

# Médula ósea autóloga vía seno coronario y angiogénesis en cerdos con injuria miocárdica

JOSE H. VICARIO\*, JULIO PIVA#, ANGEL PIERINI†, CESAR CAMPOS‡, ANA M. CANALS§, HUGO ORTEGA§, HERNAN PFEIFFER\*\*, LUIS GERARDO##, IVAN FENDRICH\*\*, RAFAEL NOVERO##

\* Clínica Médica, Hospital "J. B. Iturraspe".

# Anatomía Patológica, Hospital "J. B. Iturraspe".

† Cirugía, Hospital "J. B. Iturraspe".

‡ Hematología, Hospital "J. B. Iturraspe".

§ Facultad de Ciencias Veterinarias, UNL.

\*\* Hospital "J. B. Iturraspe".

## Sanatorio Garay.

Dirección postal: José H. Vicario. Av. 7 Jefes 4299.

e-mail: [josevicario@hotmail.com](mailto:josevicario@hotmail.com)

Recibido: Septiembre de 2000.

Aceptado: Octubre de 2000.

### Summary

Se realizó un estudio controlado en cerdos con injuria miocárdica con dos objetivos: 1) factibilidad de inducir angiogénesis con médula ósea autóloga fresca; 2) administración de la misma vía seno coronario con oclusión transitoria. Se utilizó un diseño animal con 3 fases tanto en el grupo estudio (médula ósea) como en el grupo control (suero fisiológico). Se realizó estudio histopatológico e inmunohistoquímico con marcadores de anticuerpo monoclonal anti alfa actina tanto en el grupo de estudio como en el grupo control. La angiogénesis fue observada en un 91% en el grupo estudio y en un 0% en el grupo control. El recuento de áreas actina positiva mostró diferencias estadísticamente significativas en ambos grupos. Se observaron células inmaduras mononucleares en el miocardio en un 25% del grupo estudio y en un 0% del grupo control. En conclusión, la médula ósea autóloga en miocardio con injuria experimental induce la angiogénesis y la formación de vasos con músculo liso en sus paredes. El seno coronario con oclusión transitoria es una vía efectiva para administrar las células de la médula ósea.

Rev Fed Arg Cardiol 2002; 31: 441-449

La importancia del desarrollo de circulación co-lateral es un concepto que fue reconocido hace muchos años. Varios fueron los intentos, tanto clínicos como experimentales, para incrementar el desarrollo de circulación colateral.

Así, en una etapa inicial, *pre angiogénesis*, se intentó establecer en forma quirúrgica conexiones extracardíacas con las arterias coronarias. Estas técnicas fueron: obliteración del saco pericárdico con abrasión mecánica y administración de polvo de asbesto [1], colocación de peritoneo sobre el miocardio isquémico [2,3], resección del pericardio [4] o la combinación de estos con implante de la arteria mamaria en el miocardio [5]. También se intentaron estrategias farmacológicas, tanto clínica como experimentalmente [6,7]. La respuesta angiogénica que se obtuvo con estas técnicas no fue lo suficientemente potente para obtener una mejoría clínica adecuada.

Durante las décadas del '70 y '80 se identificaron y purificaron factores que estimulan la angiogénesis. Así, se purificó el VEGF (factor de crecimiento vascular endotelial) [8-11], el bFGF (factor de crecimiento del fibroblasto básico), el FGF2 y el ácido FGF (aFGF o FGF1) [12-14].

Numerosos estudios en animales han demostrado la factibilidad de incrementar la circulación colateral con la administración de estos factores angiogénicos en el miocardio isquémico [15]. La aplicación clínica de esta modalidad de tratamiento se basa en el hecho de que la cardiopatía isquémica continúa siendo la causa principal de morbilidad y mortalidad en el mundo occidental. En 1990 causó alrededor de 6,3 millones de muertes en todo el mundo [16]. En nuestro país es la primera causa de mortalidad [17] con una incidencia aproximada del 30%, que se mantiene más o menos estable desde 1980.

Los avances en el tratamiento de la enfermedad coronaria fueron considerables: drogas altamente efectivas, prevención con modificación agresiva de los factores de riesgo, angioplastia coronaria que restablece el flujo coronario en arterias obstruidas y revascularización quirúrgica con bypass coronario. A pesar de todo hay pacientes considerados como de "no opción", ya que no son candidatos para angioplastia y/o cirugía por no tener lechos distales adecuados. Por otro lado, entre el 20% y el 30% de los pacientes sometidos a intervención coronaria con angioplastia o cirugía tiene una revascularización incompleta.

Los pacientes de "no opción", a pesar de estar máximamente tratados, persisten sintomáticos y con isquemia. Este grupo está constituido por entre el 5% y el 15% de los pacientes sometidos a cinecoronariografía [18]. En estos pacientes [19] la administración de factores de crecimiento que estimulan la neoformación vascular [20-22] o de los genes que los expresan aparece como una alternativa nueva y promisoría. Esta modalidad de tratamiento se denomina angiogénesis terapéutica y ha despertado un enorme interés en la comunidad médica internacional por lo alentador de sus resultados [19,23,24].

La importancia del tema nos motivó a realizar un estudio anatomopatológico e inmunohistoquímico en el miocardio de cerdos con injuria. El objetivo fue determinar la factibilidad de producir angiogénesis con médula ósea autóloga, administrada por vía seno coronario con oclusión transitoria.

## **MATERIAL Y METODO**

Se realizó una investigación no randomizada controlada en cerdos con injuria miocárdica y estudio anatomopatológico e inmunohistoquímico, que evaluó la factibilidad de médula ósea autóloga para inducir angiogénesis, siendo la ruta de administración el seno coronario con oclusión transitoria.

### **Diseño del estudio**

El estudio constó de tres fases que se detallan a continuación.

*Fase 1.* Realización de coronariografía y provocación de lesión coronaria con Cutting balón. Recuperación animal y control durante 2 semanas.

*Fase 2.* Obtención de médula ósea autóloga y administración de la misma vía seno coronario con oclusión transitoria. Recuperación animal y control durante 2 semanas.

*Fase 3.* Coronariografía de control, ablación cardíaca y estudio anatomopatológico.

### **Manejo animal**

El estudio fue realizado con el permiso del Comité de Docencia e Investigación del Hospital Iturraspe y conforme con la *Guía para el uso y cuidado de animales de laboratorio* publicada por el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH Publication N° 85-23, revised 1996).

En todas las fases del estudio se realizó un control continuo de electrocardiograma y presión intraaórtica con TEP (Biolab).

El manejo anestésico incluyó ayuno por 12 horas previas, atropina con una dosis de 0,045 mg/kg IM 10 a 20 minutos antes del procedimiento conjuntamente con ketamina a una dosis de 19,9 mg/Kg IM y dosis adicionales de la mitad o un tercio de la dosis inicial según necesidad. De ser necesario se utilizó fenobarbital, midazolán y lidocaína EV. En todas las fases se administraron antibióticos (cefalotina y gentamina) de acuerdo con el peso. La recuperación y los cuidados de las fases 1 y 2 fueron realizados con control veterinario estricto. Durante el procedimiento se realizó anticoagulación con heparina a una dosis de 100 U/Kg. En la fase 3 se realizó ablación cardíaca con administración de cloruro de potasio EV a una dosis de 40 a 60 mEq, induciendo fibrilación ventricular.

El tratamiento endovascular fue realizado bajo condiciones estériles, con el animal en decúbito dorsal, fijándole las cuatro patas a la mesa por medio de ligaduras y protegiendo los puntos de contacto con acolchados para evitar lesiones por decúbito. La desinfección del campo se realizó con iodopovidona y se colocaron campos estériles. Se realizó anestesia local con lidocaína al 2%. Para realizar la coronariografía se hizo una incisión en el muslo derecho, paralela al pliegue inguinal y dos traveses de dedo hacia distal; disección del celular hasta la aponeurosis y apertura de la misma; divulsión roma entre el músculo abductor y el semitendinoso hasta la arteria femoral circunfleja media [30] y disección de la misma; reparo por clampeo y luego arteriotomía e introducción de guía 0,035" e introductor 6F. El estudio coronariográfico se obtuvo con arco C portátil 100 MA con registros de imágenes en video y formato digital. Se utilizó catéter Judking 3,0 y/o Amplatz derecho 1 o 2. Se realizaron diferentes proyecciones en oblicua anterior derecha e izquierda, tanto de la coronaria derecha como de la izquierda. En la Fase 1, para inducir lesión coronaria, se cateterizó la coronaria y se introdujo una guía 0,014" hasta la porción distal de la arteria coronaria y un catéter Cutting balón IVT Europe 3 dis, que presenta la característica de poseer cuchillas que dañan y cortan el endotelio. Se realizaron 6 insuflados a 8-10 at., durante 60 seg cada uno. Una vez finalizado, se ligó la arteria femoral circunfleja media y se realizó el cierre por planos con material reabsorbible catgut crónico 2-0.

En la Fase 2 se obtuvo médula ósea en condiciones estériles con técnica de aspiración con agujas de punción (RVA) en la cresta ilíaca superior y posterior. Se obtuvieron entre 6 cm<sup>3</sup> y 10 cm<sup>3</sup> de médula ósea anticoagulada (D:50 U/cm<sup>3</sup> de médula), realizándose extendidos con tinción para comprobar la celularidad correspondiente sin calcular la celularidad total del producto. Una vez obtenida la médula ósea se colocó al animal en decúbito dorsal y se realizó incisión transversa cervical dos traveses de dedo hacia cefálico del manubrio esternal; disección de vena yugular interna y canalización de la misma con Swan Ganz 7F; cateterización del seno coronario y oclusión del retorno venoso con inflado del balón. Se administraron 6 cm<sup>3</sup> de médula ósea heparinizada durante 10 minutos y se restableció el flujo venoso coronario con desinflado del balón. Se realizó ligadura de la vena yugular y cierre por planos con catgut crónico 2-0.

En la Fase 3 se realizó coronariografía para determinar la circulación coronaria y la presencia de vasos colaterales, abordando la arteria femoral circunfleja media del lado izquierdo y la vena yugular izquierda por donde se administró cloruro de potasio para sacrificio del animal. Se realizó esternotomía con sierra de Gigli y ablación cardíaca para estudio anatomopatológico.

### **Estudio en vivo**

Se utilizaron 25 cerdos Yorkshire con un peso promedio de 23 Kg (15 Kg  $\pm$  35 Kg), de los cuales 7 fueron excluidos por no completar las tres fases del estudio (mortalidad por infarto, infección y disección aórtica).

Dos de los 18 restantes integraron un grupo de metodología para estudio anatomopatológico e inmunohistoquímico normal. De los 16 restantes, 12 integraron el grupo estudio (GE) y completaron las 3 fases del estudio, administrándose en forma retrógrada médula ósea autóloga. Los 4 restantes formaron parte del grupo control (GC) y completaron las 3 fases pero se les administró suero fisiológico en la misma cantidad y tiempo de administración que al GE.

### **Evaluación de circulación coronaria por angiografía**

Se realizaron inyecciones coronarias prolongadas y largas para detectar conexiones entre troncos principales y ramas. En presencia de circulación colateral se evaluó la misma usando el *score* semicuantitativo de Rentrop [47].

### **Estudio histopatológico**

Los corazones fueron fijados en formol al 10%. Se realizaron 5 cortes, comenzando desde el ápex y cada 1,5 cm. Se estudiaron macroscópicamente los cambios de color y/o forma en cada corte. Se tomaron muestras, especialmente de áreas 3 y 4 con o sin evidencia de cambios macroscópicos. Estas muestras fueron deshidratadas en alcoholes, clarificadas en xilol e incluidas en parafina. Se realizaron cortes seriados con micrótopo MINOT de 5 micras y se tiñeron con hematoxilina-eosina para su estudio morfológico.

### **Análisis morfológico**

Se consideraron los siguientes parámetros:

1. Lesiones de los cardiomiocitos (LC). Fueron divididas en tres grados: severas, con necrosis y distorsión de fibras (+++); moderadas, con tumefacción y distorsión sin necrosis (++); leves, con cambios mínimos (+).
2. Edema (E).
3. Dilatación de capilares y de vénulas postcapilares (DC y DVPC).
4. Células mononucleares (CM).
5. Células hematopoyéticas (CH).
6. Fibroblastos y fibras colágenas (F y FC).
7. Cardiomiocitos vacuolados (CV).
8. Angiogénesis (A). Se consideró el aumento en el número de capilares y/o la presencia de dilatación de los mismos, con o sin dilatación de vénulas postcapilares (diámetro de 20-100 micras) (Figura 1). El edema es considerado como un signo indirecto de angiogénesis.

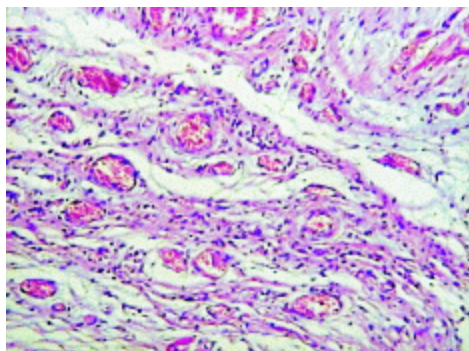


Figura 1. Angiogénesis exuberante proliferación vascular (x10).

### Inmunohistoquímica

En todos los cerdos estudiados se compararon las áreas afectadas con las áreas de control. Los cortes histológicos fueron montados en portaobjetos pretratados con 3-aminopropyltriethoxysilane (Nº A-3648 Sigma).

Se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-alfa-actina de músculo liso (clon-alfa-sm1) (de Laboratorios Novocastra (Cat. NCL-SMA) a una dilución 1: 50. Se reveló su localización a través de un anticuerpo secundario biotinilado y el complejo estreptoavidina-peroxidasa Histotain-SP (Peroxidase) Bulk Kits (Mouse)-Zymed CAT. Nº 85-6643B, utilizando 3,3 diaminobencidina (Liquid DAB-Plus Substrate Kit Zymed CAT Nº 00-2020) como cromógeno.

La alfa-actina de músculo liso es una proteína específica de músculo liso que forma dímeros que se pueden unir a la actina. Ha sido descrita en las células musculares lisas de los vasos sanguíneos, que poseen capas de músculo liso (Figura 2).

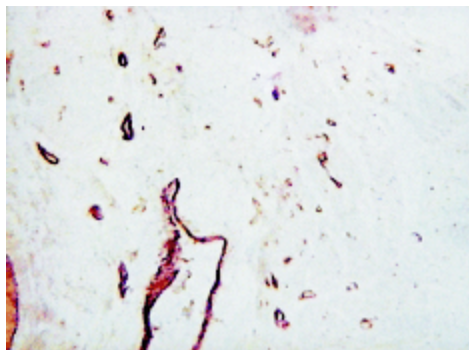


Figura 2. Angiogénesis actina positiva (x10).

En los controles negativos se reemplazó el anticuerpo primario por suero normal de la misma especie. Como controles positivos se utilizaron secciones de intestino cuyos resultados se compararon con los citados en la bibliografía.

### **Análisis de imágenes**

El análisis digital de imágenes fue efectuado utilizando el sistema Image Pro-Plus 4.1.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MA, USA) conectado a una PC Pentium III Intel. Las imágenes fueron generadas a través de una videocámara Sony Exwave HAD conectada a un microscopio Olympus CH2 con fuente de energía estabilizada. Se utilizaron lentes objetivas planocromáticas de 4, 10, 40 y 100 aumentos.

El microscopio fue calibrado para lograr una iluminación de tipo Koehler; una imagen de un campo vacío fue utilizada para calibrar la iluminación. Las imágenes se almacenaron en formato *TIFF* con una resolución de 640 x 480 pixels de tamaño y 32 bits de colores.

De acuerdo con cada aumento utilizado se obtuvieron las siguientes magnificaciones finales:

<i>Objetivo</i>	<i>Cada pixel de la imagen corresponde a:</i>	<i>Cada imagen representa un área de:</i>
x4	2,68 $\mu\text{m}$	2,2 $\text{mm}^2$
x10	1,04 $\mu\text{m}$	0,33 $\text{mm}^2$
x40	0,26 $\mu\text{m}$	0,02 $\text{mm}^2$
x100	0,10 $\mu\text{m}$	0,033 $\text{mm}^2$

La evaluación de las áreas inmunomarcadas se efectuó mediante un análisis de segmentación de colores en los tonos e intensidades correspondientes a las áreas de reactividad del cromógeno utilizado, concordante con lo observado en los controles positivos. Para cada una de las áreas se analizaron 20 campos.

### **Análisis estadístico**

Las inferencias estadísticas fueron realizadas mediante el test de t de Student para muestras apareadas, utilizando el *software* SPSS 10.1.

## **RESULTADOS**

Durante el estudio, la frecuencia cardíaca promedio fue de 130 ( $\pm 20$ ) y la presión intraaórtica de 130 mmHg ( $\pm 30$ ). Las mismas no variaron en forma significativa en la Fase 2 del estudio (oclusión transitoria del seno coronario) y no se observaron arritmias que requirieran tratamiento.

En la Fase 1 del estudio se observaron cambios del ST y de la onda T en el electrocardiograma basal, tanto en el GE como en el GC. Estos cambios fueron transitorios y se normalizaron con el desinflado del balón; en el GE se observó infradesnivel ST en 9/12 y supradesnivel en 3/12.

Se logró producir injuria miocárdica en todos los cerdos del GE y del GC, no observándose diferencias entre la circunfleja, la coronaria derecha y la interventricular paraconal, que es equivalente a la descendente anterior en el hombre.

De los hallazgos macroscópicos observados, lo común a los dos grupos fue la presencia de áreas pálidas, blanquecinas, irregulares, con petequias y rodeadas de zonas congestivas en los bordes, siendo de localización intramiocárdica, excepto en uno que se observó en el subendocardio. Un cerdo del GE presentó hemopericardio.

Entre los cambios morfológicos observados en el GE (Tabla 1), la dilatación de capilares, venas postcapilares y angiogénesis estuvieron presentes en el 91% de los cerdos estudiados. En el GC (administración de suero fisiológico) no fueron observados en ninguno. El edema, si bien no se cuantificó, se observó con igual frecuencia (75%) en ambos grupos.

Tabla 1  
CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN EL GRUPO ESTUDIO

Cerdo Nº	LC	E	A	DC-DVPC	CH	CM	F-FC	CV
1	+++	Si	Si	Si	No	Si	Si	Si
2	+++	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si
3	++	Si	Si	Si	No	Si	No	Si
4	+++	No	Si	Si	No	Si	Si	Si
8	+++	No	Si	Si	Si	Si	Si	No
10	+	Si	Si	Si	No	Si	No	No
13	+++	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si
14	++	Si	Si	Si	No	No	No	No
18	+	No	No	No	No	No	No	No
17	+++	Si	Si	Si	No	Si	Si	Si
18	+++	Si	Si	Si	No	Si	Si	Si
20	++	Si	Si	Si	No	No	Si	No
12		5%	91%	91%	25%	5%	00%	58%

LC: grado lesión cardiomiocitos. E: edema. A: angiogénesis. DC-DVPC: dilatación capilar y venas postcapilar. CH: células hematopoyéticas. CM: células mononucleares. F-FC: fibroblastos y fibras colágenas. CV: cardiomiocitos vacuolados.

La presencia de otras células, como fibroblastos, fibras colágenas, células mononucleares y cardiomiocitos vacuolados, se relacionó con el grado de lesión ya que fueron observadas con mayor frecuencia en injuria grado +++.

Las células con macronúcleo redondo y citoplasma amplio fueron consideradas como células inmaduras (hematopoyéticas) y estuvieron presentes en el 25% de los cerdos del GE (Figura 3). No fueron observadas en ninguno de los especímenes del GC.

El estudio histoquímico identifica músculo liso y su presencia en el miocardio indicaría un origen vascular (arteriolar o venoso) o miofibroblástico como parte del proceso de reparación celular. En cada cerdo estudiado, tanto del GE como del GC, se determinó la presencia del mismo con anticuerpo monoclonal anti-alfa-actina y se realizó en áreas afectadas y en áreas de control.

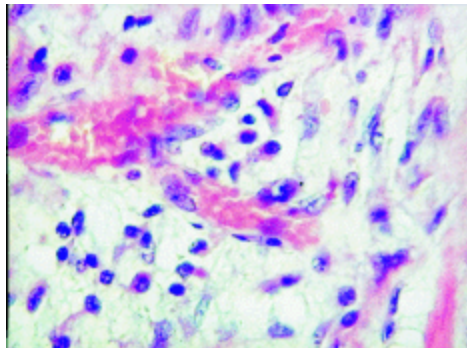


Figura 3. Células mononucleares de característica inmadura (x40).

Las áreas actina positivas fueron cuantificadas en ambos grupos. En el GE (Tabla 2), el recuento de áreas actina positivas del área afectada versus el área de control fue estadísticamente significativo (1,37 vs 0,79). Si bien el análisis fue realizado en 11 cerdos del GE, en 4 no se observaron diferencias entre el área afectada y el área de control. En estos últimos, el grado de injuria celular fue de grado leve (+) y moderado (++). En el GC no se observaron diferencias significativas en el recuento actina positivas entre áreas afectadas y áreas de control (0,47 vs 0,51). En el análisis arteriográfico, tanto del GE como del GC, no se observó incremento en la circulación colateral.

Tabla 2  
INMUNOHISTOQUIMICA EN EL GRUPO ESTUDIO

Cerdo Nº	Area afectada	Area control	
1	1,39	0,87	
2	1,9	0,74	<b>x &lt; 0,05</b>
3	0,88	0,93	
4	1,12	0,78	
8	2,11	0,89	<b>x &lt; 0,01</b>
13	1,70	0,81	<b>x &lt; 0,01</b>
14	0,75	0,79	
18	0,75	0,80	
17	1,86	0,70	<b>x &lt; 0,01</b>
18	2,02	0,71	<b>x &lt; 0,01</b>
20	0,84	0,83	
11	1,37	0,79	

## DISCUSION

En esta investigación evaluamos al seno coronario ocluido transitoriamente como ruta de administración de factores angiogénicos, y la habilidad que tienen ciertas células naturales, como la médula ósea autóloga, de segregar factores que induzcan neoformación vascular (angiogénesis y/o arteriogénesis) en un modelo animal con injuria.

En la actualidad no se sabe cuál es la ruta de administración más segura y efectiva para producir una respuesta angiogénica en el miocardio isquémico. Cada ruta de administración publicada tiene su ventaja y su desventaja.

Así, la *intracoronaria* es de fácil administración pero no posibilita la administración prolongada. Posee riesgos potenciales de acelerar neoplasias ocultas o retinopatía y, desde el punto de vista cardíaco, exponer placas arterioescleróticas a los efectos mitogénicos de los factores de crecimiento que pueden acelerar el desarrollo de placas arterioescleróticas, induciendo inestabilidad de la misma, como ha sido demostrado en varios estudios [28-30].

La ruta *intrapericárdica* [31-33] tiene la ventaja teórica de usar la función de reservorio del pericardio y permite una exposición prolongada de drogas al miocardio. Si bien hay estudios que han demostrado eficacia con la administración de aFGF [34], otros no han demostrado beneficio [35]. El problema, desde el punto de vista práctico, es la factibilidad de realizarla en pacientes con múltiple instrumentación previa, incluyendo *bypass* coronario.

La inyección *intramiocárdica directa* tiene la ventaja de ser administrada directamente en el tejido isquémico; sería la ruta ideal para administrar material genético en el sitio adecuado [36]. Hay experiencia clínica combinada con *bypass* coronario, con resultados preliminares que demuestran seguridad y factibilidad de incrementar el flujo colateral [37]. Tiene limitaciones en el volumen a administrar y es invasiva con riesgo (en pacientes de alto riesgo), lo que se suma a su elevado costo.

La vía *endovenosa* no ha demostrado ser efectiva ya que no alcanza a producir una respuesta angiogénica adecuada. Los factores bFGF administrados por esta vía son consumidos o fijados, en su mayor parte, en el primer pasaje por el pulmón y el suministro de altas dosis se ve limitado por la hipotensión que producen [38-39].

Otras vías, como la perivascular y la intramiocárdica vía transendocárdica con catéter, también han sido analizadas [20].

Basados en el concepto de que el 60-70% del flujo coronario puede ser perfundido por vía retrógrada (seno coronario) y de que la cateterización del mismo no es compleja, utilizamos esta vía como ruta de administración de médula ósea.

Como se ha descrito en el ítem "*Manejo animal*", el seno coronario es ocluido durante 10 minutos, que fue el tiempo de administración de la médula ósea. Con esta técnica, la tolerancia hemodinámica (presión intraaórtica

y frecuencia cardíaca) y eléctrica (cambio ST o arritmias) fue excelente, sin modificación de los parámetros.

En el estudio histológico de los cerdos del GE fueron observadas células primitivas (hematopoyéticas) en el 25% de los especímenes, pudiéndose inferir que la vía seno coronario ocluida permite la liberación de las mismas en el área afectada.

Una vez restablecido el flujo del seno coronario, parte de la médula ósea se hace sistémica. En nuestro protocolo establecimos 10 minutos de oclusión; tal vez sea necesario un tiempo de oclusión mayor. Esta vía limitaría la administración de otros factores de crecimiento por su circulación sistémica y su fijación de los mismos en el primer pasaje por el pulmón.

El otro objetivo de esta investigación fue determinar la factibilidad de la médula ósea autóloga para inducir angiogénesis y/o arteriogénesis en un modelo animal con injuria.

El mecanismo molecular responsable de la neoformación vascular es extraordinariamente complejo; múltiples genes deben coordinarse para expresar sus productos en una cantidad adecuada y en un tiempo adecuado.

Un interrogante que se plantea es si la administración de un factor único de angiogénesis es capaz de desarrollar vasos sanguíneos maduros y funcionales. Y otro, si la administración de múltiples factores es la estrategia adecuada, ¿en qué secuencia deben ser dados para obtener una respuesta adecuada?

Otra estrategia sería dar células o factores que atraigan células y que se expresen en múltiples factores de angiogénesis. La médula ósea constituye una forma de administrar múltiples factores celulares. Hay publicaciones que demuestran la capacidad de células de la médula ósea para incrementar el flujo colateral en el tejido isquémico. Células de médula ósea cultivadas producen factores angiogénicos, VEGF, MCP1 y bFGF, que en contacto con células endoteliales, en un medio condicionado, las hace proliferar, migrar y formar tubos. Así, hay publicaciones que muestran que la administración transmiocárdica de la misma en cerdos con isquemia produce una mejoría de la función ventricular y de la circulación colateral [40].

Nuestra hipótesis de trabajo fue utilizar parte del proceso natural para el desarrollo de angiogénesis/arteriogénesis con administración de médula ósea autóloga.

En el GE se produjo injuria miocárdica severa en el 58% de los cerdos estudiados y en el resto de menor grado, y angiogénesis se observó en el 91% de los cerdos; solamente en uno estuvo ausente y en éste el grado de lesión miocárdica producida fue de grado leve. En el GC (con administración de suero fisiológico en lugar de médula ósea) no se observó angiogénesis.

El edema estuvo presente en el 75% del GE y del GC, por lo cual consideramos que no es un buen parámetro o signo indirecto de angiogénesis, si bien no fue cuantificado.

Con el estudio histoquímico, el poder identificar músculo liso en el miocardio indicaría que su origen es vascular. Se realizó estudio histoquímico con marcadores de anticuerpo monoclonal anti-alfa-actina en el GE y en el GC. En cada cerdo se comparó el área afectada y el área de control; el músculo liso estuvo presente en forma estadísticamente significativa en el GE y no se observaron diferencias en el GC.

Se destaca que se observa una relación entre el grado de injuria y la histoquímica, ya que los porcinos del GE con resultado negativo tenían injuria de grado leve o moderado.

Por lo tanto, la administración de médula ósea autóloga vía seno coronario ocluido en forma transitoria produce neoformación vascular en un modelo animal con injuria.

La arteriografía en la Fase 3 del estudio no mostró incremento en la circulación colateral, ni aun con el uso de métodos detallados de evaluación. Esta discrepancia ha sido observada por otros autores [41,42] y se debe a que los cambios en el diámetro de los vasos son tan pequeños que no son observados angiográficamente, pero son biológicamente significativos para disminuir la resistencia del flujo colateral.

La sensibilidad de la angiografía para detectar pequeños cambios es insuficiente, aun como métodos angiográficos detallados como Gibson describe [43].

## CONCLUSIONES

### *1. Seno coronario como ruta de administración de células para inducir angiogénesis*

- a. La oclusión transitoria del seno coronario no produce cambios hemodinámicos, siendo tolerada aun en presencia de injuria miocárdica.
- b. Como ruta de administración es efectiva, ya que células de médula ósea fueron observadas en el miocardio con injuria.

### *2. Médula ósea autóloga fresca, en miocardio con injuria*

- a. Estimula la angiogénesis ya que fue observada en el 91% de los cerdos del GE y en el 0% del GC.
- b. Estimula la formación de vasos, con músculo liso en las paredes según se observó por diferencias estadísticas entre GE y GC.
- c. El edema, si bien no fue cuantificado, fue observado tanto en el GE como en el GC.
- d. La angiogénesis no se correlacionó con un incremento en la circulación colateral por arteriografía.

Se presenta evidencia de que aspirados frescos de médula ósea trasplantados en el miocardio vía seno coronario, en un modelo animal con injuria, producen angiogénesis.

Probablemente esta estrategia sería menos costosa e invasiva que la administración de otros factores angiogénicos actuales y, por otra parte, evitaría la toxicidad potencial, aunque remota, de estrategias basadas en genes usando virus.

Podemos concluir que la circulación colateral en las arterias coronarias es un proceso complejo, con múltiples niveles de estimulación, inhibición y modulación. Para que un único factor de crecimiento induzca una angiogénesis terapéutica, toda la cascada de proliferación, migración, quimostasis e inflamación, debe ser iniciada. Una forma de administrar múltiples factores de crecimiento es con médula ósea autóloga.

Es necesario confirmar nuestros hallazgos con estudios en animales con otras variaciones, como:

- 1) administrar médula ósea filtrada;
- 2) administrar células de médula ósea, como células *stem* cultivadas;
- 3) realizar la oclusión transitoria del seno coronario por un tiempo más prolongado para poder liberar las células.

## SUMMARY

### *TRANSCORONARY SINUS DELIVERY OF AUTOLOGOUS BONE MARROW IN PIG MODELS WITH MYOCARDIAL INJURY*

*Objective. Aim at studying myocardial injury on pig model with two objectives: 1) feasibility of stimulating angiogenesis with fresh autologous bone marrow; 2) administration of a fresh autologous bone marrow via coronary sinus with transitory occlusion.*

*Material and method. Animal model with three phases in study group (bone marrow) as well as in control group (saline). Histological and immunohistochemical study with markers of monoclonal antibody anti alpha actin were conducted on both, study and control group.*

*Results. The percentage of angiogenesis observed in the study group was 91% and in control group was 0%.*

*Counting of positive actin areas showed statistically significant differences in relation to both groups. The percentage of mononuclear immature cells observed in the myocardium in the study group was 25% and in the control group was 0%.*

*Conclusions. Autologous bone marrow in model with experimental myocardial injury enhances angiogenesis as well as vessels with smooth muscles. The transitory occlusion of the coronary sinus is an effective way to administer the cells of the bone marrow.*

## Agradecimientos

Agradecemos la colaboración y dedicación de Patricio Muro, Joaquín Avile, Estela Pedroza, Victoria Norman. Y al Director del Hospital Iturraspe Dr. Andrés Ellena, por su apoyo incondicional.

## Bibliografía

1. Beck CS: The development of a new blood supply to the heart by operation. *Ann Surg* 1935; 102: 801-806.
2. O'Shaughnessy: An experimental method of providing a collateral circulation to the heart. *Br J Surg* 1936; 23: 665-670.
3. Knock FE: Cardio-omental pexy and implantation of multiple loops for revascularization of the heart. *Surg Forum* 1958; 9: 230-235.
4. Harken DE, Black H, Dickson SF y col: De epicardialization. A simple, effective surgical treatment for angina pectoris. *Circulation* 1955; 12: 955-960.
5. Vineberg AM, Kato: Experimental revascularization of the entire heart. Evaluation of pericardiectomy, omental graft, and/or implantation of the internal mammary artery in preventing myocardial necrosis and death of the animal. *Am Heart J* 1996; 72: 79-93.
6. Unger EF, Sheffield CD, Epstein SE: Heparin promotes the formation of extracardiac to coronary anastomoses in a canine model. *Ann J Physiol* 1999; 260: H 1625-H 1634.
7. Unger EF, Banais: A model to assess interventions to improve collateral blood flow: continuous administration of agents into the left coronary artery in dogs. *Cardiovasc Res* 1993; 27: 785-791.
8. Dvorak HF, Orenstein NS: Induction of a fibrin-gel investment: an early event in line 10 hepatocarcinoma growth mediated by tumour secreted products. *J Immunol* 1979; 122: 166-174.
9. Senger DR, Galli SJ: Tumour cells secrete a vascular permeability factor, that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983; 219: 983-985.
10. Senger DR, Connolly D: Purification of a vascular permeability factor (VPF) from tumour cell conditioned medium. *Fed Pro* 1987; 46: 2102.
11. Connolly DT, Olander JV: Human vascular permeability factor. Isolation from V 937 cells. *J Biol Chem* 1989; 264: 20017-20024.
12. Esch F, Baird A: Primary structure of bovine pituitary basic fibroblast growth factor (FGF) and comparison with the amino-terminal sequence of bovine brain acidic FGF. *Proc Natl Aca Sci (USA)* 1985; 82: 6507-6511.
13. Gambarini AG, Armelin HA: Pituitary fibroblast growth factors partial purification and characterization. *Bez J Med Biol Res* 1981; 14: 19-27.
14. Baird A, Esch F: Retina and eye-derived endothelial cell growth factors: partial molecular characterization and identity with acidic and basic fibroblast growth factors. *Biochemistry* 1985; 24: 7855-7860.
15. Folkman J: Angiogenic therapy of the human heart. *Circulation* 1998; 97: 628-629.
16. Murray CSL, Lopez AD: Mortality by cause for eight regions of the world: global burden of disease study. *Lancet* 1997; 349: 1269-1276.
17. Las condiciones de salud en las Américas. Washington, OPS Publication Científica 1994; Vol II, pp 549.
18. Henry TD: Therapeutic angiogenesis. *Br Med J* 1999; 318: 1536-1539.
19. Simons M, Bonow RO: Clinical trial in coronary angiogenesis: issues, problems, consensus. An expert panel summary. *Circulation* 2000; 102: c73-c86.
20. Laham RS, Sellke FW: Local perivascular delivery of basic fibroblast growth factor in patients undergoing coronary bypass surgery. Results of a phase I randomized double blind, placebo-controlled trial. *Circulation* 1999; 100: 1861-1871.
21. Pecher P, Schumacher BA: Angiogenesis in ischemic human myocardium: clinical result after 3 years. *Ann Thorac Surg* 2000; 69: 1414-1419.
22. Henry Td, McKendall GR: VIVA trial: one year follow-up. *Circulation* 2000; 102: II 309 (Abstract 1516).
23. Capogrossi MC: Protocols on clinical research and therapeutical applications of angiogenic therapy. *Minerva Cardioangiol* 1999; 47: 380.
24. Pantely GA, Porter SM: Therapeutic angiogenesis: time for the next phase. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36: 1245-1247.
25. National Institutes of Health: Publication N° 85-23, revised 1985.
26. Robert Getty: Porcinos. Anatomía de los animales domésticos (5ª ed). Tomo II.
27. Rentrop KP, Cohen M, Blan K: Changes in collateral channel filling immediately after controlled coronary artery occlusion by an angioplasty balloon in human subjects. *J Am Coll Cardiol* 1985; 5: 587-592.
28. Nabel EG, Yang ZY, Plautz G: Recombinant fibroblast growth factor-1 promotes intimal hyperplasia and angiogenesis in arteries in vivo. *Nature* 1993; 362: 844-846.
29. Flugelman MY, Virmanik K, Correa R: 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* 1993; 88: 2493-2500.
30. Inoue M, Itoh H, Veda M: Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions: posible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis.
31. Landau C, Jacobs AK, Haudenschild CC: Intrapericardial basic fibroblast growth factor induces myocardial angiogenesis in a rabbit model of chronic ischemia. *Am Jeart J* 1995; 129: 924-931.
32. Vchida Y, Yamagisawa-Miwa A, Nakamura F: Angiogenic therapy of acute myocardial infarction by intrapericardial injection of basic fibroblast growth factor and heparin sulfate: an experimental study. *Am Heart J* 1995; 130: 1182-1188.
33. Laham RG, Hung D, Simons M: Therapeutic myocardial angiogenesis using percutaneous intrapericardial drug delivery. *Clin Cardiol* 1999; 22: I-6-I-9.
34. Lopez GG, Edelman ER, Stamler A: Angiogenic potential of perivascular delivered aFGF in a porcine model of chronic myocardial ischemia. *Am J Physiol* 1998; 274: H-930-H-936.
35. Shou M, Lazarous DF, Stiber G: The pericardium as a repository for an angiogenic growth factor: effect of intrapericardial basic fibroblast growth factor on myocardial collateral development (Abstract). *J Am Coll Cardiol* 1997; 29: 154 A.
36. Guzmán RG, Lemarchand P, Crystal RG: Efficient gene transfer into myocardium by direct injection of adenovirus vectors. *Circ Res* 1993; 73: 1202-1207.

37. Schumacher B, Pecher P, von Specht BV: Induction of neoangiogenesis in ischemic myocardium by human growth factors: first clinical results of a new treatment of coronary heart disease. *Circulation* 1998; 97: 645-650.
38. Thirumurti V, Shou M, Hodge E: Lack of efficacy of intravenous basic fibroblast growth factor in promoting myocardial angiogenesis (Abstract). *J Am Coll Cardiol* 1998; 31: 54A.
39. Yang R, Thomas GR, Bunting S: Effects of vascular endothelial growth factor on hemodynamics and cardiac performance. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996; 27: 838-844.
40. Fuchs S, Baffour R, Zhoy YF y col: Transendocardial delivery of autologous bone marrow enhances collateral perfusion and regional function in pigs with chronic experimental myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol* 2001 (in press).
41. Devlin GP, Fort S, Yu E y col: Effect of a single bolus of intracoronary basic fibroblast growth factor on perfusion in an ischemic porcine model. *Can J Cardiol* 1999; 15: 676-682.
42. Laughlin MH, Tomanek RG: Myocardial capillarity and maximal capillary diffusion capacity in exercise-trained dogs. *J Appl Physiol* 1987; 63: 1481-1486.
43. Gibson CM, Ryan K, Sparano A y col: Angiographic methods to assess human coronary angiogenesis. *Am Heart J* 1999; 137: 169-179.

[Tope](#) - [Volver al Sumario Analítico](#)