasplantadas con las células propias del tejido.....	15
3.6.3 Proceso de desdiferenciación y rediferenciación.....	15
3.6.4 Capacidad multi o pluripotencial de las células madre adultas	15
3.6 Medicina regenerativa	16
4. HIPÓTESIS	17
5. OBJETIVOS	17
5.1 Objetivos generales.....	17
5.2 Objetivos específicos	17
6. MATERIALES Y MÉTODOS	17
6.1 Estudio histopatológico y conteo de densidad capilar	18
6.2 Procesamiento de las muestras	19
6.3 Análisis histológico	21
6.4 Análisis estadístico	22
7. RESULTADOS	23

7.1 Macroscópico.....	23
7.2 Microscópico, conteo de capilares.....	24
8. DISCUSIÓN.....	24
8.1 Poder angiogénico de la terapia celular en el IAM.....	24
8.2 Modelo animal.....	25
8.3 Tipo celular utilizado.....	26
8.4 Vías y momento de administración	26
9. CONCLUSIONES.....	27
10. BIBLIOGRAFÍA.....	28

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

- Figura 1. Propiedades de las células madre.....10
- Figura 2. Generación de células madres embrionarias y somáticas.....11
- Figura 3. Plasticidad potencial de algunas células madre adultas.12
- Figura 4. Mecanismo propuesto para explicar la migración de las células madre a tejidos lesionados.13
- Figura 5. Mecanismos para explicar la plasticidad de las células madre adultas.....14
- Figura 6. Fotografía de corte histológico de miocardio sano.....21
- Figura 7. A corte histológico de la zona de mayor isquemia de miocardio, de una oveja tratada con la CMN. B. corte histológico de la zona de mayor isquemia, de una oveja control.....22
- Figura 8. Corazón con lesiones macroscópicas y muestras a las que se le realizó la prueba de cloruro de cloruro de Tetrazolio.....23
- Tabla I: Resultado del conteo de capilares en las zonas I, II, III y N de los dos grupos experimentales.....24

RESUMEN

La enfermedad cardiovascular es la primera causa de muerte del ser humano a nivel mundial, siendo la cardiopatía isquémica la primera causa de Insuficiencia Cardíaca. La revascularización quirúrgica es el tratamiento estándar, sin embargo es imposible de realizar en determinados pacientes. Por este motivo existe una alta demanda de métodos terapéuticos alternativos y/o complementarios que promuevan la neovascularización. En la última década el trasplante de células como estrategia terapéutica para la regeneración del miocardio lesionado o con fines de neovascularización /angiogénicos ha sido un área de intensa investigación. En el presente trabajo se evaluó histológicamente el poder angiogénico de células mononucleares (CMN) de médula ósea autóloga en un modelo ovino de infarto de miocardio. Específicamente se determinó, mediante cortes histológicos, la densidad capilar en la zona de infarto, luego de dos meses de la inyección directa de células mononucleares autólogas provenientes de médula ósea. Se utilizaron 12 ovejas Corriedale adultas y vacías a las que se les indujo un infarto agudo y controlado de miocardio de pared anterior de ventrículo izquierdo (VI), mediante ligadura de la 2^{da} rama diagonal de la arteria descendente anterior durante 90 min. Antes de soltar la ligadura, a cada oveja se le realizó uno de los dos tratamientos siguientes: Grupo MO tratadas con células mononucleares (CMN) provenientes de médula ósea, luego de los 90 min de isquemia, a una concentración de 2.5×10^6 de CMN en 1,2 ml para la inyección intramiocárdica y Grupo SF (control), tratado con inyección intramiocárdica de 1,2 ml de suero fisiológico en el área de isquemia, luego de los 90 min. Las muestras de médula ósea para obtener las CMN que se utilizaron en el grupo 1 se obtuvieron por punción de la cresta ilíaca, con el animal anestesiado y bajo condiciones de esterilidad, antes de comenzar con la cirugía de infarto de miocardio controlado.

A los 2 meses de la cirugía se sacrificaron los animales, obteniendo el corazón para la realización de cortes histológicos de 3 zonas, desde el centro de la lesión (zona I), hasta el miocardio sano (zona III). El efecto del tratamiento realizado en los grupos sobre el conteo de capilares, se analizó mediante el test de T para grupos independientes. Se tomó como significativo un valor de $p < 0,05$. Macroscópicamente se observó lesión del miocardio de las muestras obtenidas; presentándose en pared ventricular izquierda y en ocasiones ocupando también el septum. Los resultados microscópicos muestran una diferencia significativa en la zona 1 ($p = 0,03$), entre el Grupo de tratamiento con MO ($225,8 \pm 45,9$ cap. / $150 \mu\text{m}^2$) con respecto al Grupo SF ($130,8 \pm 79,7$ cap. / $150 \mu\text{m}^2$); la Z1 es la zona de mayor isquemia. La zona 2 muestra una tendencia ($p = 0,07$) del Grupo MO ($396,3 \pm 189,3$ cap. / $150 \mu\text{m}^2$), con respecto al Grupo SF ($210,8 \pm 126,8$ cap. / $150 \mu\text{m}^2$). Por último no se observó diferencias entre los grupos de tratamiento para la zona normal donde el Grupo MO presentó $505 \pm 81,6$ cap. / $150 \mu\text{m}^2$ y el Grupo SF $496 \pm 123,2$ cap. / $150 \mu\text{m}^2$), ni en la zona 3, donde en el Grupo MO se contaron $497,5 \pm 82,5$ cap. / $150 \mu\text{m}^2$ y en el Grupo SF $401,3 \pm 127,5$ cap. / $150 \mu\text{m}^2$. Se concluye que la inyección intramiocárdica de células mononucleares de médula ósea autóloga directamente sobre la zona isquémica, luego de 90 min, induce la angiogénesis, lo que abre la puerta a nuevas investigaciones para el uso de la terapia celular con CMN de MO como alternativa y/o complementaria a la RVQM.

SUMMARY

Cardiovascular disease is the first cause of human death globally, ischemic heart disease is the first cause of Heart Failure. Bypass surgery is the standard treatment, but it is impossible in certain patients. For this reason there is a high demand for alternative treatment methods and/or complementary to promote neovascularization. In the last decade cell transplantation as a therapeutic strategy for damaged myocardium regeneration or for neovascularization/angiogenesis has been an area of intense research. In this research we evaluated histologically angiogenic potential of mononuclear cells (MNC) autologous bone marrow in an ovine model of myocardial infarction. It was determined specifically by histological sections, the capillary density in the infarct zone, after two months of direct injection of autologous mononuclear cells from bone marrow. Twelve Corriedale adult non pregnant sheep were used. We induced an acute and controlled myocardial infarction in the anterior wall of the left ventricle (LV), by ligation of the 2nd diagonal branch of the left anterior descending artery for 90 min. Before releasing the ligation, each sheep received one of the following two treatments: Group MO treated with Bone marrow mononuclear cells after 90 min of ischemia, at a concentration of 2.5×10^6 CMN in 1.2 ml for intramyocardial injection; Group SF (control), treated with 1.2 ml intramyocardial injection of SF in the ischemic area after 90 min. Samples of bone marrow for MNCs used in group 1, were obtained by puncture of the iliac crest, with the anesthetized animal under sterile conditions before starting controlled myocardial infarction surgery. Within 2 months after surgery, the animals were sacrificed, getting the heart to perform histological sections from 3 areas, starting from the center of the injury (zone I), to the healthy myocardium (zone III). The effect of treatment on capillaries count was analyzed by T test for independent groups. It was taken as significant a value of $p < 0.05$. Myocardial injury was observed macroscopically in the samples obtained; appearing in left ventricular wall and sometimes occupying the septum. Microscopic findings in capillaries count, show a significant difference in zone 1 ($p = 0.03$) between the Group MO ($225,8 \pm 45,9$ cap. /150 μm^2) and the SF Group ($130,8 \pm 79,7$ cap. /150 μm^2); Z1 is the area with greatest ischemia. The zone 2 of Group MO shows a trend ($p = 0.07$) with respect to the SF Group ($396,3 \pm 189,3$ cap. /150 μm^2 and $210,8 \pm 126,8$ cap. /150 μm^2 respectively). Finally there were no differences between treatment groups for the normal area where the MO Group showed $505 \pm 81,6$ cap. /150 μm^2 and the SF Group showed $496 \pm 123,2$ cap. /150 μm^2 . In Zone 3, the MO group counted $497,5 \pm 82,5$ cap. /150 μm^2 and the SF Group counted $401,3 \pm 127,5$ cap. /150 μm^2 . We conclude that the intramyocardial injection of mononuclear cells from autologous bone marrow directly on the ischemic area after 90 min, induces angiogenesis, which opens the door to new research for the use of cell therapy as an alternative and / or complementary to RVQM.

INTRODUCCIÓN

Antecedentes

La enfermedad cardiovascular es la primera causa de muerte del ser humano a nivel mundial, siendo la cardiopatía isquémica la primera causa de Insuficiencia Cardíaca (IC). En nuestro país esta enfermedad produce la muerte de más de 3800 uruguayos al año y se realizan más de 1400 revascularizaciones miocárdicas quirúrgicas (RVM) en personas mayores de 40 años (FNR, 2001; MSP, 2005)

La revascularización quirúrgica es el tratamiento estándar, sin embargo es imposible de realizar en determinados pacientes. Por este motivo existe una alta demanda de métodos terapéuticos alternativos y/o complementarios que promuevan la neovascularización.

En la última década el trasplante de células como estrategia terapéutica para la regeneración del miocardio lesionado o con fines de neovascularización /angiogénicos ha sido un área de intensa investigación (Joggerst and Hatzopoulos, 2009).

Terapia celular en patología cardiovascular

En la estrategia “miocardiogénica” se han evaluado distintas poblaciones celulares, tanto de células diferenciadas como troncales/progenitoras con el objetivo de restablecer la función cardíaca a través de la regeneración de miocardio.

El trasplante de células en modelos experimentales con animales menores (rata y ratón), ha mostrado mejoría de la función cardíaca con la mayoría de los tipos celulares ensayados, incluyendo: células musculares lisas, mioblastos esqueléticos, cardiomiocitos fetales, células troncales hematopoyéticas, células troncales mesenquimales, células progenitoras endoteliales y células troncales embrionarias, entre otras (Haider and Ashraf, 2005, Hristov and Weber, 2006).

Si bien la estrategia miocardiogénica mantiene un interés vigente, varias investigaciones se han focalizado en la búsqueda de un efecto de neovascularización o angiogénico (Angoulvant y col, 2004).

Las células troncales (células madres progenitoras o “stem cells”).

Desde el punto de vista de su capacidad reproductiva y funcional, se han definido como aquellas que pueden dividirse simultáneamente para mantener por un lado su auto-renovación, con producción de más células madre semejantes a ella, y por otro lado, generar células hijas comprometidas con diferentes linajes celulares que se diferencian en diversos tipos de células especializadas, no solo morfológicamente, sino también funcionalmente (figura 1). Además, se le han añadido 2 propiedades funcionales: las capacidades de implantación persistente tanto en tejidos dañados como en sanos (Körbling y col, 2003).

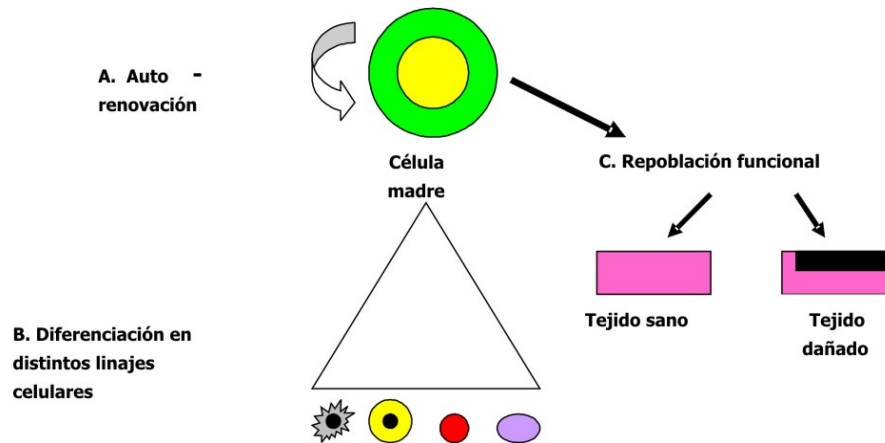


Figura 1. Propiedades de las células madre. (Fuente: Hernández y Dorticós, Revista Cubana Hematología 2004)

Las células madres se clasifican según su evolución en células madres embrionarios y células madre adultas o somáticas.

Las células madre embrionarias

Cumplen los tres criterios y son capaces de diferenciarse a cardiomiocitos y regenerar el miocardio (Canapp, 2012), pero su potencial inmunogénico, la posibilidad de generar teratomas *in vivo* (tumor benigno que contiene células derivadas de las tres capas germinales) y su potencial arritmogénico, (Evans y Kaufman, 1981; Aflatoonian y Moore, 2006) hacen que tanto a nivel experimental como clínico, sigan teniendo aún limitaciones ético-legales importantes (Ford, 2006). Las células madre embrionarias derivan del embrión de los mamíferos en su etapa de blastocisto y posee la capacidad de generar cualquier célula diferenciada en el organismo.

Después de la penetración del espermatozoide, el óvulo fecundado adquiere la condición de cigoto, en el que durante su recorrido por la trompa de Falopio, se van produciendo sucesivamente distintos períodos de división celular que aumentan rápidamente el número de sus células, las cuales reciben el nombre de blastómeros. Aproximadamente a los 3 días, el embrión tiene el aspecto de una esfera compacta que se denomina mórula y que contiene de 12 a 16 blastómeros. Alrededor de los 4 días llega a la cavidad uterina, y sobre los 5 días, comienza a introducirse líquido en su interior para formar una cavidad: el blastocele. En esta etapa, el cigoto se llama blastocisto y posee en uno de sus polos una agrupación celular que recibe el nombre de masa celular interna o embrioblasto que forma una prominencia dentro del blastocele. Las células que la integran dan origen a todos los tipos celulares, sistemas, tejidos y órganos del individuo en formación. Además, tiene una capa celular aplanada que recubre la cavidad del blastocisto y la parte exógena del embrioblasto, la cual se denomina masa celular externa o trofoblasto, de donde deriva la placenta. (Figura 2)

Hacia el final de la primera semana del desarrollo, el blastocisto humano ha comenzado su anidación en la mucosa uterina mediante la introducción en esta de las células trofoblásticas que recubren el polo del embrioblasto. (Rossant J.1995.)

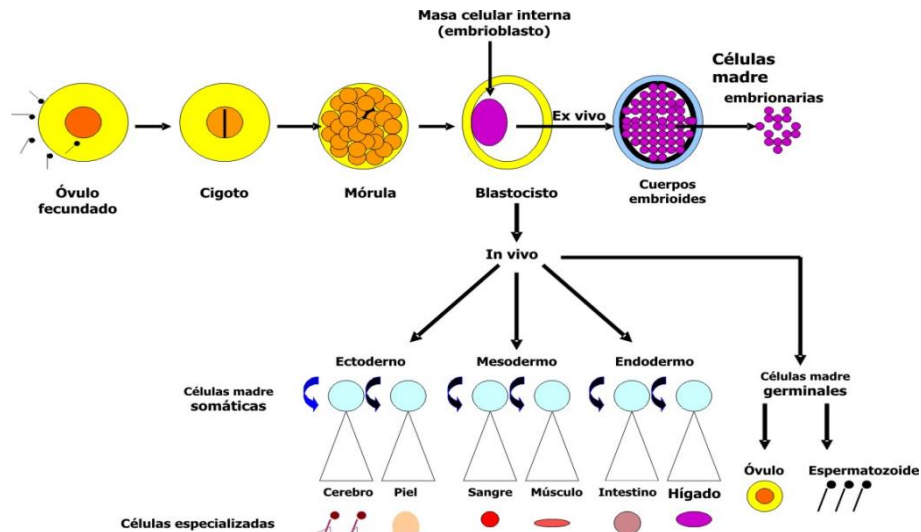


Figura 2. Generación de células madre embrionarias y somáticas. (Fuente: Hernández y Dorticós, Revista Cubana Hematología 2004).

Célula madre somática o adulta

Clásicamente se ha definido como una célula especializada dentro de la organización de las células de un tejido específico de un organismo ya formado, que está restringida en su capacidad de diferenciación y es capaz únicamente de generar células del tejido que representa, a las que debe recambiar de forma natural. Se ha señalado que en su evolución el organismo sitúa en los tejidos células madre somáticas como parte de los mecanismos que emplea para su renovación en condiciones fisiológicas o ante un daño hístico (Körbling and Estrov, 2003).

Sin embargo, en los últimos años, se han realizado varios estudios que han aportado resultados sorprendentes, pues sugieren que la potencialidad de algunos tipos de células madre adultas es mayor de lo esperado, ya que han mostrado en determinadas condiciones capacidad para diferenciarse en células de diferentes linajes (Verfaillie, y col 2002). El caso más destacado es el de las células madre hematopoyéticas capaces de diferenciarse en diversos tejidos, entre ellos endotelio, músculo cardíaco, músculo estriado, hepatocitos, neuronas, piel e intestino (Daley y col 2003), (figura 3). Aunque se ha planteado que los criterios establecidos para definir a una célula madre adulta son difíciles de comprobar experimentalmente (Hernández y Dorticós, 2004), se ha señalado que la mayor parte de los criterios que cumplen las células madre embrionarias los satisfacen también la célula madre hematopoyética, pues ésta puede tener divisiones auto-renovadoras, puede dar lugar a todas las células sanguíneas, reconstruir la médula ósea cuando se trasplanta en receptores irradiados letalmente o mediante quimioterapia, y además se ha observado su implantación en tejidos sanos (Daley y col 2003).

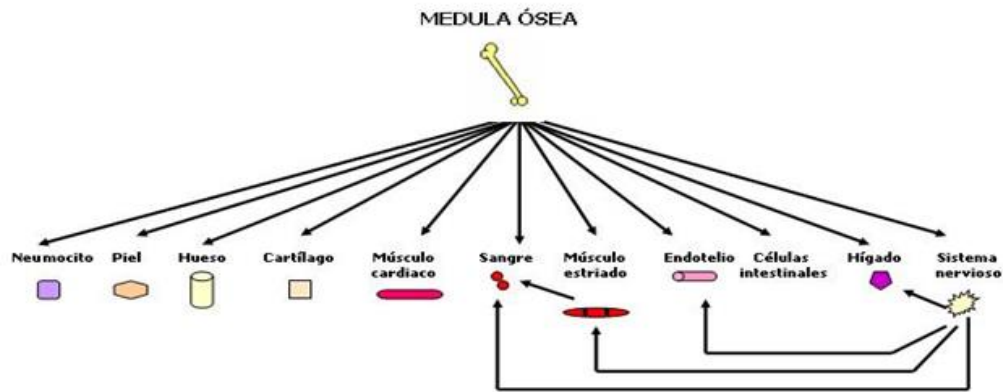


Figura 3. Plasticidad potencial de algunas células madre adultas (las flechas indican la posible capacidad de transformación de la célula madre). (Fuente: Hernández y Dorticós, Revista Cubana Hematología 2004).

Diversas informaciones han señalado la existencia de células madre adultas en varios sitios del organismo que incluyen médula ósea, sangre periférica, sangre del cordón umbilical, cerebro, médula espinal, grasa, pulpa dentaria, vasos sanguíneos, músculo esquelético, piel, tejido conjuntivo, córnea, retina, hígado, conductos pancreáticos, folículo piloso, tejido gastrointestinal y pulmón (Verfaillie y col 2002).

Como ventajas de las células madre adultas se destaca, que se podrían obtener trasplantes autólogos lo que estaría solucionando el problema de los rechazos; se ha observado que no producen tumores luego de ser implantadas, además de la ventaja relacionada con los temas éticos y legales que en este caso no están presentes ya que se extraen de tejidos adultos, sin recurrir al uso de embriones. Como desventaja se destaca que no se auto replican en forma indefinida in vitro. (Mukhopadhyay y col., 2011).

Clasificación según su plasticidad:

A las Células Madre (CM) se las clasifica según su capacidad para transformarse en distintos tipos celulares. Este rango de diferenciación se va perdiendo a medida que las células se van haciendo cada vez más especializadas.

A) *Totipotentes*: Son capaces de generar un individuo completo, ya que de estas estructuras derivan todas las células necesarias para formar el embrión y las estructuras para que sea viable (placenta) (Kelly, 2007).

B) *Pluripotentes*: CM capaces de transformarse en todos los tejidos del organismo. Se encuentran en la masa celular interna del blastocisto, que dará lugar a las tres capas germinales. Carecen de la habilidad para generar un individuo, ya que no se diferencian en las estructuras extraembrionarias (Hernández y Dorticós, 2004).

C) *Multipotentes*: Se diferencian en los distintos tipos de células provenientes de una misma capa embrionaria. Son células cuyo grado de especialización es mayor al de las anteriores (ISSCR, 2011).

D) *Unipotentes*: son las menos versátiles de todas, y por lo tanto las más diferenciadas. Se transforman en un único tipo de célula.

Todos estos hallazgos han ampliado los conocimientos sobre las células madre adultas, y particularmente los relacionados con el mayor potencial generativo de algunos de sus tipos que lo acercan al de las células embrionarias. Esto ha creado nuevas perspectivas para el tratamiento de diferentes enfermedades con células madre adultas, lo que inicialmente se pensaba solo podía hacerse con células madre embrionarias.

Mecanismo de acción de las CMA (célula madre adulta)

Actualmente se maneja el concepto de que la injuria o inflamación es un prerrequisito necesario para que las células circulantes participen exitosamente en la estructura y función de los tejidos especializados (Figura 4).

Se ha señalado que las lesiones hícticas pueden originar cambios en el microambiente de un órgano determinado y desempeñar una importante función en la atracción de las células madre circulantes. Una posibilidad sería la producción en la zona dañada de quimocinas específicas las cuales atraerían a las células madre dotadas de receptores que les permitan unirse con ellas (Hernández y Dorticós, 2004).

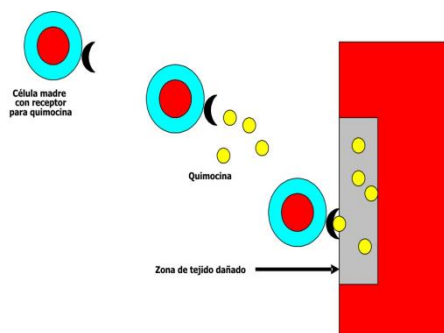


Figura 4. Mecanismo propuesto para explicar la migración de las células madre a tejidos lesionados. (Fuente: Hernández y Dorticós, Revista Cubana Hematología 2004).

La migración de estas células hacia el área de necrosis en la cardiopatía isquémica podría favorecer la disminución del área de isquemia mediante la generación de nuevos vasos y a su vez evitar la muerte de los cardiomiocitos por apoptosis secundaria a la isquemia.

La habilidad de las células madre adultas para en determinadas situaciones adquirir características de células específicas de otros tejidos, se ha atribuido a un proceso calificado como plasticidad celular

PLASTICIDAD DE LAS CÉLULAS MADRE ADULTAS

Se identifica a la plasticidad como la capacidad que adquieren estas células, bajo determinadas condiciones microambientales, de diferenciarse en células de tejidos distintos de aquel con el cual la célula madre se encuentra aparentemente comprometida. (Verfaillie, 2002; Körbling, 2003)

En la actualidad, para esclarecer este proceso, se plantean 4 hipótesis o modelos (Figura 5).

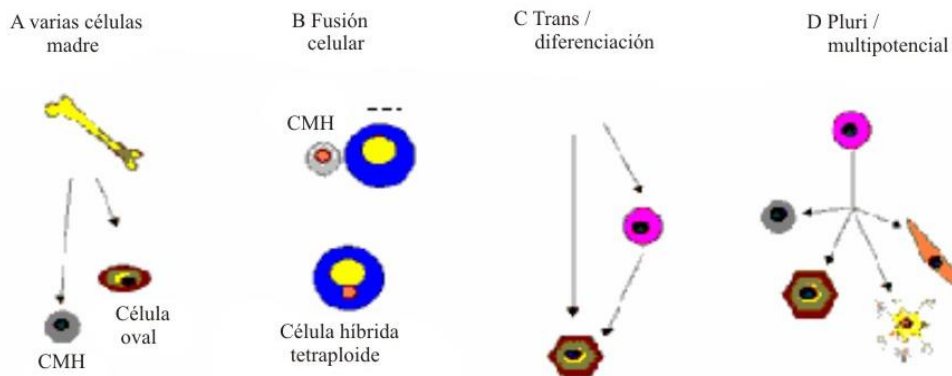


Fig. 5. Mecanismos para explicar la plasticidad de las células madre adultas. CMH: célula madre hematopoyética; CET: célula específica del tejido. A: heterogeneidad de células madre que se ha encontrado en la médula ósea. B: fusión celular con producción de una célula híbrida con características de ambas células fusionadas. C: procesos de transdiferenciación, desdiferenciación y rediferenciación que pueden dar lugar a que las células sean reprogramadas y se diferencien en otras de distinto linaje. D: persistencia en el organismo ya desarrollado de células madre somáticas con capacidad multi o pluripotencial. (Fuente: Verfaillie, 2002)

Los mecanismos son:

1. Heterogeneidad de las células madre presentes en una población celular.
2. Fusión de las células madre trasplantadas con las células específicas residentes en un órgano.
3. Consumación de un proceso de desdiferenciación y rediferenciación celular.
4. Persistencia de células madre adultas con capacidad multi o pluripotencial.

Heterogeneidad de las células madre somáticas presentes en una población celular

Se ha encontrado en la médula ósea una gran heterogeneidad de células madre con distintas características y potencialidades, llevando a plantear que la regeneración de tejidos no hematopoyéticos que se ha observado después del trasplante de células procedentes de la médula ósea, puede deberse a la acción específica de alguno de los tipos de células madre que actualmente se han identificado en ella (Hernández y Dorticós, 2004; Zeledón y col, 2005).

Fusión de las células trasplantadas con las células propias de un tejido

Existen varios trabajos que apoyan el criterio de que la aparente plasticidad y pluripotencialidad se deben en algunos casos a un proceso de fusión celular (Hernández y Dorticós, 2004). El contacto intercelular podría tener una acción importante en la fusión de una célula incorporada a un nuevo microambiente. Este mecanismo daría lugar a células híbridas con características de ambas células fusionadas, pero con la desventaja de poseer una menor capacidad proliferativa, pues generalmente debido a la fusión adquieren doble dotación cromosómica (Prosper, 2003). Se ha señalado que hasta donde se conoce en la actualidad, no existe ningún estudio que permita eliminar radicalmente la posibilidad de la fusión celular como un mecanismo que pueda intervenir en la versatilidad de las células madre somáticas, aunque es muy poco probable que pueda justificar todas las observaciones de pluripotencialidad celular realizadas hasta la fecha. Quizá la fusión pudiera explicar la transformación celular en determinados tejidos donde la frecuencia de los otros mecanismos sea extremadamente baja (Verfaillie, 2002).

Existencia de un proceso de desdiferenciación y rediferenciación celular

Se ha planteado que una célula madre programada para su diferenciación en células especializadas específicas puede transdiferenciarse en determinadas situaciones ambientales, es decir, cambiar su destino y dar lugar a células de otros tejidos diferentes. Desde hace mucho tiempo se conoce que la desdiferenciación y rediferenciación pueden ocurrir en ciertos animales, y como ejemplo se citan los anfibios, que son capaces de regenerar completamente alguna extremidad dañada. Se ha planteado la posibilidad de que las células madre adultas pudiesen ser reprogramadas cuando se extraen de su microambiente natural y se sitúan en otros diferentes, en los cuales reciben estímulos y señales que las inducen a la activación de un nuevo programa genético que las lleva a la diferenciación en células del nuevo tejido en que se han implantado (Verfaillie, 2002 y Körbling, 2003).

Persistencia de células madre adultas con capacidad multi o pluripotencial

Se ha sugerido la posibilidad de que en el organismo después de rebasado el período embrionario, persistan células madre con capacidad multi o pluripotencial, que en dependencia del medio en que se sitúan, pueden diferenciarse hacia células de diferentes linajes. (Hernández y Dorticós, 2004; Zeledón y col 2005).

Hasta el momento, ninguno de los modelos expuestos puede por sí solo explicar completamente el mecanismo de la plasticidad atribuida a las células madre. Es posible que en determinados casos, tejidos y situaciones ambientales, pueda ocurrir más de uno de estos procesos. Varios trabajos publicados en los últimos años se refieren al aislamiento y caracterización de diferentes tipos de células troncales/progenitoras haciendo posible su aplicación a protocolos preclínicos y clínicos de terapia celular en cardiopatía isquémica y en otras enfermedades, haciendo referencia a los efectos beneficiosos del trasplante autólogo de células de médula ósea en el infarto agudo de miocardio en el ser humano (Strauer y col, 2002; Assmus y col., 2002; Wollert y col, 2004; Yoon y col, 2004).

Las células madre obtenidas de la médula ósea (MO) son las que han demostrado mayor capacidad para diferenciarse a fibras musculares cardíacas o células endoteliales, contribuyendo a la angiogénesis o vasculogénesis (Prósper Cardoso y col, 2003).

A pesar de la creciente utilización de células troncales en procedimientos de regeneración tisular, los mecanismos básicos involucrados en estos procesos son muy pobremente comprendidos. Es así que los estudios experimentales en esta área son cada vez más importantes y son necesarios para una mejor evaluación de este procedimiento terapéutico (Joggerst and Hatzopoulos, 2009).

Medicina Regenerativa

Se define Medicina Regenerativa como una rama de la ciencia que está ligada a la investigación de las CM y a su capacidad para convertirse en células de diferentes tipos. Está dedicada al estudio y tratamiento del daño de los tejidos, ya sea por envejecimiento, enfermedad o trauma, basándose principalmente en reemplazar el tejido con células madre o administrando drogas que estimulen a las ya existentes en los tejidos a reparar (Kowaleski y Saunders, 2013).

La medicina regenerativa es una alternativa terapéutica para las patologías, fuera de lo que son los fármacos y la cirugía, pudiendo ser complementaria a los mismos.

Desde hace varios años se están llevando a cabo investigaciones y ensayos clínicos sobre su aplicación en distintas enfermedades entre las que se encuentran Alzheimer (Kelly, 2007), Parkinson (Brazzini y col, 2010), Huntington (Gearhart y col, 2009), trauma de médula espinal (Fujimoto y col., 2012), ACV, Esclerosis Lateral Amiotrófica (Kelly, 2007), Leucemia, afecciones óseas (Yaneselli, 2013), enfermedades autoinmunes (NIH, 2001) y enfermedades cardiovasculares (NIH, 2011).

La posibilidad de obtener tejido muscular y endotelial a partir de células madre, la elevada incidencia de enfermos con insuficiencia cardíaca, la eficacia limitada del tratamiento médico y la escasez de órganos para trasplante cardíaco han llevado a que una de las áreas en las que se ha aplicado la terapia celular con células madre haya sido el tratamiento de los pacientes con insuficiencia cardíaca, principalmente de origen isquémico (Prósper Cardoso y col, Octubre 2003).

El tipo celular más adecuado es objeto de intenso debate científico y ético, siendo las células troncales adultas las preferidas en investigación clínica (Siepe y col, 2005). Las investigaciones de los últimos años apuntan al implante de Células Madre Mesenquimales (MSC, por su sigla en inglés). Entre las más estudiadas se encuentra el tratamiento que infiltra estas células *aisladas y cultivadas* provenientes de la médula ósea o tejido adiposo, la inyección de *aspirados de médula ósea* directamente sin ser procesada en el laboratorio, y una tercera donde se implanta un concentrado de médula ósea al que se le llama *Células Mononucleares (CMN)* que contiene los distintos tipos de Células Madre Adultas que en ella residen (Kraus y

Kinker-Head, 2006; Hernández y Forrellat, 2013). Este último método es en el que basamos nuestro trabajo.

HIPÓTESIS

Las CMN inyectadas directamente intramiocardio en el modelo ovino de IAM producen mayor angiogenesis.

OBJETIVOS

Objetivo general

1. Evaluar histológicamente el poder angiogénico de células mononucleares (CMN) de médula ósea autóloga en un modelo ovino de infarto de miocardio.

Objetivos específicos

1. Determinar, mediante cortes histológicos, la densidad capilar en la zona de infarto, luego de dos meses de la inyección directa de células mononucleares autólogas provenientes de médula ósea.

MATERIALES Y METODOS

El protocolo experimental se realizó en el quirófano de la Unidad de Endoscopia del Hospital de la Facultad de Veterinaria. El mismo fue aprobado por la CHEA (CEUA) Facultad de Veterinaria. Se utilizaron 12 ovejas Corriedale adultas y vacías, que fueron mantenidas, hasta el momento del comienzo del protocolo, en el Campo Experimental N° 2 de la Facultad de Veterinaria, donde se realizó el manejo sanitario correspondiente (vacunas, desparasitaciones, despezñado y esquila).

A todas las ovejas se les realizó una cirugía en la que se indujo un infarto agudo y controlado de miocardio de pared anterior de ventrículo izquierdo (VI), mediante ligadura de la 2da rama diagonal de la arteria descendente anterior. Para este procedimiento se trasladaron desde el Campo Experimental hacia la Facultad de Veterinaria en Montevideo. Previo a la cirugía, los animales fueron divididos en dos grupos al azar:

a) Grupo MO: Luego de realizado el infarto agudo de miocardio (IAM), se le realizaron 5 punciones de CMN autólogas, de 0,24 ml cada una, cuatro de ellos en la periferia de la lesión y el quinto en el centro de la misma, correspondiendo a un volumen total de la suspensión de 1,2ml (número total de células 2.5×10^6 de CMN).

b) Grupo SF: Se realizó la inyección de suero fisiológico luego de realizado el IAM en 5 punciones de 0,24 ml cada una, cuatro de ellas en la periferia de la lesión y la quinta en el centro de la misma.

Las muestras de médula ósea para obtener las CMN que se utilizaron en el grupo MO se obtuvieron por punción de la cresta ilíaca, con el animal anestesiado y bajo

condiciones de esterilidad, antes de comenzar con la cirugía de infarto de miocardio controlado.

En las ovejas del grupo control SF, las muestras se descartaron luego de obtenidas, en el grupo MO las muestras fueron procesadas en condiciones estériles bajo flujo laminar. Una vez obtenidas la fracción de células mononucleares, se procedió a contar las células en cámara de Neubauer, ajustar concentración celular según necesidad y test de viabilidad celular con azul Trypan. Las células fueron resuspendidas en suero fisiológico a una concentración de 2.5×10^6 de CMN en 1,2 ml para la inyección intramiocárdica.

A los dos meses de realizada la cirugía y el tratamiento asignado en cada grupo, cada oveja se sacrificó en la sala de necropsia de la Facultad de Veterinaria. Para el sacrificio de los animales primero se realizó la insensibilización con un bolo de 1 g de tiopental IV y luego la exanguinación mediante sección de los grandes vasos del cuello. Una vez constatada la muerte se procedió a la necropsia en la cual se obtuvo el corazón.

Estudio histopatológico y conteo de densidad capilar

Se tomaron cuatro muestras de pared ventricular izquierda bajo la forma de láminas a distintas distancias desde el centro de la zona lesionada hasta llegar al miocardio sano (zona N), rotulándose con números sucesivos, siendo la nº 1 la más proximal a la arteria ocluida. Los fragmentos obtenidos de cada espécimen se fijaron en paraformaldehído al 4% por 48hrs y luego fueron procesados para su inclusión en parafina, en bloques de 5 μ m de espesor.

Se realizó la identificación de vasos mediante una técnica de lectinohistoquímica, utilizando lectina biotilada de *Bandeiraea simplicifolia* (BS-I) que se une específicamente a las células endoteliales marcándolas de un color oscuro (Pampee y col., 2002). El grado de vascularización de cada sector se determinó en 24 áreas de 150 x 150 μ m, promediado y expresado como número de capilares por mm².

Para la visualización macroscópica del área de infarto se realizó el test de tetrazolio, que permite determinar la viabilidad celular en los tejidos, demostrando que las muestras tomadas presentaban zonas necróticas pudiendo estar asociadas al infarto provocado. El cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio es un indicador redox que permite diferenciar tejidos metabólicamente activos de aquellos que no lo están, se utiliza principalmente para determinar la viabilidad de semillas, aunque también tiene su aplicación en tejidos animales, en la medición de áreas de infarto (Carrion y col, 2008). Esta prueba se basa en la reacción bioquímica de ciertas enzimas de las células vivas con la sal de tetrazolio, la cual consiste en la reducción del tetrazolio, formándose un compuesto rojo llamado formazan (Moreno, 1984). En tejidos necróticos el tetrazolio conserva su color blanco debido a que las enzimas que lo reducen se han degradado.

El test se realizó en la cátedra de fisiología de Facultad de Veterinaria de esta manera:

- se pesó 1g de cloruro de tetrazolio que es diluido en 100ml de buffer fosfato 0,1M pH 7,4
- las muestras son colocadas en placas de petri de manera que puedan ser identificadas zona normal (N), zona 1 (Z1), zona 2 (Z2), zona 3 (Z3); a cada placa de petri se colocan aproximadamente 25ml de la solución de cloruro de tetrazolio
- se lleva las placas a baño maría a 37°C durante 20 minutos
- se retiran las muestras y se observan las diferencias de coloración

PROCESO DE MUESTRAS PARA EVALUACIÓN HISTOLOGICA

Esta parte del protocolo se realizó en la cátedra de histología de la Facultad de Medicina bajo la supervisión del Dr. Gabriel Anesetti.

Se realizó el procesamiento de las muestras de infarto obtenidas en la necropsia y fijadas en PFA al 4%, para la obtención de los preparados histológicos. Transcurridas 48hs de la necropsia se colocaron las muestras en PBS durante 3hs. Luego de este lapso de tiempo las muestras se colocaron en alcohol 70% para conservarlas hasta su procesamiento.

Las actividades desarrolladas en Facultad de Medicina fueron, la inclusión de las muestras en bloques de parafina hasta la obtención de los preparados a utilizar en el microscopio.

El primer paso realizado fue la inclusión en bloques de parafina de cada una de las muestras (N, Z1, Z2 y Z3) de las necropsias, para su corte posterior con micrótopo por un técnico especializado. Las láminas obtenidas de cada una de las muestras se ajustaron a 5 µm de espesor.

Las actividades desarrolladas fueron las siguientes:

- Día 1: las muestras acondicionadas en alcohol 70% se colocan durante 3hs en alcohol 95% , luego se pasan a un recipiente conteniendo alcohol 100%, durante 1h 30min. Este proceso de deshidratación elimina el agua de los tejidos; lo que es necesario para la etapa siguiente de inclusión en parafina, ya que esta no es miscible en agua. Por último se dejan las muestras en cloroformo hasta el día siguiente. Se eligió el cloroformo por su propiedad de ser miscible tanto en alcohol 100% como en parafina.
- Día 2: inclusión de las muestras en parafina, que va a penetrar en los vasos, en los espacios intercelulares y también en el interior de las células, embebiendo el tejido y haciendo más fácil la obtención de cortes en el micrótopo. El primer paso que se realizó el día 2 consistió, una vez que se calentó la parafina a 60°C en estufa, en llevar las muestras de manera ordenada, rotuladas y por separado, a la estufa en un baño de parafina durante 1h 30min tiempo en el cual la parafina va a ocupar el lugar del cloroformo en los tejidos. Posteriormente se realiza un segundo baño de las muestras en una nueva parafina durante 1h, de esta manera se favorece una buena impregnación de la parafina en las muestras. Por último se coloca cada una de las muestras en una nueva parafina en un molde de forma rectangular

y se dejan solidificar a temperatura ambiente, se rotulan cada uno de los bloques obtenidos.

Una vez obtenidos los bloques de parafina, estos fueron procesados por los técnicos de la cátedra, de esta manera se obtuvieron los cortes de cada una de las muestras ya colocados en portaobjetos y listos para pasar a la etapa siguiente, donde se aplicó la técnica de lectinohistoquímica que nos permitió distinguir el endotelio de los distintos vasos que se encontraban en las muestras.

Los cortes de las muestras, sobre los portaobjetos, fueron llevados a estufa previamente calentada a 56°C durante 20 minutos.

Una vez que se observó que la parafina adherida a los cortes se derretía y escurría se retiraron los portaobjetos, para pasar a la siguiente etapa, la desparafinación de las muestras. Para dicho proceso se utilizó el solvente orgánico Xilol el cual se manipulo en campana de flujo de aire debido a su volatilidad y toxicidad, las muestras fueron procesadas en dos etapas con dicho solvente: una primera etapa de 15 minutos y una segunda etapa de 10 minutos.

Posteriormente se procedió a hidratar las muestras, para ello se colocan los portaobjetos con las muestras en recipientes con soluciones de alcohol decreciente, alcohol 100% durante 3 minutos, alcohol 95% durante 2 minutos y alcohol 70% durante 2 minutos, por último se colocan en agua destilada (H₂O_d) por 2 minutos.

Las muestras rehidratadas se procesaron durante 5 minutos a temperatura ambiente en solución de buffer fosfato (PBS) de pH 7,4. Y luego durante 20 minutos en PBS con el agregado de peróxido de hidrogeno (H₂O₂) al 11%, de esta manera se buscó inactivar la peroxidasa endógena presente en los tejidos.

Se realizaron tres lavados más de las muestras de duración 5 minutos cada uno, con PBS (pH 7,4).

El siguiente paso que se dio consistió en la incubación de las muestras con lectina unida a una proteína intermediaria, biotina, BS-1biotinilada. La biotina es reconocida por la avidina del complejo ABC (avidin-biotin-complex), ya que el complejo ABC contiene una peroxidasa será esta enzima la que catalice la reacción, una vez que se agregue el sustrato apropiado, diaminobencidina (DAB) más H₂O₂, lo cual nos permite observar al microscopio óptico los sitios de unión de la lectina.

En primer lugar se acondicionó un recipiente con tapa para realizar la incubación el cual se denominó cámara húmeda, en su base consta de un papel húmedo o un pequeño volumen de agua, debido a que su finalidad es evitar la evaporación de la solución con la cual se está realizando la incubación. Los preparados se secaron y colocaron de forma horizontal en la cámara.

Una vez que los preparados se colocaron en la cámara, se humedecieron con PBS utilizando un gotero, quitando el exceso de líquido. Antes de la incubación, cada preparado se cubrió con 60-100 µl de una solución de BS-1biotinilada en PBS al 1:150. El tiempo de incubación fue de 1 hora a temperatura ambiente y con la cámara tapada.

El complejo ABC se preparó en una dilución 1:200 en PBS, teniendo en cuenta que cada portaobjeto necesita aproximadamente 100µl. Al finalizar la incubación con BS-1 biotinilada se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos de duración por cada lavado. Se limpió la cámara húmeda y se volvió a ensamblar para una nueva incubación, esta vez con ABC, durante 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido este lapso de tiempo se procedió a una nueva serie de lavados con PBS de 5 minutos de duración.

El revelado se realizó con la solución de DAB más H₂O₂ durante 5 minutos en cada uno de los portaobjetos. Luego los preparados se colocan en un vaso de vidrio ranurado conteniendo agua corriente para descartar el excedente de solución reveladora, este paso se repite una segunda vez.

Por último se deshidrataron las muestras a través de una serie de incubaciones en alcohol de 3 minutos cada una, de manera creciente alcohol 70%, alcohol 95%, alcohol 100%. Ahora nuestras muestras ya estaban listas y concluimos el montaje colocando el cubreobjetos con una gota de pegamento DPX.

ANALISIS HISTOLOGICO

La observación de los preparados se realizó en la cátedra de histología de la Facultad de Medicina, para esto se utilizó el microscopio óptico Nikon DS-Fi1c, y la captura de imágenes se llevó a cabo con el software Nis-Elements 3.0 desarrollado por Nikon.

El conteo de vasos sanguíneos de cada zona se realizó a ciegas, para esto el operador conocía el n° de caravana del animal al cual correspondía la muestra, pero no el tratamiento al cual había sido asignado. De los preparados obtenidos de los animales sacrificados se tomaron 12 fotografías de cada una de las muestras procesadas (N, Z1, Z2 y Z3), 4 de la capa más externa (epicardio), 4 de la capa media (miocardio) y 4 de la capa más interna (endocardio).

Para poder realizar el conteo de los vasos sanguíneos de cada zona (capilares, arteriolas y vénulas), las imágenes fueron procesadas con el software ImageJ para el procesamiento de imágenes digitales de aplicación científica, desarrollado por el National Institutes of Health de los Estados Unidos. En cada fotografía se delimitó un área de 150µm x 150µm, con coordenadas en los eje de $x=100$, $y=70$. Los datos obtenidos de los conteos se registraron en hojas de cálculo de Microsoft Excel.

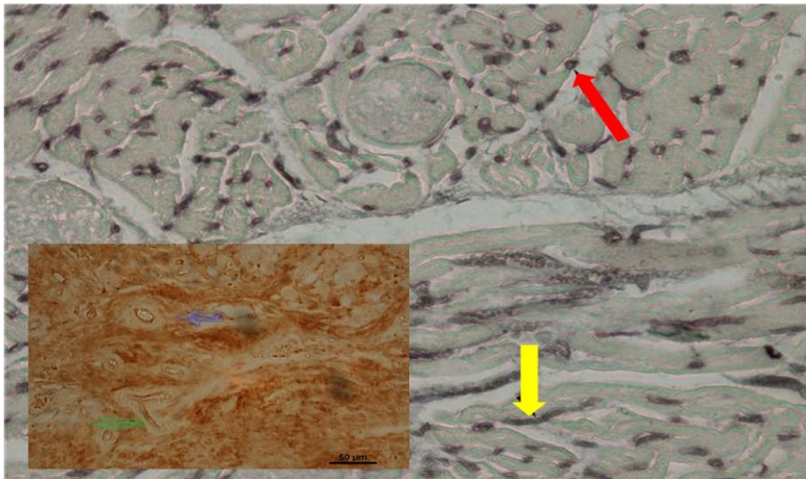


Figura 6. Fotografía de corte histológico de miocardio sano, observándose capilares en corte transversal (flecha roja) y en corte longitudinal (flecha amarilla), comparada con un corte histológico donde se observa una arteriola (flecha azul), y una vénula (flecha verde).

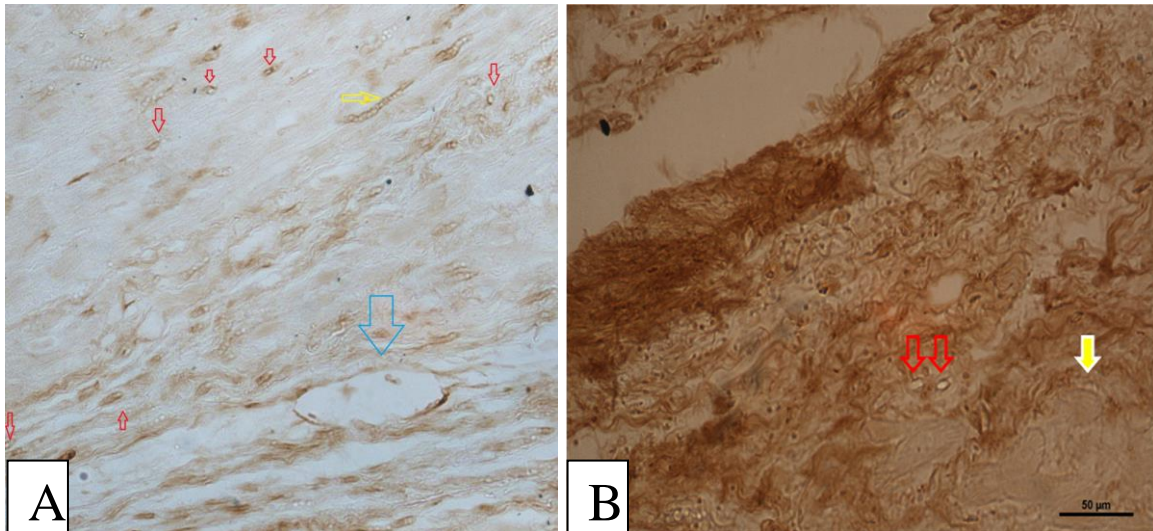


Figura 7, A corte histológico de la zona de mayor isquemia de miocardio, de una oveja tratada con la CMN; donde se observa capilares en corte transversal (flechas rojas) y una vénula (flecha celeste). B. corte histológico de la zona de mayor isquemia, de una oveja control; donde se observa mucha fibrosis, capilares en corte transversal (flechas rojas) y capilar en corte longitudinal (flecha amarilla).

ANALISIS ESTADISTICO

Los datos obtenidos en el conteo de los diferentes tipos de vasos sanguíneos presentes en las muestras fueron ordenados y tabulados en base de datos con el software STATISTICA 5.1 EDITION 98. El efecto del tratamiento realizado en los grupos sobre el conteo de capilares, se analizó mediante el test de T para grupos independientes. Se tomó como significativo un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Resultados Macroscópicos:

Al extraer los corazones, luego del sacrificio de los animales, se observó las lesiones macroscópicas sobre la pared libre del miocardio que produjo la ligadura de la 2ª rama diagonal de la arteria descendente anterior (Figura 6 A), que al corte transversal, en algunos animales se vio que ocupaba todo el espesor del miocardio (transmural) (Figura 6 B). Al teñirlas con cloruro de Tetrazolio se observó que la lesión del miocardio ocupaba la pared ventricular izquierda y en ocasiones también el septum. Las lesiones presentaron diferentes tamaños. El tamaño específico de cada lesión fue corroborado con la prueba del colorante vital, cloruro de tetrazolio.

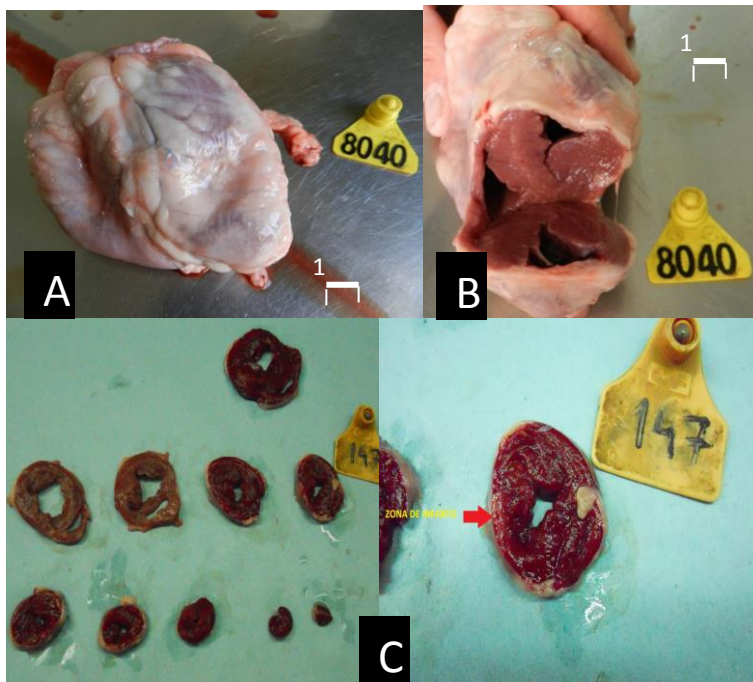


Figura 8, A. Corazón de una de las ovejas a las que se les realizó un infarto agudo de miocardio obtenido luego del sacrificio del animal. Se observa una zona de depresión, redondeada de 2, 5 cm de diámetro en la pared libre del VI. B. El mismo corazón con un corte transversal realizado a la mitad de la lesión, se observa una zona isquémica que ocupa toda la profundidad del miocardio. C. Vista general y detalla de muestras obtenidas del corazón de otro animal, teñidas con cloruro de Tetrazolio, donde se observa las zonas isquémicas más claras que el miocardio normal.

Resultados Microscópicos:

En la tabla I se observa el conteo de capilares en cada zona de miocardio evaluada en los dos grupos experimentales.

Tabla I: Resultado del conteo de capilares en las zonas I, II, III y N de los dos grupos experimentales,

CAPILARES	MO (nº cap./150 µm ²)	SF (nº cap./150 µm ²)	P
Total N	505 ± 81,6	496,5 ± 123,2	0,9
Total Z I	225,8 ± 45,9	130,8 ± 79,7	0,03*
Total Z II	396,3 ± 189,8	210,8 ± 126,8	0,07
Total Z III	497,5 ± 82,5	401,3 ± 127,5	0,2

* * $P < 0,05$.

Los resultados muestran una diferencia significativa en la zona 1 ($p = 0,03$), entre el grupo de tratamiento con MO (225,8±45,9 cap. /150 µm²) con respecto al grupo SF (130,8±79,7 cap. /150 µm²); la Z1 es la zona de mayor isquemia. La zona 2 muestra una tendencia ($p = 0,07$) del grupo tratamiento de MO (396,3±189,3 cap. /150 µm²) con respecto al grupo SF (210,8±126,8 cap. /150 µm²). Por último no se observó diferencias entre los grupos de tratamiento para la zona normal donde el grupo MO presentó 505±81,6 cap. /150 µm² y el grupo SF (496±123,2 cap. /150 µm²), ni en la zona 3, donde en el grupo MO se contaron 497,5±82,5 cap. /150 µm² y en el grupo SF (401,3±127,5 cap. /150 µm²).

DISCUSIÓN

Poder angiogénico de la terapia celular en el IAM

Los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron un aumento significativo en el número de capilares en la zona Z1 en los animales tratados con MO en comparación con los animales del grupo control, tratados con SF. Estos resultados concuerdan con lo comunicado por Tomita y col (1999), quienes evaluaron el poder angiogénico de CNM de MO frescas en ratas adultas, el infarto fue provocado por crionecrosis con nitrógeno líquido en pared libre de ventrículo izquierdo, encontrando una diferencia significativamente mayor de capilares en la zona isquémica del grupo de animales que fue tratado con CMMO frescas en comparación con el control con medio de cultivo IMDM (Iscove's modified Dulbecco medium); (6296 capilares/0.2mm² para CMMO frescas y 2126 capilares/0.2mm² para el grupo control). Estos mismos autores también obtuvieron un mayor número de capilares con respecto al grupo control en un grupo de ratas tratado con CMMO cultivadas por 7 días (5936 capilares/0.2mm²) y en un tercer grupo tratado con CMMO + 5-azacitidina (5aza) (5746 capilares/0.2mm²) que induce la diferenciación de CMMO en células miogénicas, lo cual demuestra el poder angiogénico de las CMMO en la terapia celular, a pesar de las distintas formas de procesamiento de las células.

En otro trabajo, Kamihata y col (2001) demostraron a través de angiografía coronaria que el desarrollo de la circulación colateral, en un modelo porcino de isquemia de miocardio por ligadura de la segunda rama diagonal de la descendente anterior, se vio incrementado luego de ser tratado con CMMO a pesar de que fisiológicamente en los porcinos la circulación colateral es de por sí pobre. El bajo desarrollo de la circulación colateral es una característica que comparten ovinos y porcinos (Kamihata y col 2001; Tomita y col. 1999). Con los resultados obtenidos en el presente trabajo podemos afirmar que el desarrollo de la circulación colateral se vio incrementado en el grupo de ovejas tratadas con CMMO frescas inyectadas directamente en la zona de miocardio isquémico, teniendo en cuenta la diferencias significativas entre el grupo tratamiento con el grupo control en el conteo de capilares. En el presente trabajo además del estudio histológico, debería realizarse una técnica como la angiografía coronaria que nos permitiría afirmar con mayor exactitud el desarrollo de la circulación colateral.

En un trabajo realizado por Bel y col en 2003, en modelo ovino de infarto de miocardio en 18 ovejas adultas mediante ligadura de las ramas marginales de la arteria circunfleja; donde tres semanas más tarde se trasplantó células madres frescas de medula ósea en cicatrices pos infarto, midiendo sus resultados mediante ecocardiografía Doppler y análisis histológicos; concluyeron que no hubo diferenciación de las células injertadas en cardiomiocitos o células endoteliales. Estos resultados sugieren que para ser funcionalmente eficaz, la inyección de células no fraccionadas derivadas de medula ósea debería realizarse en la etapa temprana de la isquemia de miocardio, es decir, en un momento en el que todavía está viviendo el tejido peri-infarto que puede albergar la adecuada señales para accionar el componente pluripotente de las células injertadas hacia endotelio y / o vía de diferenciación cardiomiogénico.

La discrepancia entre estos resultados y los nuestros debe ser analizado a la luz de las principales diferencias en el diseño del protocolo, ya que esto puede ayudar a la hora de definir el lugar y el momento del trasplante de células madre en el contexto de un infarto de miocardio.

Modelo animal:

Diversos autores afirman que el ovino presenta importantes ventajas como animal de experimentación en enfermedades cardíacas, entre ellas la importancia de poseer una anatomía cardíaca similar a la de los humanos, además de presentar un desarrollo de vasos colaterales menor luego de inducida la oclusión coronaria lo cual permite controlar de mejor forma el modelo de estudio (Monnet y Chachques, 2005). Otras especies utilizadas como modelo de infarto de miocardio son los porcinos (Kamihata y col, 2001) y la rata (Tomita y col, 1999). Los porcinos presentan mayor predisposición a sufrir arritmias luego de la inducción de la isquemia, lo cual complica los protocolos experimentales y aumenta la probabilidad de muerte, esto es una importante desventaja con respecto a los ovinos (Monnet y Chachques, 2005), mientras que las ratas son modelos que tienen bajos costos de producción y mantenimiento, y permiten la obtención de una muestra grande en poco tiempo debido a su alta tasa de reproducción. Sin embargo el aspecto negativo de este modelo está dado por la extrapolación al modelo humano ya que las diferencias fisiológicas son

amplias: potenciales de acción muy cortos; la bomba Na/Ca² tiene un papel poco importante en la salida de calcio del citosol; la frecuencia cardíaca es cinco veces mayor en reposo que la de los humanos (Hasenfuss, 1998).

Tipo celular utilizado

Kamihata *y col* (2001) y Tomita *y col* (1999), encontraron que el trasplante de CMMO autóloga en un modelo de IAM induce la angiogenesis en el cerdo y en la rata, respectivamente, mejorando el flujo en la zona infartada y la funcionalidad cardíaca.

Las CMMO pueden extraerse del propio paciente, CMMO autóloga, o de un donante, CMMO alogénica. Para Tomita *y col* (1999), debido a las desventajas del inmunorechazo por parte del huésped, el trasplante de CMMO autóloga es ideal. Sin embargo para Pittenger y Martin (2004), el trasplante autólogo presenta desventajas como la necesidad de practicar una biopsia al paciente en momentos en los que tal vez la producción de células por parte de la médula no sea la suficiente, cultivar las células, y almacenarlas para su administración. Pero ambos autores coinciden en que el trasplante alogénico ofrece ventajas como la clasificación y estudio de los donantes, y la disponibilidad inmediata de las células alogénicas en caso de ser necesitadas (Pittenger y Martin, 2004).

Las CMMO contienen varios tipos de linajes celulares, como células hematopoyéticas, fibroblastos, osteoblastos, endoteliales (Kamihata *y col*, 2001) y células mesenquimales que son raras y escasas en la médula ósea (Pittenger y Martin, 2004).

En el presente trabajo las CMMO utilizadas fueron autólogas, de esta manera se eliminaron los problemas relacionados con el sistema inmunológico. Por otro lado, al usarlas en forma fresca se logra un ahorro significativo en los tiempos de trabajo en cuanto a lo que cosecha y cultivo se refiere. La desventaja fue el bajo número de células que se obtuvo en algunas muestras de MO.

Vía y momento de administración

La vía de administración utilizada, la inyección intramiocárdica, se muestra como la más eficaz ya que permite la identificación de las zonas de infarto garantizando una aplicación local del tratamiento lo cual representa una gran ventaja frente a vías de administración sistémica, además del control preciso del volumen administrado. La vía sistémica intracoronaria es de fácil administración pero no posibilita la administración prolongada, con riesgos como el desarrollo de placas arterioescleróticas (Nabel, 1993; Flugelman, 1993; Inoue, 1998).

Otro punto a tener en cuenta es el momento de administración del tratamiento. En el presente trabajo, la implantación en la zona de infarto fue realizada inmediatamente antes de liberar la ligadura, luego de 90 min de isquemia. Kamihata *y col* (2001), trabajando en cerdos también realizaron la inyección inmediatamente después de liberada la ligadura y obtuvieron resultados similares a los nuestros. Sin embargo Tomita *y col* (1999) realizaron la implantación de las CMMO, tres semanas después de provocada la lesión por crionecrosis. Estos tiempos pueden llevar a diferencias a

la hora de evaluar resultados, ya que en el caso de Tomita *y col* (1999) un factor importante está dado por el tiempo en el cual los mecanismos de reparación propios del miocardio actuaron solos sin CMMO implantadas en la zona de injuria, a diferencia de los otros trabajos en los cuales inmediatamente después de provocada la injuria se aplicó el tratamiento, y los mecanismos intrínsecos del miocardio más las CMMO aplicadas en el tratamiento se potenciaron en conjunto.

CONCLUSIONES

La inyección intramiocárdica de células mononucleares de médula ósea autóloga directamente sobre la zona isquémica, luego de 90 min, induce la angiogénesis, lo que abre la puerta a nuevas investigaciones para el uso de la terapia celular con CMN de MO como alternativa y/o complementaria a la RVQM.

Debido al desarrollo incipiente del área de la terapia celular aún falta camino por recorrer en el campo de la investigación para lograr determinar el mejor método de extracción; origen y aplicación de las CMMO así como el control en tiempo, forma y espacio del proceso angiogénico, para que sea factible el desarrollo de terapias celulares dentro de la medicina humana.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aflatoonian B, Moore H. (2006). Focus on Stem Cells Germ cells from mouse and human embryonic stem cells. *Reproduction*. 132:699–707.
2. Angoulvant, D., S. Fazel, R.K. Li. (2004). Neovascularization derived from cell transplantation in ischemic myocardium. *Mol Cell Biochem* 264(1-2):133-142.
3. Assmus B, Schachinger V. (2002). Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*. 106(24):3009-3017.
4. Bel A, Messas E, Agbulut O, Richard P, Samuel JL, Bruneval P, Hage`ge AA, Menasche´ P, (2003); Transplantation of Autologous Fresh Bone Marrow Into Infarcted Myocardium: A Word of Caution *Circulation* 108:II-247-II-252.
5. Brazzini, A., Cantella, R., De la Cruz, A., Yupanqui, J., León, C., Jorquiera, T., Brazzini, M., Ortega, M., Saenz, L.N. (2010). Intraarterial Autologous Implantation of Adult Stem Cells for Patients with Parkinson Disease. *Journal of Vascular and Interventional Radiology*. 21(4):443–451.
6. Canapp, S. (2012). Current treatment options for elbow disease. *Veterinary Orthopedic & Sports Medicine Group*. Maryland, United States of America. Disponible en: <http://veterinarycalendar.dvm360.com/avhc/Medicine/Current-treatment-options-for-elbow-disease-Procee/ArticleStandard/Article/detail/771437>. Fecha de consulta: 23/3/2014.
7. Carrión, C. L., Miksztowicz, V., Erni, L., Buchholz, B., D'ANNUNZIO, V. E. R. Ó. N. I. C. A., Berg, G., Basso, N. (2008). Efecto de la rosuvastatina sobre el infarto experimental en conejos normales e hipercolesterolémicos. *Revista Argentina de Cardiología*, 76:118-123.
8. Daley GQ, Goodell MA, Snyder EY. (2003). Realistic prospects for stem cell therapeutics *Hematology*; 1:398-418.
9. Evans, M.J., Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*.292:154-156.
10. Fondo Nacional de Recursos (2001). Programa de seguimiento de Cirugía de revascularización coronaria. Disponible en: www.fnr.com.uy. Fecha de consulta: 25/2/2014.
11. Ford, N. (2006). "Human pluripotent stem cell research and ethics." *Monash Bioeth Rev* 25(1):31-41.

12. Flugelman, M. Y., Virmani, R., Correa, R., Yu, Z. X., Farb, A., Leon, M. B., & Epstein, S. E. (1993). Smooth muscle cell abundance and fibroblast growth factors in coronary lesions of patients with nonfatal unstable angina. A clue to the mechanism of transformation from the stable to the unstable clinical state. *Circulation*, 88(6):2493-2500.

13. Fujimoto, Y., Abematsu, M., Falk, A., Tsujimura, K., Sanosaka, T., Juliandi, B., Semi, K., Namihira, M., Komiya, S., Smith, A., Nakashima, K. (2012). Treatment of a Mouse Model of Spinal Cord Injury by Transplantation of Human iPS Cell-derived Long-term Self-renewing Neuroepithelial-like Stem Cells. *Stem Cells*. 30(6):1163-1173.

14. Gearhart, J., Hogan, B., Melton, D., Pedersen, R., Thomas, E.D., Thomson, J., Wilmunt, I. (2009). *Essentials of stem cell biology* .2ª Ed. California. Elsevier. 650p.

15. Haider H. and Ashraf M. (2005). Bone marrow cell transplantation in clinical perspective. *J Mol Cell Cardiol* 38(2):225-235.

16. Hasenfuss, G. (1998). Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy. *Cardiovascular Research*, 39(1): 60-76.

17. Hernández, P., Forrellat-Barrios, M. (2013). Ventajas de la terapia celular con células mononucleares derivadas de la médula ósea, aplicadas en su conjunto. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*. 29 (4). Disponible en: <http://www.revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/127/93>. Fecha de consulta: 15/08/2014.

18. Hernández Ramírez P, Dorticós Balea E. (2004) Medicina regenerativa. Células madre embrionarias y adultas. *Revista Cubana Hematología Instituto de Hematología e Inmunología* 20(3):2-16.

19. Hristov, M. and C. Weber. (2006). The therapeutic potential of progenitor cells in ischemic heart disease--Past, present and future. *Basic Res Cardiol* 101(1):1-7.

20. Inoue, M., Itoh, H., Ueda, M., Naruko, T., Kojima, A., Komatsu, R., & Nakao, K. (1998). Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Expression in Human Coronary Atherosclerotic Lesions Possible Pathophysiological Significance of VEGF in Progression of Atherosclerosis. *Circulation*, 98(20): 2108-2116.

21. International Society for Stem Cell Research. Frequently Asked Questions. Understanding Stem Cells. Disponible en: <http://www.isscr.org/FAQ1.htm>. Fecha de consulta: 10/10/2014.
22. Joggerst SJ and Hatzopoulos AK (2009). Stem cell therapy for cardiac repair: benefits and barriers. *Expert Rev Mol Med.*; 11:e20.
23. Kamihata, H., Matsubara, H., Nishiue, T., Fujiyama, S., Tsutsumi, Y., Ozono, R., Iwasaka, T. (2001). Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation*, 104(9): 1046-1052.
24. Kelly, E (2007). *Stem cells*. Westport, Greenwood, 204p.
25. Körbling M, Estrov Z. (2003) Adult stem cells for tissue repair - A new therapeutic concept? *N Engl J Med*; 349:570-82.
26. Kowaleski, M; Saunders, W. (2013). Cell-based therapies in orthopedic surgery: examining the evidence. *Small Animal and Exotics Proceedings. North American Veterinary Conference. Florida, United States of America.* p.19.
27. Kraus, K., Kinker-Head, C. (2006). Mesenchymal Stem Cells and Bone Regeneration. *Veterinary Surgery*. 35: 232-242.
28. Monnet, E., Chachques, J. C. (2005). Animal models of heart failure: what is new? *The Annals of Thoracic Surgery*, 79(4): 1445-1453.
29. Moreno, E. (1984). Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. Universidad Nacional Autónoma de Mexico, UNAM, pp169-178.
30. Ministerio de Salud Pública. (2005). Mortalidad por causa, sexo, edad y departamento -ROU - 2003. Estadísticas Vitales, Dpto.de Información Poblacional, Dirección General de la Salud. Disponible en: <http://www.msp.gub.uy/hnnoticiaj1.cgi?219,19,19,19,,0,0>. Fecha de consulta: 10/03/2014.
31. Mukhopadhyay, C.S., Tokas, J., Mathur, P.D. (2011). Prospects and Ethical Concerns of Embryonic Stem Cells Research-A Review. *Veterinary World* 4(6): 281-286.
32. Nabel, E. G., Yang, Z. Y., Plautz, G., Forough, R., Zhan, X., Haudenschild, C. C., Nabel, G. J. (1993). Recombinant Fibroblast Growth Factor-1 Promotes Intimal Hyperplasia And Angiogenesis In Arteries In vivo. *Nature*, 362: 844-846.

33. National Institutes of Health United States Department of Health and Human Services. (2001). Stem cells: scientific progress and future research directions. Disponible en: <http://stemcells.nih.gov/staticresources/info/scireport/PDFs/fullrptstem.pdf>. Fecha de consulta: 29/09/14.
34. Pampee P, Young A, Hofling A, Sands MS. (2002). VEGF increases engraftment of bone marrow-derived endothelial progenitor cells (EPCs) into vasculature of newborn murine recipients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99:11951–11956.
35. Pittenger, M. F., Martin, B. J. (2004). Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circulation Research*, 95(1): 9-20.
36. Prósper Cardoso F., Herreros González, J, Alegría Ezquerro, E. (2003) Utilización de células madre para la regeneración miocárdica en la insuficiencia cardíaca. *Revista Española de Cardiología* 56(10).
37. Rossant J. (1995) Development of the extraembryonic lineages. *Sem Cell Dev Biol*; 6:237-47.
38. Siepe M, Heilmann C, von Samson P, Menasché P, Beyersdorf F. (2005). Stem cell research and cell transplantation for myocardial regeneration. *Eur J Cardiothorac Surg*. Aug; 28(2):318-24.
39. Strauer, B.E., M. Brehm, T. Zeus, y col. (2002). Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 106(15):1913-1918.
40. Tomita, S., Li, R. K., Weisel, R. D., Mickle, D. A., Kim, E. J., Sakai, T., Jia, Z. Q. (1999). Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation*, 100: II-247- II-256.
41. Verfaillie CM, Pera MF, Lansdorp PM. (2002) Stem cells: Hype and reality. *Hematology*; 1:369-391.
42. Wollert, K.C., G.P. Meyer, J. Lotz, y col. (2004). Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 364(9429):141-148.
43. Yaneselli, K. (2012). Implante de Células Madre Mesenquimales Alogénicas en una no unión de radio en un canino. Tesis. Universidad de la República. Facultad de Veterinaria. 39 p.

44. Yoon YS, Johnson IA, Park JS, Diaz L, Losordo DW. (2004). Therapeutic myocardial angiogenesis with vascular endothelial growth factors. *Mol. Cell Biochem.*; 264: 63-74.
45. Zeledón SF, Morales O, Méndez JE, Porras A, Zamora LJ, Orlich P. (2005) Células Madre en la reparación de tejido miocárdico: Biología y Clínica. *Revista Costarricense de Cardiología* 7:1409-4142.