

# CULTIVO DE CELULAS MADRE A PARTIR DE MÚSCULO ESQUELÉTICO EN TERAPIA REGENERATIVA CARDIACA.

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de mortalidad en los países desarrollados. Concretamente, sólo en España se diagnostican 250 nuevos IAM por cada 100.000 habitantes y año lo que hace de esta enfermedad un problema de salud pública muy importante. La insuficiencia cardíaca (IC) es la principal consecuencia clínica de la cardiopatía hipertensiva, isquémica o idiopática, y se debe a la disfunción de las células musculares cardíacas o cardiomiocitos (Cohn et al., 1997) . La ausencia de células madre cardíacas así como la incapacidad de los cardiomiocitos de replicarse y regenerar las células destruidas constituyen las bases anatomopatológicas de la IC.

El tratamiento médico ha mejorado significativamente la supervivencia de los pacientes con insuficiencia cardíaca (Cohn, 1996) . Sin embargo, la única alternativa terapéutica curativa para la IC grave es el trasplante cardíaco, que conlleva un elevado coste económico y una morbilidad importante. Por todo ello resulta evidente la necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que permitan una aproximación más fisiológica, segura, económica y menos agresiva para el tratamiento de la IC. En los últimos años se han desarrollado nuevas estrategias dirigidas a estimular la regeneración del músculo cardíaco o a su sustitución por células con capacidad miogénica (Kessler and Byrne, 1999) . Existen distintos estudios experimentales que han valorado la utilización de fuentes celulares distintas como forma de regeneración cardíaca (Kessler and Byrne, 1999) entre las que podemos destacar las células madre embrionarias (Kehat et al., 2001) , células madre de adulto obtenidas de médula ósea (Orlic et al., 2001; Toma et al., 2002) , células de músculo cardíaco obtenidas fetos (Yokomuro et al., 2001) o células derivadas de músculo esquelético (Taylor et al., 1998) . Clínicamente tan solo se han desarrollado aplicaciones en humanos de células derivadas de músculo esquelético (Menasche et al., 2001) .

El músculo cardíaco está compuesto principalmente por células musculares especiales, estroma producido por fibroblastos y vasos. Aunque la utilización de

músculo esquelético para regenerar el tejido cardíaco dañado ha demostrado su eficacia, la posibilidad de utilizar células con capacidad de diferenciarse hacia músculo cardíaco tiene teóricamente mayor interés. La posibilidad de las células madre pluripotenciales de diferenciarse no sólo hacía cardiomiocito, sino también hacia endotelio o fibroblasto incrementaría las posibilidades terapéuticas, en la medida en la que se consiga activar los programas de diferenciación adecuados. Aunque las perspectivas abiertas por estos estudios son ilimitadas, existen numerosas preguntas pendientes de contestar antes de que estas terapéuticas puedan extrapolarse a la clínica. Es fundamental desarrollar estudios que nos ayuden a determinar cuál es la fuente ideal de células, si es mejor administrar células inmaduras y estimular su diferenciación *in vivo* o por el contrario es preferible la administración de células comprometidas a una estirpe celular; cómo se deben administrar; cuántas células son necesarias, etc.

## OBJETIVO

El objetivo principal de este trabajo fue el cultivo de células madre obtenidas de músculo esquelético para regenerar el tejido miocárdico dañado como consecuencia de un IAM.

## PACIENTES

Se aislaron células satélite obtenidas de biopsias musculares en 6 pacientes, 5 hombres y una mujer. El rango de edades fue de 68-76 años en el momento del implante.

## MÉTODOS

-El día antes de realizar la biopsia, se hizo una plasmaféresis al enfermo y se procesó para la obtención de suero autólogo para suplementar posteriormente el medio de cultivo de los mioblastos.

-La biopsia muscular, que suele hacerse en la cara anterior del muslo, fue recogida en un recipiente estéril en PBS y almacenada a 4°C hasta su procesamiento. Se recomienda que no transcurran más de 24 horas.

-Inicialmente, se pesó la biopsia y posteriormente se cortó en trocitos pequeños con las tijeras. Con ayuda del bisturí y de las pinzas se eliminó la fascia y el septo.

Posteriormente, se lavó la muestra en PBS, hasta que el sobrenadante quedó totalmente transparente.

-En un siguiente paso, pasamos a digerir en tripsina y colagenasa la muestra. En primer lugar, incubamos en colagenasa durante una hora, y posteriormenete en tripsina durante 40 minutos a 37°C. Para neutralizar la tripsina, utilizamos suero autólogo y posteriormente filtramos la muestra ya digerida a través de un filtro de 45 micras. Por último, lavamos las células ya filtradas, primero con PBS y posteriormente con medio de cultivo, y se plantaron en flask de 25cm2 de superficie de adherencia. A las 24 horas del plantado, se retiraron las células no adheridas y se procedió a la expansión de las demás.

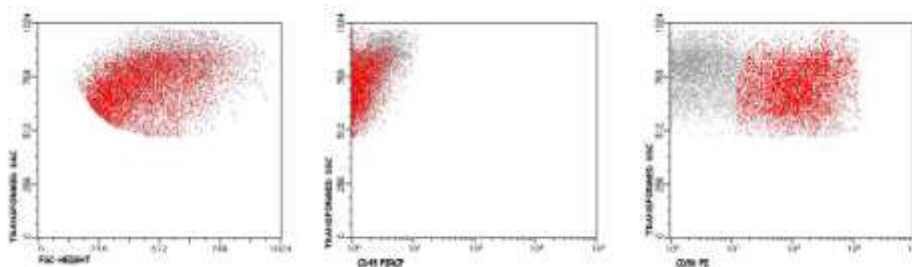
-Cada 2-3 días cambiamos el medio a los flask. Una vez que las células alcanzaron aproximadamente un 50% de confluencia, se procedió a la tripsinización de las mismas y se volvieron a plantar, esta vez en flask de 75 cm2. Durante aproximadamente 3 semanas, se procedió a sucesivos pases, hasta llegar a un total de 144 flask T75, momento en el cual se tripsinizaron y se resuspendieron en suero fisiológico para proceder a la infusión. Como paso previo al implante, se realizó un conteo de las células obtenidas, así como un análisis microbiológico de la muestra. Además, por citometría determinamos el porcentaje de células CD56+/CD45- presentes en el producto final de la infusión.

## RESULTADOS

En 4 de los casos se consiguió un número de células suficiente como para poder llevar a cabo el implante. En la siguiente tabla podemos ver el número de células implantadas, así como el porcentaje de células CD56+/CD45- presentes en el producto a infundir.

<u>%CD56+/CD45-</u>	<u>Nº CÉLULAS INFUNDIDAS</u>
64,22 ±17,77	80,62±61,66
57,5 (51,9-90)	85 (2,5-150)

Aquí podemos observar en uno de los pacientes, en color rojo, el porcentaje de células CD56+/CD45- presentes en el cultivo, analizado por citometría de flujo.

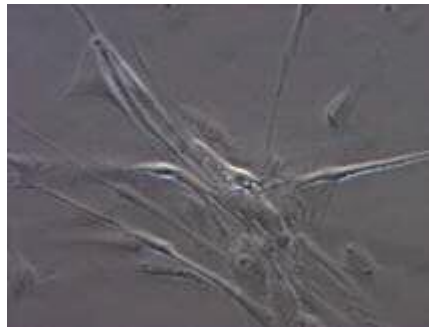


FSC-HEIGHT

CD56 PE

CD45 PERCP

**A continuación mostramos fotografías realizadas a las células en cultivo**



### CONCLUSIONES

- 1- . Los avances en estos últimos años, en Terapia Celular han sido extraordinarios, lo que ha permitido un conocimiento rápido e inesperado en la programación celular.
- 2- . Ante las nuevas alternativas terapéuticas que se nos presentan debemos colaborar ,para así , entre todos conseguir cada vez mejores metas.
- 3- . La utilización de las Células Madre del adulto tiene un gran potencial científico y terapéutico, pero la aplicación de estas, exige una manipulación controlada si queremos para todos una medicina mas humana.

### BIBLIOGRAFIA

-Cohn, J. N. (1996). The management of chronic heart failure. *N Engl J Med* 335, 490-8.

-Cohn, J. N., Bristow, M. R., Chien, K. R., Colucci, W. S., Frazier, O. H., Leinwand, L. A., Lorell, B. H., Moss, A. J., Sonnenblick, E. H., Walsh, R. A., Mockrin, S. C., and Reinlib, L. (1997). Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute Special Emphasis Panel on Heart Failure Research. *Circulation* 95, 766-70.

-Kehat, I., Kenyagin-Karsenti, D., Snir, M., Segev, H., Amit, M., Gepstein, A., Livne, E., Binah, O., Itskovitz-Eldor, J., and Gepstein, L. (2001). Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* 108, 407-14.

-Kessler, P. D., and Byrne, B. J. (1999). Myoblast cell grafting into heart muscle: cellular biology and potential applications. *Annu Rev Physiol* 61, 219-42.

-Menasche, P., Hagege, A. A., Scorsin, M., Pouzet, B., Desnos, M., Duboc, D., Schwartz, K., Vilquin, J. T., and Marolleau, J. P. (2001). Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 357, 279-80.

-Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, S. M., Li, B., Pickel, J., McKay, R., Nadal-Ginard, B., Bodine, D. M., Leri, A., and Anversa, P. (2001). Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* *410*, 701-5.

-Taylor, D. A., Atkins, B. Z., Hungspreugs, P., Jones, T. R., Reedy, M. C., Hutcheson, K. A., Glower, D. D., and Kraus, W. E. (1998). Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med* *4*, 929-33.

-Toma, C., Pittenger, M. F., Cahill, K. S., Byrne, B. J., and Kessler, P. D. (2002). Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* *105*, 93-8.

-Yokomuro, H., Li, R. K., Mickle, D. A., Weisel, R. D., Verma, S., and Yau, T. M. (2001). Transplantation of cryopreserved cardiomyocytes. *J Thorac Cardiovasc Surg* *121*, 98-107.