

FISIOLOGIA CELULAR

USO DE CELULAS MADRE EN LA TERAPEUTICA DE LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES: DESDE LA CIENCIA BASICA A LA APLICACIÓN CLINICA.

Parte I: Conceptos Básicos

Fernando Zeledón S. *

Carlos Escalante G. **

Orlando Morales M. ***

Edgar Méndez J ****

SUMMARY

The last decade has seen great strides in the drug treatment of myocardial infarction and consequent heart failure, with associated improvements in quality of life, haemodynamics and survival. Despite this, the benefits of pharmacotherapy are limited in more severe cases, and mortality and morbidity remain high. The ability to replace damaged myocardium by use of stem cell therapy offers a new and potentially exciting treatment modality, but its benefits are at present far from established. While clinical trials explore cells derived from skeletal muscle and bone marrow, basic researchers are investigating sources of new cardiomyocytes, such as resident myocardial

progenitors. Here, we briefly review the use of bone marrow derived and cardiac derived stem/progenitor cells in myocardial regeneration studies. We also discuss the challenge of translating basic cellular and molecular mechanism into effective, clinically relevant options.

ABREVIATURAS:

Las abreviaturas están incluidas en el texto con su respectivo significado. La bibliografía general se adjunta en la tercera

parte de este artículo.

INTRODUCCIÓN

En los últimos 20 años se han presentado cambios importantes en el

tratamiento de la cardiopatía isquémica y la subsecuente insuficiencia cardíaca, pero a pesar de estos avances en dichas patologías, sus complicaciones se presentan como la primera causa de morbilidad y muerte alrededor del mundo en lo que respecta a enfermedades no traumáticas.42,50. Hasta la fecha, el tratamiento de la enfermedad arterial coronaria se ha basado en una combinación de agentes farmacológicos (tales como los inhibidores de la glicoproteína plaquetaria IIb/IIIa, trombolíticos, aspirina, clopidogrel, estatinas, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina y los beta bloqueadores), angioplastia coronaria percutánea,

* Prof. Fisiología Departamento de Fisiología. Universidad de Ciencias Médicas UCIMED. San José. Costa Rica. Programa de Maestría en Fisiología de Sistemas.

** Programa de Maestría en Fisiología de Sistemas U.C.R. Gineco-obstreta. Hospital San Juan de Dios.

*** Profesor de Fisiología. Jefe Departamento de Fisiología. Universidad de Ciencias Médicas UCIMED. San José, Costa Rica.

**** Profesor de Cirugía, Universidad de Ciencias Médicas UCIMED. Servicio de Cirugía Cardiovascular, Hospital México.

injertos coronarios mediante cirugía, el trasplante cardíaco y la terapia biomecánica (tales como los marcapasos biventriculares o los desfibriladores internos). No obstante, mientras estas terapias han mostrado disminuir la progresión de la insuficiencia cardíaca lentamente y promover mejoras clínicas, ninguna de las estrategias citadas "repara" la causa principal que desencadenó la enfermedad, cual es el daño de cardiomiocitos, células endoteliales y músculo liso del tejido cardíaco, con la subsecuente pérdida de miocitos contráctiles, el desencadenamiento del remodelado ventricular y por último, la falla como bomba del corazón. 1,50 Es de esta forma, que la insuficiencia cardíaca continúa siendo el principal problema no resuelto en medicina y hasta hace algunos años atrás, debido al aumento en los factores de riesgo cardiovasculares en la población mundial, no se vislumbraba un mejor futuro en la terapéutica de nuestro gran enemigo. 1 Sin embargo, con el nacimiento de la "medicina regenerativa", la cual está emergiendo como un campo multidisciplinario involucrando a biólogos celulares y moleculares, patólogos, embriólogos, bioingenieros y clínicos, se abren nuevos horizontes para el tratamiento en base a la terapia con células madre y, por lo tanto, nuevas esperanzas para los enfermos. En esta revisión, se trata este interesante tema en tres partes: la primera que involucra algunos conceptos básicos en

fisiología celular y molecular para poder integrar los futuros conocimientos que emergen día a día en esta nueva disciplina; y una segunda parte y tercera parte, en donde se comentan recientes resultados clínicos (ya en humanos) de la terapéutica con células madre, además de algunas consideraciones técnicas a la hora de realizar dicha terapia.

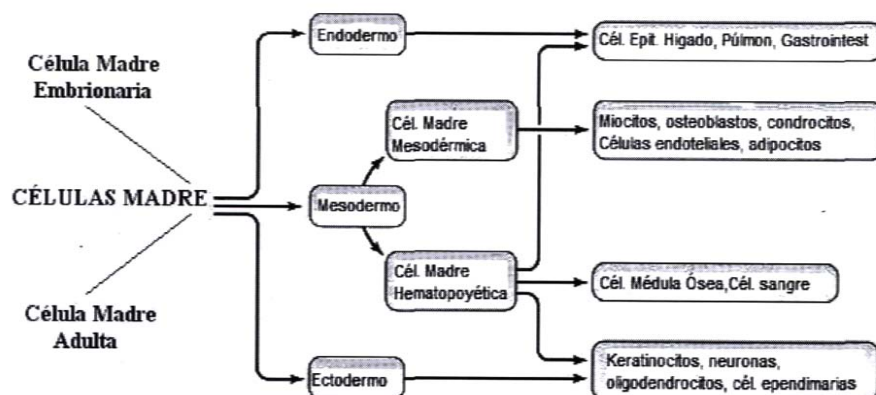
¿Qué es una Célula Madre?

Una célula madre (CM) comparte dentro de su definición las siguientes dos características: la capacidad de diferenciarse dentro de un amplio espectro de tipos celulares y la capacidad de renovarse ellas mismas.¹⁴ Además, el principio biológico que subyace el uso de CM es el fenómeno de diferenciación dirigida por tejido; es decir, células madre aisladas del tejido hepático y reinyectadas en el hígado llegan a ser hepatocitos, mientras que

estas mismas células inyectadas en el miocardio se convierten en miocitos.¹⁴ Las células madre se pueden clasificar según su potencial de diferenciación: las células madre totipotenciales son capaces de producir tejido embrionario y extraembrionario; y en consecuencia un organismo completo (a partir de un blastocisto y células); las células madre pluripotenciales tienen la habilidad de diferenciarse a tejidos procedentes de cualquiera de las tres capas embrionarias y, por último, las células madre multipotenciales, son capaces de diferenciarse en distintos tipos celulares procedentes de la misma capa embrionaria⁽⁵²⁾. (Gráfico 1)

Las células madre se pueden diferenciar entre ellas por marcadores de superficie que cumplen distintas funciones biológicas en el microambiente intra y extracelular. Las más importantes se resumen en el gráfico 1⁽⁴⁶⁾.

Gráfico 1.
Plasticidad de las células madre



Cuadro 1. Fuentes clínicas de células madre

Tipo	Origen	Índices
Embrionaria	Blastocisto, alogénica	————
Cordón Umbilical	Sangre del cordón umbilical, alogénica	CD34+, CD133+
Tejido Adulto	CMH (alogénicas), CMM (alogénicas), Mioblastos (autólogos), Sangre periférica (autólogos) CMDTA	CD45+ CD45- CD56+ CD34+ CD45- CD29+CD49+CD99
CMH: células madre hematopoyéticas; CMM: células madre mesenquimatosas, CMDTA: células madre derivadas de tejido adiposo ⁴⁶		

BIOLOGÍA CELULAR DE LA CÉLULA MADRE

Ya es conocido que las células madre (CM) presentan un potencial de autorrenovación y diferenciación a prácticamente cualquier linaje celular en un ambiente que favorezca dicho proceso.⁽¹⁴⁾ Por otro lado, aunque las características funcionales y fenotípicas han sido extensamente estudiadas, la interrogante de cómo las CM mantienen su potencial de autorrenovación y capacidad de diferenciación se encuentra establecida a nivel celular y molecular.⁽⁴⁶⁾ Esto es de gran importancia; ya que en cuanto se conozca cómo modular tales fenómenos, podremos sinergizar o inhibir los procesos intracelulares para lograr una mayor transdiferenciación hacia cardiomiocitos u otro tipo deseado de célula. Dentro de este contexto, existen diversos

factores de transcripción que regulan la autorrenovación de las CM, tales como el Hox B4, Wnt y la proteína de la leucemia de células madre (stem cell leukemia, SCL); reguladores del ciclo celular, tales como el Noctch-1, p21, p27 y los modificadores de los cromosomas (la telomerasa) y de la cromatina (procesos de metilación y acetilación).^(46,27,41,8,19) Para que las células madre puedan permanecer indiferenciadas y a su vez diferenciarse a determinados estirpes celulares es necesario que exista una adecuada regulación intracelular y extracelular de las mismas. Se han descrito algunos factores que ayudan en la proliferación y anidamiento de las CMH.⁽²⁴⁾ Dentro de estos es importante referirse brevemente a los siguientes:

1) El factor de células madre (SCF) es un factor de crecimiento

crítico en la hematopoyosis como bien en la generación de melanocitos y células germinales. Además, el SCF se presenta en dos formas, una soluble y otra unida a la membrana, las cuales promueven la viabilidad, proliferación y diferenciación de las CMH, y su efecto es sinergizado por la eritropoyetina, el G-CSF y la IL-3. ⁽³⁾ El SCF es un factor de supervivencia para las CMH primitivas; aunque este no promueve su autorrenovación, y su efecto en la supervivencia fue visto incluso cuando la proliferación celular fue suprimida. Varios reportes han demostrado la inhibición de la apoptosis de las CMH por parte del SCF, en parte por la sobreexpresión de la proteína Bcl-2. ⁽³⁾. Dicho factor es sintetizado y expresado por una amplia variedad de células, tales como las estromales, fibroblastos y células endoteliales; además es detectable a bajos niveles en la circulación. ^(3, 29). El SCF, como molécula quimiotáctica para las células hematopoyéticas progenitoras, fomenta la adhesión celular por dos distintos mecanismos. Primero, debido a que el factor de células madre se puede expresar unido a la membrana plasmática de las células estromales (u otras); al unirse a su receptor forma un "puente", entre las CMH y el medio pericelular. Segundo, la señalización a través del c-kit ha demostrado sobreexpresar las beta 1 integrinas, antígeno de expresión tardía (very late antigen-4 VLA-4), el VLA-5, y las

fibronectinas. La adhesión podría ser importante no solamente en mantener a la célula en un micro-ambiente permisivo, sino también en proveer sinergismo, sobrevivencia mediada por integrinas y señales proliferativas. Por otro lado, el SCF es un potente agente que promueve la movilización de las CMH desde la médula ósea hacia la sangre periférica.(29)

2) El c-kit es un receptor tirosin kinasa, y estructuralmente el dominio extracelular puede ser dividido en cinco regiones semejantes a las inmunoglobulinas, de las cuales las primeras tres regiones se unen al SCF, induciendo la homodimerización del receptor y las subsiguientes cascadas en la señal de transducción, tales como la auto fosforilación del c-kit, el P13 Kinasa, el JAK-STAT, la familia Src, las vías Ras-Raf-MAP kinasas. (12)

3) En el proceso de movilización de las CMH se da una liberación de **enzimas proteolíticas** por los neutrófilos. Entre estas proteínas catalíticas se encuentran las metaloproteinasas (MMP), elastasas y catepsinas, cuya función es escindir moléculas de anclaje que unen a las células madre al estroma del micro ambiente en la médula ósea. Por ejemplo, la unión del VLA-4 y su receptor, una molécula de adhesión, denominada VCAM-1 (que se encuentra en las células del estroma), es degradada ante un proceso inflamatorio en el cual los neutrófilos pasan a un estado de activación; a su vez, la IL-8 fomenta

el aumento de las MMP-9 y de la beta integrina CD11. 3,29

4) La interacción entre la quimioquina Factor Derivado del Estroma (**SDF-1**) y su receptor, el **CXCR4** toma gran importancia en la movilización de células madre desde la médula ósea; ya que el SDF-1 es inactivado por las enzimas antes descritas y esto permite el aumento de la expresión del CXCR4 en la membrana plasmática de las células madre, fenómeno que desencadena señales de transducción en las CMH, que permiten su egreso desde la médula ósea hacia la sangre periférica. (43). Ya una vez que las CMH se encuentran en la circulación sistémica; se ha visto que por el contrario, éstas presentan una disminución en la expresión de CXCR4, y en caso de que permanecieran con una alta expresión en la superficie celular de este receptor, las CMH se dirigen nuevamente hacia la médula ósea o se promueve el fenómeno de anidamiento, en los diferentes tejidos periféricos, tales como el corazón.(43). El SDF-1 alfa, es expresado por múltiples células, tales como cardiomiocitos, hepatocitos, células endoteliales, células del bazo y del riñón. Contrario de lo que sucede con otras quimioquinas, las cuales son inducidas por procesos inflamatorios, el SDF-1 lo hace constitutivamente, lo que indica su importancia fisiológica en la homeostasia orgánica y en la hematopoyesis. De hecho, esta quimioquina y su receptor

juegan un papel fundamental en la vasculogénesis, en donde el factor de crecimiento vascular y endotelial podría desarrollar, en parte, sus funciones por este mecanismo. La regeneración miocárdica, tras un evento isquémico, es un mecanismo que se ha hipotetizado ser mediado en parte por células derivadas de la médula ósea. A su vez, se ha demostrado el aumento de la expresión del SDF-1 en el miocardio lesionado, sobre todo en los miocitos de la penumbra. Además, cuando no existe isquemia cardíaca, no se sobreexpresa el SDF-1 y las CM no sufren anidamiento en el tejido cardíaco. Las células progenitoras endoteliales, un tipo de célula madre derivada de la médula ósea, poseen el receptor CXCR4 en su membrana celular y ante un proceso inflamatorio en el miocardio, se secreta el factor inducido por la hipoxia (HIF-1, por sus siglas en inglés) que aumenta la expresión del SDF-1 y tal proceso es sinergizado por la administración exógena del SDF-1, que promueve la angiogénesis.(43). No obstante, la interacción entre el SDF-1/CXCR4 también se encuentra involucrada en la proliferación de células de músculo liso y la oclusión vascular por aterosclerosis desencadenada por un ateroma, lo cual es claramente deletéreo para la fisiología cardíaca. Paradójicamente, la interacción de estas moléculas al parecer también promueven la estabilidad de la placa, y evitan por otro lado que ocurra un síndrome coronario

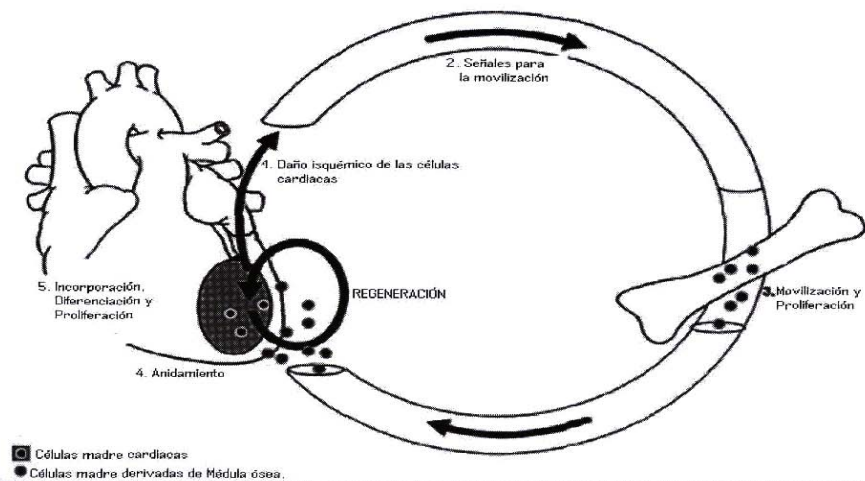


Figura 1. Las fenómenos que se presentan después de un infarto cardíaco y que promueven la regeneración de dicho órgano. (43)

agudo, tal como el angor inestable o el infarto agudo del tejido cardíaco.(43) Por lo tanto, el proceso de regeneración cardíaca puede dividirse en tres fases bien definidas. tales como: la movilización de CM desde médula ósea, el anidamiento de estas células en el tejido cardíaco lesionado y la diferenciación a nuevos cardiomiocitos (figura 1).

A su vez, algunas sustancias podrían interferir con la regeneración cardíaca a partir de células madre hematopoyéticas. (figura 2) (43,48) De estas, es importante comentar sobre:

1) El Factor Necrótico Tumoral (**TNF alfa**) es producido por los monocitos/macrófagos, mastocitos, fibroblastos cardíacos y cardiomiocitos. El TNF alfa pareciera aumentar el área de infarto; pero otro lado, el TNF alfa tam-

bién induce mayor resistencia de los miocitos al estrés hipóxico in vitro. Con respecto a las células madre, este posee un potente efecto quimioatrayante en las células embrionarias, pero inhibe la proliferación de células madre derivadas de médula ósea in vitro. Por lo tanto, bloqueando tempranamente al TNF alfa dentro de las primeras horas después del infarto cardíaco, podría disminuir el área del infarto y a su vez promover la regeneración cardíaca a partir de células madre hematopoyéticas.(48)

2) El Factor de Crecimiento Hepático (**HGF**) es expresado por fibroblastos, células de músculo liso, mastocitos, macrófagos, células endoteliales y leucocitos, y la secreción del HGF es inducida por mediadores tales como la IL-1, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, factor de crecimiento de los fibroblastos y el G-CSF.

El HGF está involucrado en la cardiogénesis. Los niveles del ARNm del HGF y su receptor (el c-met) se encuentran fisiológicamente expresados en el tejido cardíaco a bajos niveles y estos aumentan a los 14 días después de un infarto. Este factor promueve la supervivencia de los cardiomiocitos después del estrés oxidativo, y reduce la apoptosis. Cuando es sobre expresado en el corazón, el HGF promueve la angiogénesis y mejora la función del miocardio infartado. Además, este factor se encuentra involucrado en el anclaje de las células madre al micro ambiente; por ejemplo, la médula ósea o el tejido cardíaco isquémico, y promueve la adhesión, sobrevivencia y proliferación de las CMH.(48)

3) Factor Inducido por la Hipoxia (**HIF**), el cual es capaz de orquestar y activar muchas vías que son indispensables después de daño isquémico y que aumentan la entrega de oxígeno, proceso fundamental para una adecuada reparación cardíaca mediada por células madre.(48)

4) El Factor de Crecimiento Endotelial y Vascular (**VEGF**) no solo juega un rol importante en promover la angiogénesis; sino también en su capacidad de movilización de CMH, desde la médula ósea hacia la sangre periférica en los pacientes infartados.

5) La Eritropoyetina (**EPO**) es inducida por la hipoxia y es sintetizada predominantemente por los riñones en la vida adulta; pero

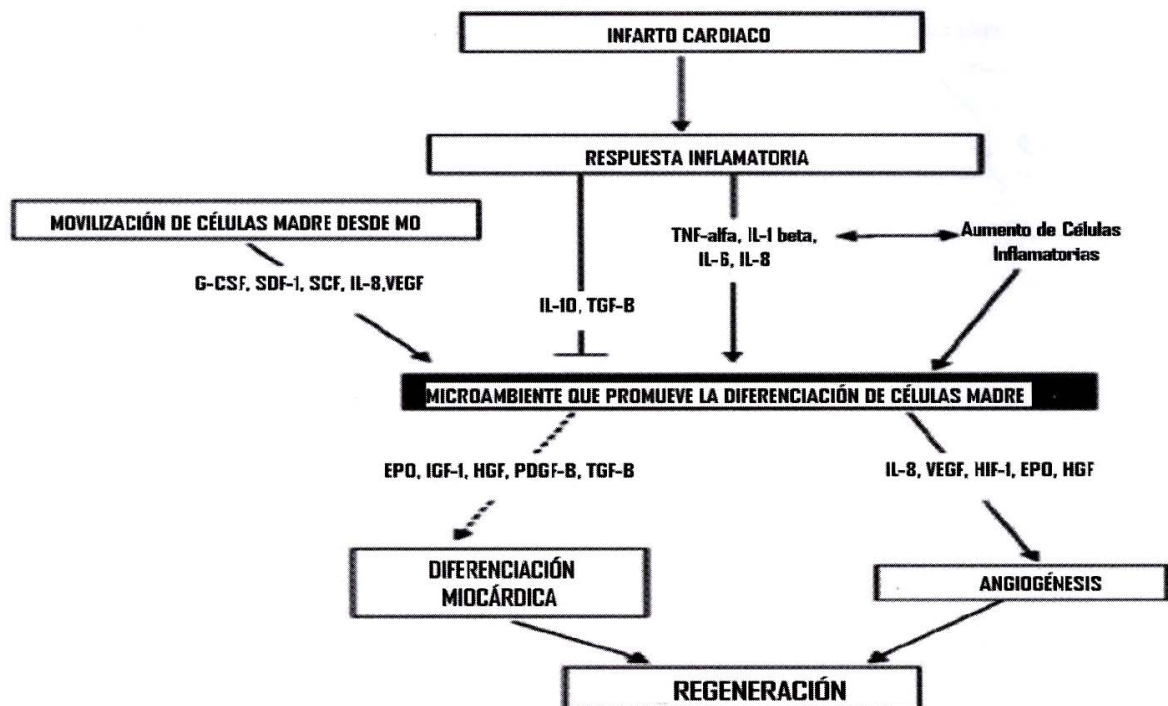


Figura 2. Respuesta inflamatoria que fomenta o inhibe la incorporación de las células madre al tejido cardíaco dañado. El balance entre estos factores promueve una regeneración cardíaca.⁴⁸

también se expresa el ARNm de dicho factor en otros tipos de células, tales como macrófagos activados. Además, el receptor de la eritropoyetina se encuentra también en el epicardio, pericardio, células endoteliales, células de músculo liso y cardiomiocitos. Fisiológicamente, esta hormona no sólo desempeña un papel fundamental en la eritropoyesis, sino también en el desarrollo cardíaco. Posee propiedades antiapoptóticas, promueve la proliferación de cardiomiocitos, estimula la neovascularización y tiene un potencial proliferativo y de movilización sobre células madre hematopoyéticas.^(48,49,18)

Células Madre Cardíacas Re-

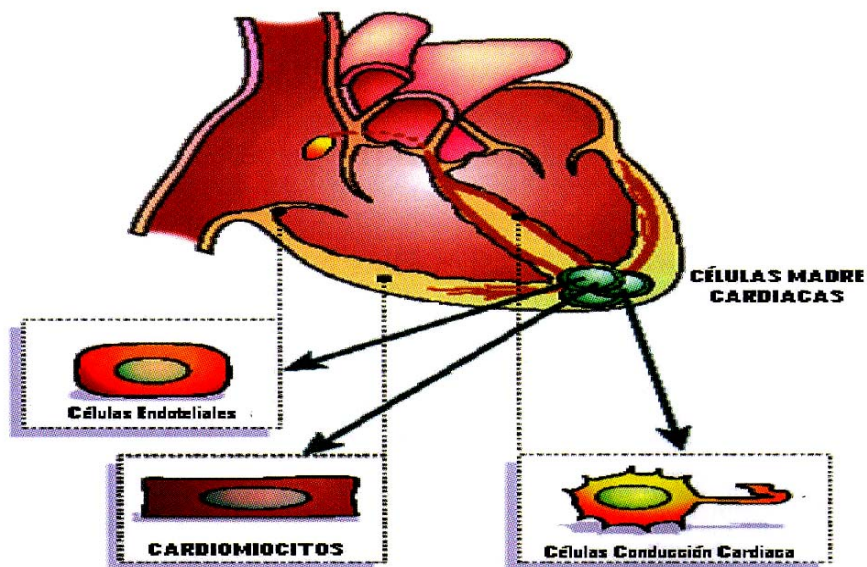


Figura 3. Células madre cardíacas residentes. Estas células tienen el potencial de transdiferenciarse en células endoteliales, células de músculo liso, células de conducción cardíaca y cardiomiocitos, expresando factores de transcripción que promueven o inactivan ciertos genes que desencadenan que las CMC puedan cumplir con tal misión.²⁶

sidentes: Su función en la homeostasia celular cardiaca y su potencial en la regeneración miocárdica

La visión del corazón como un órgano postmiótico ha cambiado en los últimos años a partir de la identificación del recambio de miocitos y de la presencia de células madre progenitoras residentes en el corazón adulto de mamíferos.(26) (figura 3).

Antes de estos hallazgos, el único potencial terapéutico para el corazón lesionado estaba basado en la preservación de los miocitos remanentes. No obstante, siempre se produce un remodelado adverso que deprime la función cardiaca. Se pensaba que la única forma de compensación ante la disminución de la masa cardiaca, era que los cardiomiocitos que sobrevivían al evento isquémico primario, respondieran con hipertrofia y no con hiperplasia. Por lo tanto, el tejido cardiaco muerto era reemplazado por tejido fibrótico, el cual no posee capacidades contráctiles y contribuye de esta forma, a la disminución de la función cardiaca.

La idea de que existían células madre cardiacas (CMC) en humanos, se fundamentó inicialmente en la presencia de nuevos cardiomiocitos en corazones transplantados mujer, en receptores hombres y los corazones de pacientes con estenosis aórtica.(26,6,36) Estudios han demostrado que existen alrededor de 4000 CMC por gra-

mo de tejido cardiaco y en la mayoría de estos, el aislamiento se basa en la ausencia de receptores para cardiocitos, músculo liso o marcadores endoteliales, y en la presencia de marcadores de células primitivas. Ejemplos incluyen células que expresan el c-kit, el antígeno de células madre (Sca1) (pero no el c-kit), o células que expresan la proteína de transporte de tipo ABC, denominada Abcg2, las cuales presentan concentraciones bajas en el c-kit y son Sca-1+. Gracias a este transportador de membrana, estas células, al administrárseles el marcador denominado Hoechst 33342, lo excluyen, es decir, lo transportan desde el espacio intracelular al extracelular, por lo que ante una citometría de flujo, se ubican en la periferia, por lo que a estas células madre se les ha llamado "poblaciones de al lado". Beltrami et al.(6) fueron los primeros en aislar células c-kit + del miocardio adulto de ratas. Análisis histológicos demostraron que estas células se encontraban distribuidas en pequeñas islas, en el intersticio entre los cardiocitos a través del miocardio ventricular y atrial, con una densidad mayor en la base y ápex cardiaco. Estas CMC mostraron características de autorrenovación, clonogenicidad y multipotencialidad, y dan origen a los tres diferentes fenotipos cardiacos, es decir, cardiomiocitos, células endoteliales y células de músculo liso y después de la inyección directa regeneraron miocardio en

corazones de rata. Entre las CMC más recientemente identificadas se encuentran las que expresan el marcador islet-1 (isl-1). Durante el desarrollo, las células isl-1+ contribuyen a la formación del tracto de salida de los ventrículos y atrios. Laugwitz et al.(25) demostraron que una población de células isl-1+ persisten en los corazones neonatales, con la expresión de factores de transcripción cardiacos, tales como el Nkx2.5 y el GATA4, pero no el Sca-1, CD31 o el c-kit. Todas estas células en teoría mantienen la homeostasia cardiaca, y restablecen día con día los miocitos que mueren por apoptosis o eventos isquémicos. No obstante, la cantidad de las CMC con respecto a la cantidad de células que mueren por infartos cardiacos son pocas y dicho potencial regenerativo, por lo tanto, se encuentra en desventaja numérica. Sin embargo, estas CMC presentan receptores para diversas citoquinas, tales como el HGF y el factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF, por sus siglas en inglés), que al administrárseles en cultivo, fomenta la sobrevivencia, proliferación y diferenciación. Además, la activación de c-met y del IGER (receptores para el HGF y el IGF, respectivamente) en estas células primitivas, resultan en la inducción de un grupo de integrinas que podrían estar involucradas en la activación, movilización y crecimiento de las CMC, y eventualmente podrían ser un arma terapéutica.(33). Otro aspecto en el

cual se han involucrado las CMC es en la patogénesis de la disminución de la capacidad regenerativa de corazón con la vejez. Las CMC podrían estar disminuidas en un corazón desgastado por los años, debido a que probablemente este miocardio ya ha utilizado gran parte del reservorio de células madre residentes en este tejido y por lo tanto, durante la vejez no existe un recambio adecuado con el empeoramiento día con día al sustituirse cardiocitos que mueren por apoptosis por tejido fibroso. Por otra parte, se ha observado mediante biopsias del tejido endocárdico en pacientes ancianos con cardiopatías, que existen CMC que expresan una proteína denominada p161NK4a, que se vincula a una especie de senescencia de las cé-

lulas muerte, que incluso lleva a la muerte por apoptosis o necrosis a dichas células.(47) Por lo tanto, el descubrimiento de estas CMC representa un nuevo potencial terapéutico; tanto como un tratamiento único o como coadyuvante a la administración de células madre adultas.

C ONCLUSIÓN

Desde hace aproximadamente seis años existe una gran controversia e interés científico en el área relacionada con la terapia celular en las enfermedades cardiovasculares. Dicho interés radica en la magnitud de las patologías cardiovasculares alrededor del mundo, encontrándose como la primera causa de

morbimortalidad en los países industrializados; y lo cual se espera que incrementemente conforme mejoren los tratamientos de rescate en el infarto agudo de miocardio y por lo tanto, sobrevivan más pacientes con riesgo de desarrollar insuficiencia cardíaca. El descubrimiento de células madre cardíacas residentes también ha cambiado la idea del corazón como un órgano postmitótico y el conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares sobre el desarrollo e inducción de estas células residentes o de células madre exógenas hacia nuevos cardiomiocitos presenta un gran interés científico, ya que se convierten en la base para poder perfeccionar esta innovadora y prometedora terapéutica.