

## Inducción de nuevos cardiomiocitos en el corazón adulto: futuro de la regeneración miocárdica como alternativa al trasplante

Bernardo Nadal-Ginard

Department of Medicine. New York Medical College. Valhalla. Nueva York. EE.UU.

Conferencia Miguel Servet del XXXVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Cardiología

El concepto clásico que se ha mantenido a lo largo de muchos años sobre la incapacidad del corazón adulto para renovar sus células debe ser revisado a la vista de los resultados que se están obteniendo en diferentes modelos experimentales. La dilucidación de los mecanismos bioquímicos causantes de la respuesta hipertrófica ha puesto de manifiesto la similitud que existe entre los procesos implicados en la apoptosis y el crecimiento celular. En el desarrollo del corazón, desde el nacimiento hasta la edad adulta, existe un equilibrio entre los estímulos que promueven el crecimiento de los miocitos y los que pueden conducir a la muerte celular programada. En modelos experimentales se ha demostrado que, durante la vida adulta, algunas condiciones patológicas como la diabetes y la hipertensión pueden provocar un aumento drástico de la tasa de muerte celular. Además, los valores sorprendentemente elevados que se han obtenido al cuantificar la pérdida celular en ventrículos de ratones sanos, con una tendencia creciente a medida que el animal envejece, constituyen una prueba más a favor de la hipótesis de un recambio celular activo en el corazón adulto. A partir de experimentos realizados con fetos de ratones se ha podido comprender el mecanismo molecular en los cardiomiocitos inmaduros, que compaginan su capacidad de dividirse con un fenotipo diferenciado. Estas células se escapan del proceso de bloqueo en su ciclo celular porque no expresan la proteína del retinoblastoma, un antioncogén presente en las células adultas. La identificación y posterior aislamiento y cultivo de células madre procedentes del corazón adulto, que se encuentran en estado de latencia pero que pueden entrar en una fase de división rápida cuando se estimulan con factores de crecimiento, constituye una evidencia sólida de que el corazón se encuentra en un proceso continuo de crecimiento, muerte y renovación celular. El uso de estas células multipotentes, capaces de diferenciarse en cualquier tipo celular, y que pueden obtenerse a partir de corazón, médula ósea u otros tejidos, se presenta como una estrategia

terapéutica prometedora en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca o de la necrosis postisquémica.

**Palabras clave:** *Regeneración cardíaca. Hipertrofia. Cardiomiocito. Muerte celular. Apoptosis. Células madre.*

(*Rev Esp Cardiol* 2001; 54: 543-550)

### Generation of New Cardiomyocytes in the Adult Heart: Prospects of Myocardial Regeneration as an Alternative to Cardiac Transplantation

The classic dogma, still prevalent in cardiology, that the adult myocardium is a terminally differentiated tissue unable to produce new cardiomyocytes needs to be revised in light of recent results. In human and experimental animals there is now incontrovertible evidence that new myocytes are continuously generated throughout life in response to physiological and pathological stimuli. Moreover, the elucidation of mechanisms responsible for the hypertrophic response indicate similarity and overlap with the mechanisms involved in cell death by apoptosis as well as cell growth.

During cardiac development, from birth to adulthood, there is a balance between the stimuli induce cell growth –by hypertrophy and hyperplasia– on one hand and those that induce programmed cell death on the other. In human and experimental animals it has been well documented that pathological conditions, such as diabetes and hypertension, can increase dramatically the rate of cell death. Moreover, high rates of cell death have been measured in normal adult human hearts and those of mice and rats. No surprisingly, these values increase significantly with age and high in senescence. By themselves, these high rates of normal cell death provide a very compelling argument in favor of cardiomyocyte regeneration. Without cell renewal, these rates of cell death would be incompatible with survival because the heart would disappear before early adulthood. As expected, direct measurement of rates of new cell formation in adult hearts demonstrate high rates of cell renewal that compensate for cell death. Thus, the heart is in continuous cellular turnover with new myocardial cells replacing the older ones.

Correspondencia: Dr. B. Nadal-Ginard.  
Department of Medicine.  
Vosburgh Pavilion-Room 302.  
New York Medical College.  
Valhalla. New York NY 10595. EE.UU.  
Correo electrónico: bnadalg@thecia.net

Experiments with fetal mouse cardiocytes shows that the retinoblastoma protein is responsible for the cardiocyte withdrawal from the cell cycle during development. The identification in the adult heart of a subpopulation of quiescent cells that have many of the characteristics of stem cells able to rapidly enter the cell cycle and generate new cardiocytes is yet another evidence that the heart continuously produces new cardiocytes to replace those that disappear either by apoptosis or necrosis.

Surprisingly, stem cells other than those from the heart are able to produce new cardiocytes and repopulate the myocardium. We have used bone marrow stem cells injected into the border zone of post-coronary occlusion necrosis. Remarkably, these cells have proven to be very effective in generating new myocardium in the necrotic zone that is integrated to the rest of the muscle and irrigated by new vessels. These results demonstrate that stem cells provide a new avenue for the generation of new contractile tissue. This approach could prove useful in the treatment of chronic cardiac failure and post-ischemic necrosis.

**Key words:** *Cardiac regeneration. Hypertrophy. Cardiomyocyte. Cell death. Apoptosis. Stem cells.*

(*Rev Esp Cardiol* 2001; 54: 543-550)

## INTRODUCCIÓN

La posibilidad de inducir el desarrollo de cardiomiocitos en el corazón adulto se ha considerado una estrategia prometedora en el tratamiento de enfermedades como la insuficiencia cardíaca, la hipertrofia o la cardiopatía isquémica<sup>1</sup>. Sin embargo, las características específicas de las células cardíacas, y la idea que se ha mantenido a lo largo de muchos años sobre su incapacidad para entrar en el ciclo celular y dividirse de forma activa, han hecho que este enfoque haya sido descartado.

Los cardiomiocitos se generan a partir de un precursor celular que se divide y da lugar a grupos de células del mismo tipo. Durante la vida fetal, estas células empiezan a diferenciarse y aparecen en su citoplasma las miofibrillas contráctiles. Estos cardiomiocitos fetales contráctiles conservan todavía la capacidad de dividirse a pesar de encontrarse en un estado diferenciado y, en el caso de los seres humanos, esta capacidad se mantiene hasta los 3-4 meses de vida posnatal<sup>2</sup>. En general, se supone que a los pocos meses del nacimiento ya poseemos el número máximo de miocitos cardíacos que podemos llegar a tener, y que a partir de este momento las células que se pierdan ya no van a poder ser reemplazadas, lo que conduce a una disminución progresiva de su número hasta la muerte. Éste es el modelo de crecimiento que se ha considerado válido para las células musculares cardíacas y para las neuronas del sistema nervioso central. Por el contrario, el resto de las células del organismo conservan la capacidad de dividirse después de haber alcanzado un estado esta-

cionario diferenciado. En nuestra opinión este concepto del corazón como órgano no regenerativo está basado en observaciones superficiales y no está de acuerdo con los datos recientemente obtenidos en animales experimentales y en humanos. Estos resultados demuestran que el corazón es un órgano en regeneración continua que aumenta la producción de nuevas células musculares en respuesta a diferentes estímulos fisiológicos y patológicos<sup>3,4</sup>. Esta capacidad regenerativa ofrece nuevas oportunidades para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca.

## FACTORES BIOQUÍMICOS IMPLICADOS EN LA RESPUESTA CELULAR HIPERTRÓFICA

Cuando el miocardio requiere un aumento en su capacidad contráctil puede satisfacer esta demanda incrementando el número de sarcómeros en las células existentes (hipertrofia), produciendo nuevos cardiocitos (hiperplasia) o una combinación de estos dos mecanismos. Los estímulos para que se produzca un crecimiento celular en forma hipertrófica o hiperplásica están muy relacionados. La hipertrofia es un aumento del tamaño celular y es responsable de la mayor parte del crecimiento normal del corazón durante el desarrollo de un individuo. Se puede presentar de forma fisiológica por la práctica de ejercicio o en respuesta a una hipertensión arterial leve. Esta hipertrofia normal compensada puede llegar a descompensarse y conducir a una insuficiencia cardíaca. El estímulo que provoca este crecimiento hipertrófico es el aumento de la tensión de la membrana celular, es decir, el estiramiento mecánico de su pared lo que, a su vez, desencadena una serie de respuestas bioquímicas.

Cuando hay un incremento de la tensión de la pared celular, lo que puede tener lugar incluso durante el ejercicio extremo en un individuo normal, se induce la expresión de una batería de genes capaces de responder muy rápidamente, los protooncogenes<sup>5</sup>, la mayoría de los cuales pertenecen a una familia de genes cuyos productos son factores de la transcripción que, a su vez, estimulan la transcripción de genes de la contracción. Todo este proceso conduce al crecimiento celular y a la hipertrofia cardíaca<sup>5</sup>. Es importante hacer hincapié en el hecho de que durante la respuesta hipertrófica se produce un cambio cualitativo en el patrón de expresión génica de la célula. Si el estímulo mecánico sobre la pared celular se incrementa aún más, la contractilidad disminuye y se produce una alteración del metabolismo del calcio, que acaba por inducir la muerte celular. En la figura 1 se presenta un esquema de los factores bioquímicos implicados en la respuesta adaptativa que se desencadena durante la hipertrofia y que pueden conducir al desarrollo de una insuficiencia cardíaca.

La conexión bioquímica para trasladar el mensaje desde la membrana al núcleo celular la efectúa la an-



**Fig. 1.** Esquema de la respuesta bioquímica que se desencadena durante el desarrollo de la hipertrofia cardíaca. El aumento de la tensión de la pared celular es el estímulo que pone en marcha la cascada de mensajeros químicos que tiene por finalidad incrementar la capacidad contráctil de las células y que se acompaña de un aumento considerable de su tamaño. Esta cascada se inicia con la transcripción de una batería de protooncogenes de respuesta rápida y puede finalmente conducir a una insuficiencia cardíaca por un fallo en el manejo del calcio intracelular. Durante el desarrollo de la hipertrofia, un estímulo mecánico se traduce en una respuesta bioquímica que acaba por aumentar de forma drástica la tasa de muerte celular.

giotensina, como han descrito Sadoshima et al<sup>6,7</sup> en experimentos que demuestran que la estimulación del cardiomiocito activa la producción de angiotensina por los miocitos. La angiotensina, a su vez, induce la expresión de una batería de protooncogenes entre los que se incluye el *c-fos*. La existencia de una relación causa-efecto entre el estímulo mecánico que produce un aumento en la tensión de la membrana celular es evidente cuando la inhibición de la enzima conversiva de la angiotensina con losartán bloquea la activación de toda la batería de oncogenes, incluido el *c-fos*<sup>2</sup>. Es interesante señalar que cuando se añade el medio de cultivo obtenido a partir de células activadas a un cultivo de cardiomiocitos normales no activados, también se induce la expresión del protooncogén *c-fos*. La inducción de la hipertrofia se produce, por tanto, por un factor soluble que se encuentra en el medio extracelular que puede inhibirse con losartán, es decir, se trata de un fenómeno dependiente de la angiotensina II. El análisis detallado de la batería de genes que se inducen por el aumento de la tensión de la pared celular demuestra que son los mismos que se activan durante la respuesta hipertrófica causada por la angiotensina II. Ambas respuestas son susceptibles de ser bloqueadas por los inhibidores de los receptores de la angiotensina.

La estimulación del receptor de la angiotensina, tanto el de tipo I como el de tipo II, induce un aumento del calcio citoplasmático que, a su vez, produce la activación de una molécula denominada calcineurina. La cascada bioquímica que se pone en marcha ha sido

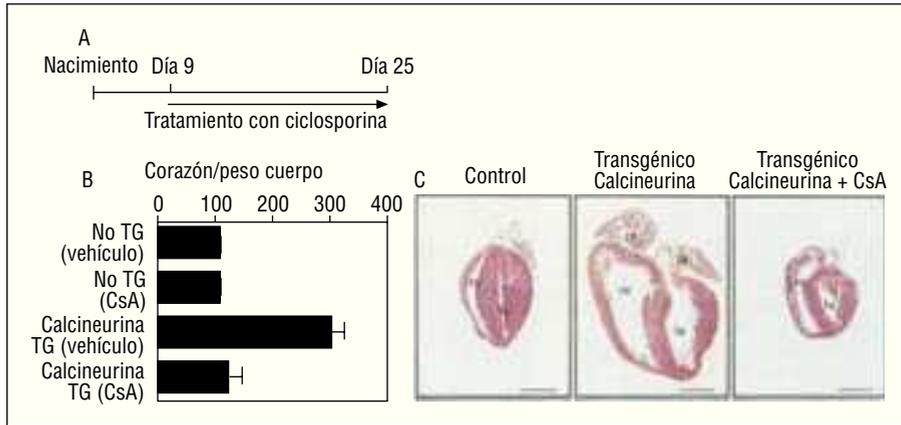
descrita en detalle en los trabajos de Olson et al<sup>8-10</sup>. La calcineurina desfosforila un factor citoplasmático de transcripción llamado NF-AT (factor nuclear de linfocitos T activados). Este factor de transcripción se descubrió en los leucocitos durante la respuesta inmunológica, pero también está presente en los miocitos y es el que actúa como mensajero químico entre el citoplasma y el núcleo. Al desfosforilarse se transloca al núcleo y facilita la transcripción de los genes involucrados en la respuesta hipertrófica. La demostración de esta cadena bioquímica se confirmó a partir de experimentos en los que se utilizaron los estímulos de manera independiente. Así, por ejemplo, la administración de angiotensina o de fenilefrina a cultivos de miocitos normales indujo la aparición de hipertrofia. Por el contrario, la aplicación de ciclosporina, que es un inhibidor de la calcineurina, bloqueó la respuesta hipertrófica.

Los mismos resultados se obtuvieron a partir de un modelo de ratones transgénicos<sup>11</sup>. Así, mientras que la incorporación de NF-AT al genoma de ratones no tuvo consecuencias fisiológicas (porque los animales fueron capaces de regular mediante fosforilación el exceso de expresión y síntesis de NF-AT), cuando se utilizó el gen del NF-AT mutado que carecía de la región para fosforilarse se produjo una gran hipertrofia cardíaca en ausencia de hipertensión y de ejercicio físico. Lo mismo sucede si se utilizan animales transgénicos que sobreexpresan calcineurina (fig. 2). En resumen, cualquier manipulación experimental de la cadena bioquímica que conduce a la hipertrofia, tanto en la membrana celular como en el citoplasma o en el núcleo, es capaz de reproducir esta respuesta fisiopatológica. De igual forma, la inhibición de cualquiera de los factores implicados en el desarrollo de la hipertrofia puede revertir la respuesta hipertrófica en estos modelos experimentales. Además, la capacidad para revertir la hipertrofia no se limita a la reducción del tamaño del corazón, sino que se acompaña de una desaparición de la fibrosis, de manera que el tratamiento farmacológico de los corazones hipertróficos puede hacerlos indistinguibles de un corazón normal.

Existen también estudios en humanos que confirman la relación que se había descrito experimentalmente entre la calcineurina y la hipertrofia cardíaca. Lim et al<sup>12</sup> demostraron que las concentraciones de calcineurina activada son significativamente más elevadas en individuos que murieron de insuficiencia cardíaca en comparación con las de aquellos de la misma edad que no presentaron insuficiencia cardíaca.

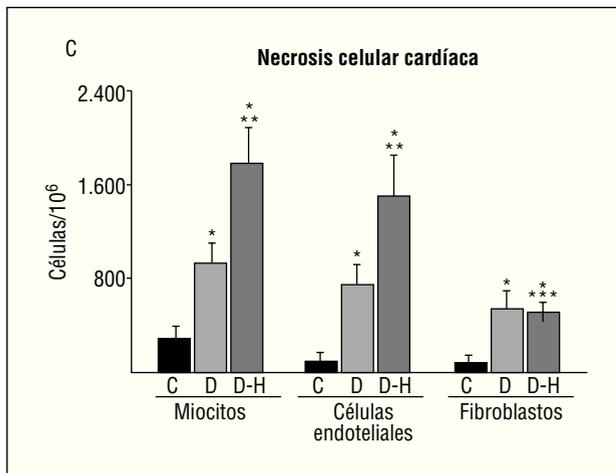
## CRECIMIENTO CELULAR Y APOPTOSIS

Como se ha mencionado con anterioridad, para que se active la calcineurina es necesario que aumenten las concentraciones de calcio citoplasmático, que es el mensajero que actúa como intermediario entre la an-



**Fig. 2.** Efecto del tratamiento con ciclosporina sobre la hipertrofia cardíaca desarrollada en ratones transgénicos que sobrepresan calcineurina. A: el tratamiento farmacológico con ciclosporina se realizó desde el día 9 después del nacimiento hasta el día 25. B: la relación entre el peso del corazón y el peso corporal fue significativamente superior en animales transgénicos que sobrepresaban calcineurina respecto a los animales no transgénicos o los transgénicos que habían sido tratados con ciclosporina. C: aspecto histológico de los corazones de animales del grupo control, de transgénicos con sobrepresión de calcineurina y de trans-

génicos tratados con ciclosporina. La sobrepresión de calcineurina se acompañó de un gran desarrollo de hipertrofia, que pudo ser revertida con un tratamiento con ciclosporina. Este tratamiento no sólo devolvió a los corazones su tamaño normal, sino que también revirtió la fibrosis que se desarrolla en la hipertrofia patológica. TG: transgénicos; CsA: ciclosporina.



**Fig. 3.** Tasa de muerte celular por necrosis en miocitos, células endoteliales y fibroblastos, procedentes de ratas control, diabéticas y diabéticas con hipertensión. La diabetes se indujo de forma aguda y los animales presentaron unas concentraciones de glucosa sanguínea de 300 mg/dl. La inducción de diabetes se acompañó de un aumento drástico del número de células que morían por necrosis. La asociación de diabetes con hipertensión produjo un aumento de la tasa de muerte celular de alrededor de seis veces mayor que la que presentaron los animales del grupo control. Estos valores tan altos en el número de células que mueren en determinadas condiciones patológicas son incompatibles con la idea de que las células miocárdicas no se regeneran.

giotensina y la calcineurina. El calcio es una molécula clave en el tráfico de señales intracelulares y su incremento puede poner en marcha numerosas cadenas metabólicas, entre ellas la activación de la apoptosis. El mecanismo por el que una concentración elevada de calcio desencadena la apoptosis tiene que ver con la inducción de la expresión del gen de la proteína p53<sup>13</sup>. Este gen representa un punto de convergencia de muchos estímulos proapoptóticos y su función consiste en proteger a la célula contra la neoplasia. Cuando se activa el gen p53 se desencadena la vía metabólica que

conduce a la apoptosis<sup>14</sup>. Determinados estímulos pueden, por tanto, no sólo poner en marcha la cadena bioquímica de la hipertrofia, sino también inducir una respuesta apoptótica en la célula<sup>15</sup>.

En el proceso de desarrollo fisiológico del corazón, desde el momento del nacimiento hasta que se alcanza la edad adulta, existe un equilibrio entre los estímulos que promueven el crecimiento en tamaño de los miocitos y los que pueden conducir a la muerte celular programada y a la necrosis. Este concepto, que ha sido impulsado fundamentalmente por el grupo de Anversa, se ha visto reforzado por estudios que demuestran que la muerte celular apoptótica en corazones de rata aumenta de forma progresiva con la edad del animal, y puede llegar a dispararse cuando se induce el desarrollo de hipertrofia. La muerte celular afecta no sólo a los miocitos, sino también a las células endoteliales y, en menor intensidad, a los fibroblastos<sup>16,17</sup>. Además, la inducción experimental de diabetes e hipertensión en ratas produce un aumento drástico de la tasa de muerte celular, tanto en forma de necrosis como de apoptosis (fig. 3)<sup>18</sup>.

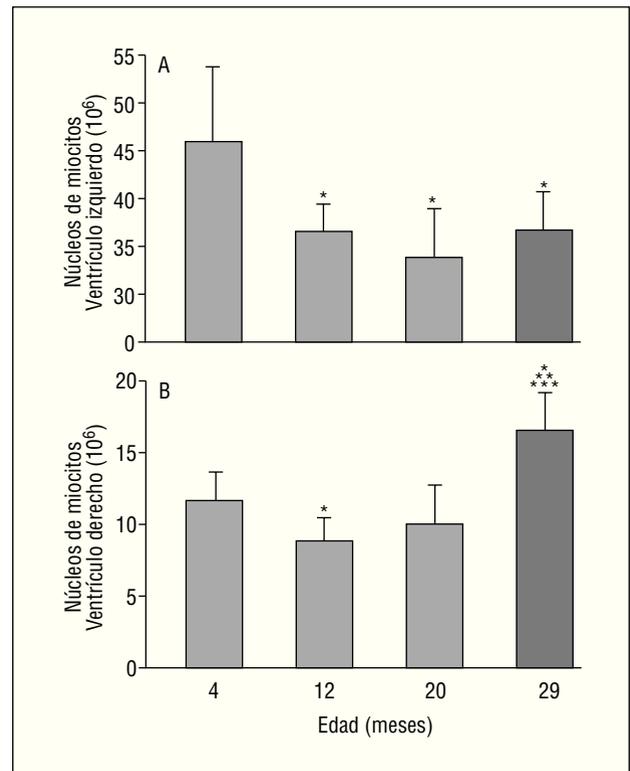
El hecho de que determinados procesos patológicos puedan provocar la muerte de miocitos y otras células cardíacas de forma tan importante pone en cuestión el concepto de que el miocardio no presenta recambio celular, y de que las células que existen poco después de nacer son las que se mantendrán a lo largo de la vida del individuo. Los datos que se han obtenido usando modelos animales sobre la tasa de muerte celular y el número total de células que configuran la masa ventricular apoyan la hipótesis de un recambio activo entre los miocitos cardíacos. En ratas, el número de miocitos en los dos ventrículos del corazón disminuye hasta que se alcanza la edad adulta y luego aumenta ligeramente en la vejez (fig. 4). Si no hubiese un recambio celular, estos animales no podrían sobrepasar los pocos meses de vida sin haber perdido gran parte de su

masa cardíaca. Se ha calculado que en los ratones de 4 meses el número total de miocitos por ventrículo es de 10,5 millones; de este total se produce una pérdida diaria de 0,026 millones de miocitos, lo que corresponde a un 33% de pérdida celular en 4 meses. En ratones seniles, el número total de miocitos por ventrículo es de 7,1 millones, de los que se pierden diariamente 0,27 millones; esto representa un 420% de pérdida celular en 4 meses. Estos valores, que serían insostenibles si no estuvieran acompañados de un alto nivel de regeneración celular para reemplazar las células muertas, constituyen una prueba más a favor de la hipótesis de un recambio celular en el corazón. Estos datos son incompatibles con el concepto clásico que se ha mantenido hasta nuestros días sobre el bloqueo del ciclo celular en miocitos del corazón adulto.

### Mecanismo del bloqueo celular en cardiomiocitos adultos

En nuestro laboratorio hemos investigado los factores implicados en el bloqueo de la división celular y hemos tratado de encontrar una explicación al fenómeno del posible recambio entre miocitos adultos. El responsable del bloqueo del ciclo celular es un antioncogén conocido como la proteína del retinoblastoma<sup>19</sup>. El mecanismo molecular por el que esta proteína es capaz de detener la división celular está caracterizado en detalle. Cuando la molécula interacciona con los factores de transcripción específicos que encajan en su estructura el ciclo celular se detiene. Por el contrario, cuando la proteína del retinoblastoma está inactivada porque la hendidura que interacciona con los factores de transcripción no puede utilizarse porque está fosforilada, se sigue produciendo división celular<sup>19,20</sup>. De la misma manera, a partir de ratones genéticamente modificados a los que se ha eliminado el gen de esta proteína (ratones *knockout*) se pueden obtener cardiomiocitos en cultivo que se dividen de manera activa y que conservan su actividad contráctil, aunque son células completamente normales.

A pesar de que estas observaciones experimentales permiten describir el fenómeno del bloqueo celular, no aportan una explicación al mecanismo que tiene lugar en el corazón adulto para reemplazar ese número considerable de células que se pierden constantemente por una muerte apoptótica. Para tratar de encontrar las claves del recambio celular hemos realizado una serie de experimentos utilizando fetos de ratones de 17 días en los que, aunque ya tienen un corazón diferenciado, sus células conservan todavía la capacidad de dividirse activamente. El análisis de las proteínas que se expresan en este momento del desarrollo ha revelado que durante el período fetal no se detecta todavía la proteína del retinoblastoma y que, en su lugar, se expresa la proteína p107, relacionada estructuralmente con la primera e implicada de manera directa en la diferenciación celu-



**Fig. 4.** Número total de miocitos en el ventrículo izquierdo (panel superior) y en el ventrículo derecho del corazón (panel inferior) en ratas a lo largo de su vida. Como se puede apreciar, desde que el animal nace hasta que alcanza la edad adulta se produce una disminución del número total de miocitos. Sin embargo, en los animales seniles (29 meses) vuelve a aumentar su número. Estos resultados sólo pueden explicarse si se considera que los miocitos cardíacos se reproducen. Teniendo en cuenta la tasa de muerte celular que se ha cuantificado en modelos experimentales, si las células no se dividieran se produciría una pérdida progresiva de la masa cardíaca que sería incompatible con la vida.

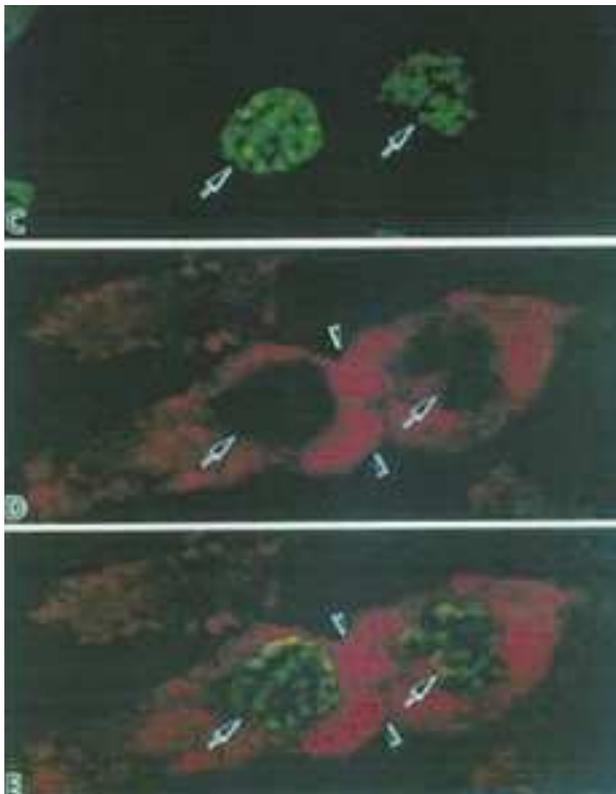
lar<sup>20</sup>. La relación entre estas dos proteínas se invierte después del nacimiento y se mantiene así a lo largo de la vida, de manera que en los miocitos adultos y diferenciados se expresa la proteína del retinoblastoma y desaparece la p107. Es decir, durante la vida fetal el corazón tiene miocitos capaces de diferenciarse gracias a la presencia de la p107, que es muy abundante en esta etapa, pero son células que no tienen todavía bloqueado su ciclo celular por la ausencia de la proteína del retinoblastoma. Nuestra hipótesis es que en el corazón adulto persiste un número residual de células que mantienen estas características fetales en su patrón de expresión proteica.

Esta idea se puede documentar de forma experimental administrando bromodesoxiuridina a animales, un análogo de los nucleótidos que se incorpora en el ADN de las células que se encuentran en proceso de división y que se puede detectar por métodos inmunocitoquímicos. Los resultados han demostrado, una vez más, que los miocitos adultos se reproducen y que su tasa de división celular es mayor cuanto más viejo es

TABLA 1. Miocitos marcados con BrdU

	4 meses	27 meses
1 día	0,35 ± 0,12%	1,02 ± 0,29%
2 días	1,00 ± 0,38%	4,0 ± 1,5%
28 días	4,40 ± 1,2%	16,2 ± 4,0%
KI-67	1,25 ± 0,33%	4,05 ± 1,5%

Porcentaje de miocitos cardíacos marcados con bromodesoxiuridina (BrdU), un análogo de los nucleótidos que permite cuantificar la tasa de división celular. El marcaje se realizó durante 1 día, 2 días o de forma crónica a lo largo de 28 días, en ratones de 4 meses o de 27 meses de edad. Los resultados obtenidos demuestran que los miocitos de animales seniles (27 meses) presentan una tasa de división celular aproximadamente cuatro veces superior que los animales jóvenes. Los valores de replicación de ADN se corroboraron utilizando un método de marcaje distinto, el KI-67, con resultados parecidos.



**Fig. 5.** Imagen de un cardiomiocito durante el proceso de división por mitosis. En el panel superior se distinguen en verde los 2 núcleos celulares inmediatamente después de dividirse. En el panel central se puede apreciar cómo se están separando los citoplasmas de las células hijas, que aparecen teñidos en rojo por el marcaje fluorescente de la cadena pesada de la miosina. En el panel inferior se presenta una yuxtaposición de las dos imágenes anteriores.

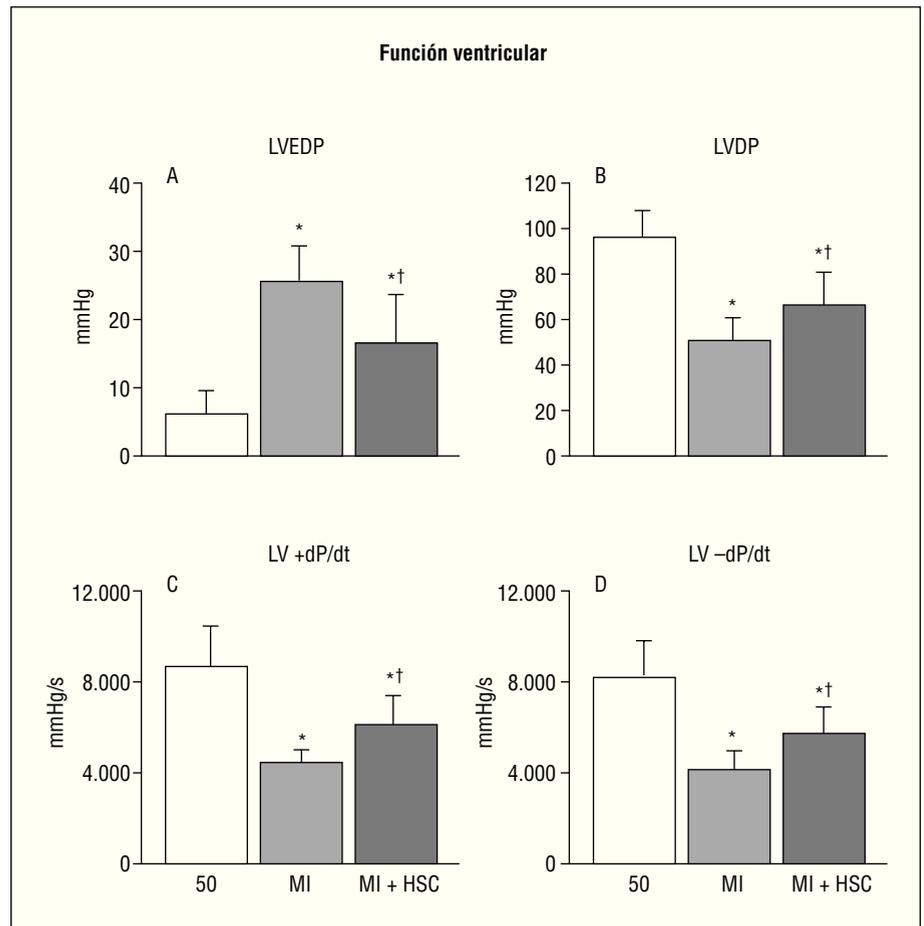
el animal. Estos datos coinciden con los que habíamos obtenido previamente con relación al índice de muerte celular, y permiten hablar de un verdadero recambio de miocitos cardíacos en el animal adulto. Cuando el marcaje de los núcleos celulares se realizó a lo largo de días, en lugar de hacerlo de forma instantánea, se obtuvieron porcentajes de recambio celular próximos a los de la muerte celular. Así, en el animal joven, alre-

dedor del 4% de los miocitos están en proceso de división, mientras que en el animal viejo este porcentaje se incrementa hasta el 16% (tabla 1). Utilizando otros métodos de marcaje (p. ej., el de la proteína KI-67, que se usa habitualmente para cuantificar la división celular en las neoplasias)<sup>21</sup> se han obtenido resultados similares en cuanto a la proporción de células en división en el animal viejo respecto al joven (aproximadamente cuatro veces más), aunque los valores absolutos de multiplicación celular hayan sido inferiores. En la figura 5 se observa un miocito cardíaco durante el proceso de mitosis.

El concepto que hemos tenido hasta el momento del corazón como órgano que envejece progresivamente desde poco después del nacimiento debe ser revisado. Nuestros resultados demuestran que en el plazo de 4-6 meses se reemplazan aproximadamente una tercera parte de las células cardíacas, lo que significa que en 2-3 años se regenera el órgano completo. Es probable que un sujeto de 50 o 60 años tenga un corazón en el que la mayoría de los cardiocitos no tienen más de 4 o 5 años. Por tanto, el corazón parece tener una capacidad ilimitada de rejuvenecer.

## INDUCCIÓN DEL DESARROLLO DE CARDIOMIOCITOS A PARTIR DE CÉLULAS MADRE

La regeneración miocárdica como alternativa al trasplante es una idea que se desarrolló a partir de un trabajo pionero del grupo de Cossu<sup>22</sup>. En este trabajo se utilizaron ratones a los que se había eliminado por completo las células de la médula ósea por irradiación. En su lugar se trasplantaron células enzimáticamente marcadas procedentes de médula ósea de ratones transgénicos. De manera sorprendente, estos animales trasplantados presentaron fibras musculares esqueléticas que procedían del animal donador. Este hallazgo histológico se produjo en todos los músculos esqueléticos del animal receptor. A partir de estas observaciones, varios laboratorios, entre los que se encuentra nuestro grupo, han descrito la existencia de un tipo celular muy primitivo de la médula ósea capaz de diferenciarse en cualquier célula, y que ha sido denominado célula madre. La potencialidad de transformación de estas células se puede probar fácilmente en el laboratorio. Para ello se colocan en la membrana alantoi-dea del embrión de pollo las células marcadas de ratón transgénico y se hace un seguimiento del desarrollo del embrión<sup>23</sup>. De esta forma se puede comprobar que casi todos los tejidos del embrión de pollo (hígado, bazo, músculo esquelético, tejido nervioso, corazón, etc.) aparecen teñidos con la enzima que procede de este único tipo celular, las células madre de ratón. Concretamente, el corazón de pollo contiene entre un 25 y un 30% de células marcadas de ratón<sup>23</sup>. Las células madre de la médula ósea tienen, por tanto, una



**Fig. 6.** Mejoría de la presión telediastólica ventricular (LVEDP) y de la presión desarrollada (LVDP) en ratones que han sufrido un infarto de miocardio y a los que se les ha trasplantado en la zona de necrosis células madre procedentes de un animal consanguíneo (grupo MI + HSC). Aunque los valores de la función ventricular no llegaron a ser tan buenos como en el grupo control, fueron significativamente mejores que los que presentaron los animales con infarto de miocardio sin tratamiento (grupo MI).

capacidad insospechada de desarrollo y diferenciación, no sólo para la formación de las células sanguíneas, sino también de todas las demás células del organismo<sup>24</sup>.

Para comprobar si las células madre de la sangre son capaces de regenerar el miocardio perdido después de un infarto, en colaboración con el laboratorio de Piero Anversa hemos introducido las células madre de ratón en animales consanguíneos que han sufrido un infarto de miocardio. Los resultados obtenidos han sido sorprendentes y muy esperanzadores. Los cortes histológicos obtenidos en estos casos demuestran que la zona de miocardio infartado puede regenerarse a partir de estas células madre. Cuando las células se introducen en el borde de la zona de necrosis es posible obtener un crecimiento en continuidad con el tejido normal que reemplaza la zona necrótica en el plazo de 2 semanas<sup>25</sup>. Además, no sólo se regeneran los cardiomiocitos, sino también las células endoteliales y las células musculares lisas. Estos animales presentaron una mejoría significativa de su función ventricular (fig. 6).

Otro objetivo que nos hemos planteado ha sido el de investigar si el corazón contiene células madre en su estructura histológica normal. Utilizando exactamente

el mismo procedimiento que habíamos empleado para aislar células madre de la médula ósea, hemos podido no sólo aislar, sino también hacer crecer en cultivo, células madre procedentes del corazón. Estas células tienen unas características propias que pueden ser utilizadas para su identificación como, por ejemplo, la presencia de una gran cantidad de fosfatasa alcalina y la expresión de receptores proteicos específicos en su membrana. Es posible obtener grandes cantidades de células madre en cultivo, aunque su mantenimiento en un estado completamente indiferenciado es muy difícil. Se pueden inyectar en un corazón inmaduro de manera similar a como habíamos hecho con células madre de médula ósea y, de la misma forma, estas células se desarrollan y se incorporan al corazón trasplantado, llegando a hacerse completamente indistinguibles de las células originales<sup>26</sup>. Si se cuantifica la tasa de división celular también se obtienen valores muy similares.

La célula madre miocárdica es una célula multipotente que se encuentra en estado de latencia en el corazón normal, pero que puede ser estimulada con factores de crecimiento capaces de hacerla entrar en una fase de división rápida. Se puede aislar a partir de tejido cardíaco disociado y hacerla crecer en cultivo. Aun-



**Fig. 7.** Las células madre multipotenciales se pueden obtener a partir de tejido miocárdico disociado y pueden expandirse por crecimiento en cultivo. Aunque sus aplicaciones hoy día todavía se encuentran en fase experimental, han demostrado ser útiles en la regeneración del tejido necrótico cuando se inyectan a ratones consanguíneos que han sufrido un infarto de miocardio. En estos animales se ha documentado no solamente el reemplazo del tejido necrótico por tejido nuevo, sino también la formación de nuevos vasos sanguíneos. Asimismo, las células madre se han utilizado con éxito para regenerar células de la médula ósea cuando se inyectan en la sangre de animales irradiados.

que sus aplicaciones clínicas se encuentran todavía en fase de investigación, ya se ha demostrado su utilidad en la regeneración del tejido necrótico y de los vasos coronarios, o en el reemplazo de células de la médula ósea de animales consanguíneos (fig. 7). Su localización histológica es la que determina que se diferencie en uno u otro tipo celular. Los resultados que se están obteniendo a partir de modelos experimentales constituyen una evidencia sólida de que el miocardio no es un tejido estático, como se había creído hasta ahora, sino que se encuentra en un proceso continuo de crecimiento, muerte y renovación. La obtención de células totipotenciales a partir de la sangre, del corazón o de otros tejidos representa una avenida terapéutica innovadora para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca irreversible, y sobre todo de la cardiopatía isquémica, ya que puede permitir en un futuro próximo el reemplazo de tejido necrótico.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Tam SK, Gu W, Mahdavi V, Nadal-Ginard B. Cardiac myocyte terminal differentiation. Potential for cardiac regeneration. *Ann NY Acad Sci* 1995; 752: 72-79.
2. Zak R. Development and proliferative capacity of cardiac muscle cells. *Circ Res* 1974; 35 (Supl 6): 17-26.
3. Anversa P, Kajstura J. Ventricular myocytes do not terminally differentiate in the adult mammalian heart. *Circ Res* 1996; 78: 536-546.

4. Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan SM, Pinato N, Bussoni R et al. Human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2001. En prensa.
5. Izumo S, Nadal-Ginard B, Mahdavi V. Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 85: 339-343.
6. Sadoshima J, Xu Y, Slayter HS, Izumo S. Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell* 1993; 75: 977-984.
7. Sadoshima J, Izumo S. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu Rev Physiol* 1997; 59: 551-571.
8. Olson EN, Williams RS. Calcineurin signaling and muscle remodeling. *Cell* 2000; 101: 689-692.
9. Frey N, MacKinsey TA, Olson NE. Decoding calcium signals involved in cardiac growth and function. *Nat Med* 2000; 6: 1221-1227.
10. Musaro A, McCullagh KJ, Naya FJ, Olson EN, Rosenthal N. IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-Atc1. *Nature* 1999; 400: 581-585.
11. Molkenin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J et al. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 1998; 93: 215-228.
12. Lim HW, Molkenin JD. Calcineurin and human heart failure. *Nat Med* 1999; 5: 246-247.
13. Fiordaliso F, Leri A, Cesselli D, Safai B, Nadal-Ginard B, Anversa P et al. Hyperglycemia activates p53 and p53-dependent genes leading to myocyte death. *Circ Res* 2001. En prensa.
14. Frustaci A, Kajstura J, Chimenti C, Jakoniuk I, Leri A, Maseri A et al. High levels of myocardial cell death in human diabetes. *J Exptl Med* 2001. En prensa.
15. Anversa P, Palackal T, Sonnenblick EH, Olivetti G, Meggs LG, Capasso JM. Myocyte cell loss and myocyte cellular hyperplasia on the hypertrophied aging rat heart. *Circ Res* 1990; 67: 871-885.
16. Olivetti G, Abbi R, Quanni F, Kajstura J, Cheng W, Nithahara JA et al. Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med* 1997; 336: 1131-1141.
17. Fiordaliso F, Li B, Latini R, Sonnenlick EH, Anversa P, Leri A et al. Myocyte death in streptozotocin-induced diabetes in rats is angiotensin II dependent. *Lab Invest* 2000; 80: 513-527.
18. Gu W, Schneider JW, Condorelli G, Kaushal S, Mahdavi V, Nadal-Ginard B. Interaction of myogenic factors and the retinoblastoma protein mediates muscle cell commitment and differentiation. *Cell* 1993; 72: 309-324.
19. Endo T, Nadal-Ginard B. Reversal of myogenic terminal differentiation by SV40 large T antigen results in mitosis and apoptosis. *J Cell Sci* 1998; 111: 1081-1093.
20. Schneider JW, Gu W, Zhu L, Mahdavi V, Nadal-Ginard B. Reversal of terminal differentiation mediated by p107 in Rb-/- muscle cells. *Science* 1994; 264: 1467-1471.
21. Scholzen T, Gerdes J. The ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000; 182: 311-322.
22. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279: 1528-1530.
23. Clarke DL, Johanson CB, Wilbertz J, Veress B, Nilsson E, Karlstrom H et al. Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* 2000; 288: 1660-1663.
24. Vogel C. Stem cells: new excitement persistent questions. *Science* 2000; 290: 1672-1674.
25. Orlic D, Kajstura J, Chimentio S, Jakonjuk I, Anderson SM, Li B et al. Hematopoietic stem cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001. En prensa.
26. Tam SK, Gu W, Nadal-Ginard B. Molecular cardiomyoplasty: potential cardiac gene therapy for chronic heart failure. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995; 109: 918-923.