

Homing Miocárdico tras Infusión Intrapericárdica de Células Mononucleares de Médula Ósea

Érika Branco¹, Emerson Ticona Fioretto², Rosa Cabral³, Carlos Alberto Sarmiento Palmera⁴, Guilherme Buzon Gregores⁴, Angelo João Stopiglia⁴, Paulo César Maiorka⁴, Pedro Alves Lemos⁵, Carlos Campos⁵, Celso Takimura⁵, José Antônio Franchini Ramires⁵, Maria Angelica Miglino⁴

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural da Amazônia - UFRA¹, Belém, PA; Universidade Federal do Sergipe - UFS², Aracaju, SE; Universidade Federal do Piauí - UFPI³, Teresina, PI; Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia FMVZ/USP⁴, São Paulo, SP; Instituto do Coração - InCor⁵, São Paulo, SP - Brasil

Introducción

Las células madre se utilizan en el tratamiento de enfermedades cardíacas, estando relacionadas a la posible neovascularización y formación de tejido¹. El trasplante de células madre se realiza mediante técnicas intracoronaria, intramiocárdica, y de infusión retrógrada²⁻⁴; con todo, ésta presenta limitaciones y tiene aplicación reducida en la práctica clínica.

Estudios anteriores probaron el espacio pericárdico para la administración de fármacos⁵. En teoría, el abordaje transpericárdico presenta ventajas potenciales para la administración de células, incluyendo la característica no vascular del saco pericárdico, lo que puede permitir procedimientos repetidos. El espacio pericárdico puede servir como un compartimiento de almacenaje, aumentando de esa forma la biodisponibilidad local de las células infundidas. No obstante, el abordaje transpericárdico para terapia de células madre ha sido poco explorada.

Este estudio preliminar evalúa si la administración de Células Mononucleares de Médula Ósea (CMMO) autólogas en el saco pericárdico resulta en *homing* de las células miocárdicas en los casos control y con infarto de miocardio inducido.

Métodos

Diseño del estudio

El presente estudio tuvo por objetivo evaluar si el *homing* de las células miocárdicas ocurre después de la inyección de CMMO autólogas en el espacio pericárdico. Siete cerdas domésticas se dividieron en dos grupos: infarto de miocardio inducido (n=3) y no infarto de miocardio (n=3). Un animal

del grupo infarto de miocardio inducido murió antes de la inyección de CMMO. Los animales fueron sacrificados para examen del corazón 21 días después de la inyección de CMMO. Los protocolos del estudio fueron aprobados por el Comité de Bioética local.

Recolección de la muestra de médula ósea y separación y marcación de células

Los animales fueron premedicados con clorhidrato de ketamina intramuscular (5mg/kg) y Midazolam (0,5 mg/kg). La inducción se realizó con propofol IV (5mg/kg) y el mantenimiento con isoflurano. Se obtuvo una muestra de 60 ml de aspirado de médula ósea utilizando una aguja para punción ósea introducida en la cresta ilíaca.

El aspirado de médula ósea se diluyó en solución salina y se separaron las CMMO por gradiente de densidad utilizando Ficoll-Paque™ Plus® (Amersham Pharmacia). Después de 20 minutos de centrifugación a 2.000 rpm (20°C), se formó un halo de CMMO. Las células de médula ósea se aspiraron y se agregaron a la solución salina para posterior centrifugación (7 minutos a 2.000 rpm y 20°C). El aglomerado de células se suspendió en solución salina y se filtró con malla de acero inoxidable. El filtrado se resuspendió en solución salina y se recentrifugó como se describió anteriormente. Una alícuota de la solución se sometió a coloración con azul tripán y se evaluó en una cámara de Neubauer para determinar su viabilidad. Separamos un total de 10⁸ células, las cuales se marcaron con 1 µl Hoechst 33342 (Invitrogen/H1399, Brasil) y se incubaron en baño maría por 30 minutos a 37°C.

Técnica de infusión intrapericárdica

Se accedió al espacio pericárdico a través de la región subxifoidea usando una aguja de epidural (Figura 1). La aguja se avanzó con orientación fluoroscópica hasta pasar el pericardio parietal. La posición de la extremidad de la aguja en el saco pericárdico se confirmó radiográficamente mediante infusión de contraste yodado diluido. Una vez en el espacio pericárdico, se inyectó un total de 10⁸ de CMMO coloreadas con Hoechst® diluidas en 10 ml de solución salina.

Infarto agudo de miocardio experimental

Según las descripciones anteriores⁶, se indujo infarto agudo de miocardio en 3 animales inmediatamente antes de

Palabras clave

Células madre, infarto de miocardio, pericardio.

Correspondencia: Érika Branco •

Av. Pte. Tancredo Neves, 2501 - Montese - 66077-530 - Poste restante: 917 - Belém, PA - Brasil

E-mail: erika.branco@ufra.edu.br

Artículo recibido el 09/07/08; revisado recibido el 21/10/08; aceptado el 21/10/08.



Fig. 1 - Local de infusión de las células mononucleares de la médula ósea de acuerdo con (espacio pericárdico *) la visualización para el fluoroscopio. Epidural por punción (flecha roja) y contraste yodado (β).

la inyección de CMMO. Tras el acceso de la arteria femoral mediante disección roma, se manipuló un catéter guía 6F de Judkins bajo orientación fluoroscópica hasta la coronaria izquierda y fue selectivamente canulado. Un hilo guía de 0,014" se insertó en la arteria descendente anterior izquierda, sobre el cual se posicionó un catéter balón, exactamente distal al origen de la primera rama diagonal. Se indujo un infarto agudo de miocardio de la pared anterior mediante la oclusión total de la arteria por un período de 45 minutos.

Los animales fueron sacrificados después de 21 días. El corazón fue removido y se separaron los ventrículos de los atrios en el nivel del surco atrioventricular. Los ventrículos se cortaron en rebanadas y los fragmentos se recolectaron para análisis de las regiones basal, media y apical. Las muestras se procesaron para microscopía óptica estándar y análisis inmunohistoquímico. Los fragmentos utilizados en el análisis inmunohistoquímico fueron embebidos en una solución de 3 partes de PBS y 7 partes de glicerol y se preservaron criogénicamente en nitrógeno, y se almacenaron en freezer a -80°C . Los análisis se realizaron en rebanadas congeladas usando un microscopio epifluorescente (microscopio Leica® DM 50). El *homing* miocárdico de las CMMO se estimó por el número total de células coloreadas por Hoechst® presentes en el miocardio ventricular.

Análisis estadístico

Las variables continuas se presentan como promedio \pm desviación estándar y las variables discretas como cantidades y porcentajes. El test *t* de Student se utilizó para comparar el conteo de células entre los grupos del estudio.

Resultados

Resultados agudos

Una muerte experimental ocurrió en el grupo de infarto

inducido debido a fibrilación ventricular al inflar el balón. El animal se murió antes de la administración de las CMMO y no se consideró en el análisis. Los otros 6 animales completaron el procedimiento sin complicaciones.

El acceso al espacio pericárdico se realizó sin complicaciones y la dosis completa de las CMMO se administró en todos los casos. No hubo complicaciones derivadas de la punción, perforación de la cámara cardíaca, arritmia o inestabilidad hemodinámica durante la manipulación intrapericárdica e infusión de las células.

Seguimiento de 21 días

No se registraron muertes post procedimiento. Todos los animales sobrevivieron al procedimiento index, completando el protocolo de 21 días del estudio sin eventos adversos o señales de insuficiencia cardíaca.

En todos los animales, la superficie pericárdica parecía normal a la inspección visual, sin depósitos de fibrina, fibrosis, adherencias o neovascularizaciones visibles. En los animales con infarto inducido, una cicatriz miocárdica era claramente identificable en la pared anteroapical.

En ambos grupos (infartado y no infartado), la evaluación microscópica mostró un promedio de 109.494 ± 46.505 CMMO en *homing* miocárdico. Además de ello, el *homing* miocárdico era significativamente más pronunciado en el grupo con infarto que en el grupo sin infarto (150.342 ± 22.456 vs 68.645 ± 19.421 ; $p < 0,01$). Los grados de penetración de las CMMO en el miocardio variaron en el corazón entero. Una mayor penetración de CMMO en el miocardio ocurrió en el área infartada. Las CMMO se observaron adheridas al epitelio de la pared de pequeños vasos en el área infartada (Figura 2). Pequeñas cantidades de CMMO fueron vistas en el epicardio y miocardio en los animales del grupo control (Figura 2).

Discusión

En nuestro estudio preliminar demostramos que la administración intrapericárdica es capaz de inducir el *homing* miocárdico de CMMO en porcinos. Además de ello, después de 21 días el *homing* de las células fue más extenso en los animales con infarto agudo de miocardio inducido.

Nuestros resultados sugieren que las CMMO son capaces de penetrar en el miocardio, a través del pericardio visceral, después de su administración en el espacio pericárdico. Nuestros hallazgos son similares a aquellos descritos para las técnicas intracoronaria, retrógrada e intramiocárdica^{6,7}. No obstante, la inyección intrapericárdica presenta características que pueden traducirse en ventajas para el uso clínico, relacionadas a su naturaleza mínimamente invasiva y la no necesidad de entrada arterial. La seguridad del acceso transpericárdico fue relatada anteriormente para otras aplicaciones, aunque el entrenamiento en punción cardíaca sea altamente necesario. Con todo, el abordaje transpericárdico puede teóricamente ser, como mínimo, tan seguro como la administración intramiocárdica de células comúnmente relatada⁸. Además de ello, los costos de la aplicación de la técnica transpericárdica son más bajos que las técnicas intracoronaria, retrógrada e intramiocárdica^{3,9}.

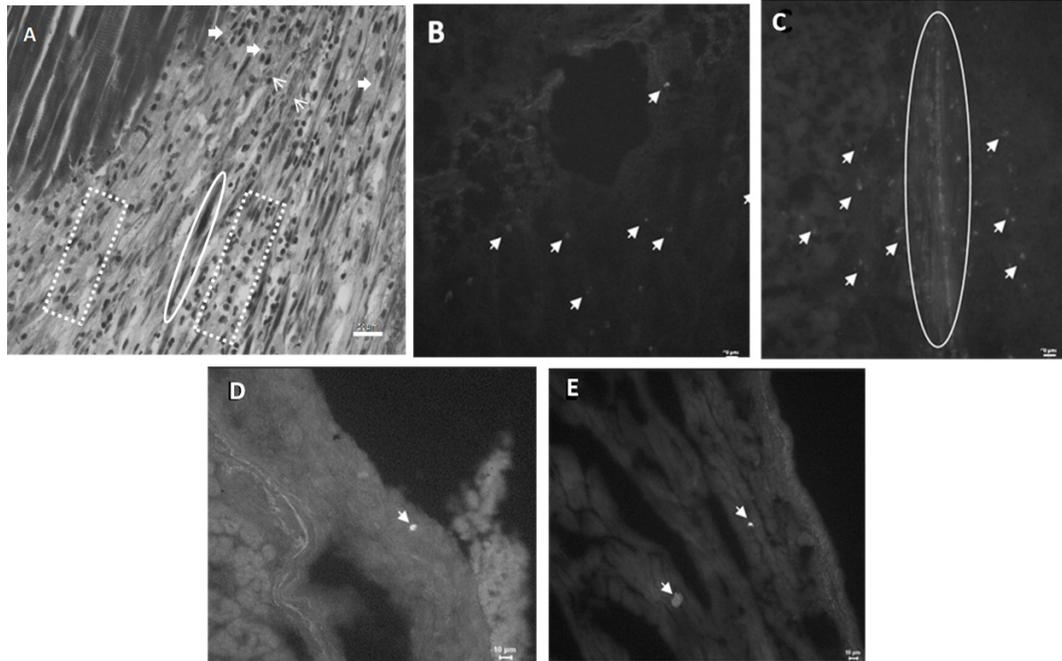


Fig. 2 - Fotomicrografía del corazón de animal 21 días post infarto agudo de miocardio mostrando en A: Observe el tejido granular en tejido cardíaco, conteniendo fibras cardíacas longitudinales prácticamente integrales (círculo). Observe una organización fibrótica inmadura con formación de neovaso (flecha fina), deposición de matriz extracelular (fibras verticales no polimerizadas de colágeno) (flecha gruesa), fibroblastos e infiltrado inflamatorio mononuclear moderado (rectángulo punteado). Coloración: tricromo de Masson. Escala de las barras: 20 μ m. B y C: Animales infartados: coloración de Hoechst® positiva en las células mononucleares de médula ósea en el intersticio miocárdico (flechas) y homing de CMMO en la pared del vaso (elipse). Coloración: Azul de Evans. Escala de las barras: 10 μ m (A), 20 μ m (B). D y E: Animales control: coloración tricromo de Masson positiva en el epicardio, intersticio miocárdico (flechas). Coloración: Azul de Evans. Escala de las barras: 10 μ m (A).

Hay relatos de que el fluido pericárdico tiene una baja tasa de *turnover*, indicando el potencial del espacio pericárdico para funcionar como un reservorio para la liberación retardada de agentes farmacológicos, que pueden ser administrados en altas concentraciones sin efectos sistémicos^{5,10}. Por consiguiente, la capacidad de almacenaje del espacio pericárdico puede mostrarse benéfica para la terapia celular, pues prolonga la biodisponibilidad de las células viables para penetración miocárdica.

En nuestro estudio observamos una penetración difusa de las CMMO a través del miocardio, lo que se contrapone con la naturaleza más localizada de las técnicas intracoronaria, intramiocárdica o retrógrada^{3,7,8}. Es posible, por lo tanto, prever posibles aplicaciones del abordaje transpericárdico para formas difusas de cardiomiopatía. Por otro lado, la concentración de células fue significativamente más alta en las regiones con infarto agudo de miocardio. Este hallazgo sugiere

que factores locales en la región infartada pueden interactuar para aumentar la migración y/o supervivencia celular en el miocardio lesionado.

Potencial Conflicto de Intereses

Declaro no haber conflicto de intereses pertinentes.

Fuentes de Financiación

El presente estudio fue financiado por FAPESP e Incor-SP.

Vinculación Académica

Este artículo es parte de la tesis de Doctorado de Érika Renata Branco de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de São Paulo - FMVZ/USP - Departamento de Cirugía.

Referencias

1. Bourassa MG, Detre KM, Johnston JM, Vlachos HA, Holubkov R. Effect of prior revascularization on outcome following percutaneous coronary intervention; NHLBI Dynamic Registry. *Eur Heart J*. 2002; 23: 1546-55.
2. Leor J, Patterson M, Quinones MJ, Kedes LH, Kloner RA. Transplantation of fetal myocardial tissue into infarcted myocardium of rat: a potential method for repair of infarcted myocardium? *Circulation*. 1996; 94 (Suppl II): 332-6.
3. Hou DM, Cates P, Bekkers S, Miller MA, Carl L, Rouch CL, et al. Efficient myocardial delivery of microspheres and endothelial cells via selective retrograde

- coronary venous delivery [abstract]. *J Am Coll Cardiol.* 2002; 39: A76.
4. Hou DM, McLaughlin F, Thiesse M, Rogers P, Johnson R, Wang J, et al. Widespread regional myocardial transfection by plasmid encoding Del-1 after retrograde coronary venous delivery. *Cathet Cardiovasc Interv.* 2003; 58: 207-11.
 5. Kolettis TM, Kazakos N, Katsouras CS, Niokou D, Pappa L, Koulouras V, et al. Intrapericardial drug delivery: pharmacologic properties and long-term safety in swine. *Int J Cardiol.* 2005; 99: 415-21.
 6. Hou DM, Youssef EA, Brinton TJ, Zhang P, Rogers P, Prince ET, et al. Radiolabeled cell distribution after intramyocardial, intracoronary, and interstitial retrograde coronary venous delivery – Implications for current clinical trials. *Circulation.* 2005; 112: 150-6.
 7. Vulliet PR, Greeley SM, Macdonald KA, Kittelson M. Intra-coronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs. *Lancet.* 2004; 363: 783-4.
 8. Fuchs S, Baffour R, Zhou YF, Shou M, Pierre A, Tio FO, et al. Transendocardial delivery of autologous bone marrow enhances collateral perfusion and regional function in pigs with chronic experimental myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol.* 2003; 37: 1726-32.
 9. Mannam AP, Kalon KK, Cultip DE, Carrozza, JP, Cohen DJ, Lorell BH, et al. Safety of subxyphoid pericardial access using a blunt-tip needle. *Am J Cardiol.* 2002; 89: 891-3.
 10. Baek SH, Hrabie JA, Keefer LK, Hou D, Fineberg N, Rhoades R, et al. Augmentation of intrapericardial nitric oxide level by a prolonged-release nitric oxide donor reduces luminal narrowing after porcine coronary angioplasty. *Circulation.* 2002; 105: 2779-84.